

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 ムバラク オスマン マハジュブ スリマン
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第418号
学位授与の日付 平成31年3月25日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 The effect of Collagen Cross-links Deficiency on the Incorporation of Grafted Bone. (移植骨定着に対するコラーゲンクロスリンク量低下の影響)

論文審査委員 主査 教授 泉 健次
副査 教授 魚島 勝美
副査 教授 小林 正治

博士論文の要旨

【背景と目的】 インプラント治療の成功は、埋入部位の骨の条件に大きく左右される。時に埋入部位の骨量を増加させるために骨増生術が必要となるが、現在骨増生のゴールドスタンダードは自家骨移植である。その際、移植骨を採取する部位は様々であるが、移植骨の骨質が骨増生の結果にどのように影響しているかは、よく分かっていない。つまり、移植された骨が移植後にどのような運命をたどるかは、移植骨自体の骨質に影響されるのか、移植される部位の骨質に影響されるのかは説明されていない。骨質は骨密度と共に骨強度を決める要素のひとつであるが、骨質の指標の一つにコラーゲンクロスリンクがある。コラーゲンタイプIは骨の有機成分の約9割を占めており、コラーゲン分子間をつなぐコラーゲンクロスリンクは、骨の機械的強度、コラーゲン線維の構造、アパタイト結晶の沈着の起点として重要な役割を担っており、コラーゲンクロスリンク量の低下は骨質の低下を引き起こすと考えられている。本研究の目的は、骨のコラーゲンクロスリンク量減少が移植骨の定着にどのように影響するか、また移植骨の定着にはドナー側とレシピエント側のどちらの骨質に影響を及ぼすかを、ラットによる動物実験を通して、組織学的に検証することである。

【方法】 4週齢のWester系雌性ラット (n=54) を対照群と実験群にランダムに分け、さらにそれぞれをドナー側とレシピエント側の2群に分けた。実験群には、ラット生体内でコラーゲンクロスリンク量を減少させるために、飲料水中に0.2%のBeta Aminopropionitrile (BAPN) を加えて4週間与えた。BAPNはLysyl Oxidase (LOX) 酵素を阻害し、コラーゲンクロスリンク形成を妨げると言われている。対照群のラットには実験期間を通じて通常の水を与えた。ドナーであるラットの頭蓋骨中央に切開を行い、骨表面を露出した後に注水下にて直径5mmのトレフィンバーにて窩洞を左右2カ所形成し、移植骨を採取した。レシピエントであるラットは同じく頭蓋骨中央に切開を行い、骨表面を露出した後に注水下にて直径5mmのトレフィンバーにて窩洞を形成した後に、ドナーから移植骨を移植した。骨移植後1, 2, 4週後にラットを安楽死させ、処置をした頭蓋骨を摘出し、通常に従って脱灰薄切標本を作製した。パラフィン切片は薄切後、H-E染色、Picrosirius red染色、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)染色、TdT-mediated dUTP nickend labeling (TUNEL) 染色を施し、偏光顕微鏡または光学顕微鏡下に観察した。また、免疫組織化学的検索では、Sclerostin抗体を用い、光学顕微鏡下に観察した。組織形態計測も同時に行った。

【結果と考察】 コラーゲンクロスリンク量を低下させた移植骨は対照群と比較して未成熟なコラーゲンが認められ、かつその構造も乱れていた。このことからラットへのBAPN投与はその骨質を低下させていたことが示された。

骨移植の実験においては対照群、実験群共に移植骨と母骨の間には新生骨が認められた。しかしながら実験群の方が対照群に比べ、移植骨の骨質にかかわらず、手術後早い時期から骨形成が認められた。手術4週間後には対照群の切片の75%に移植骨と母骨との完全な結合が認められ、実験群では観察したすべての切片で完全な移植骨と母骨の結合が認められた。これは、移植骨と母骨との間の骨形成はレシピエントの骨質に影響される可能性が高く、骨質内のコラーゲンクロスリンク量の低下は骨形成を促進する可能性が高いことを示している。今回の実験期間において

は移植骨の厚みや移植骨組織内の骨細胞のアポトーシスに変化はなかった。また、移植骨表層の骨膜形成層では実験群の方が対照群に比べ、術後1週間後において高い細胞活性が認められた。しかしながら、コラーゲンクロスリンク

量の減少が骨形成を活性化させるメカニズムやそこに形成された新生骨の骨質が、リモデリングによって長期的にどのように変化するかは不明のため、今後詳細に解明していく必要がある。また、本実験結果では手術後4週目までにおいて、対照群と実験群とで新生骨に組織学的な差は認められなかったが、骨移植後の移植骨が長期的にどのような運命をたどるかはさらに詳しく調べる必要がある。

頭蓋骨に骨欠損を形成した実験では、実験群において対照群と比べて実験期間を通して骨形成量が多く、特に術後1週間後には有意差が認められた。このことから移植骨の定着にはレシピエント側の骨質がより大きく影響する可能性があり、その理由として骨形成関連の細胞が活性化しているか、もしくは細胞数が多くなっていることが原因であると考えられる。予知性の高い骨移植やその後のインプラントの長期予後のためにも更なる研究が望まれる。

【結論】 骨基質のコラーゲンクロスリンク量の低下はin vivoにおいて移植骨と母骨との間に骨形成を促進する可能性がある事が示された。また、移植骨の定着には主にレシピエント側の骨質が影響する可能性が高いことが示された。

【 審査結果の要旨 】

1. 4群を設定した本実験の実験結果は、当初の仮説とは異なるものだったと想像できます。仮説に基づいて予想した結果と、実際の結果について説明してください。

本実験の主目的は、骨のコラーゲンクロスリンク量減少が移植骨の定着にどのように影響するかの検討であり、骨移植術の成功にとって最重要因子である、移植骨の定着に影響するのは主に移植骨側の問題か、移植床側の問題なのかを見極めることであった。実際この動物実験を開始するに当たり、私の仮説は移植する骨質がその主役であるという仮説を立てていた。つまり、移植床の条件にかかわらず、BAPN投与を受けた移植骨が、受けていない対照骨よりも定着のレベルが良好なのではないかと考えていた。しかし、実験の骨組織形態計測から、移植骨の条件にかかわらず、BAPN投与を受けた移植床での移植骨の定着が良好であったことが明らかとなった。本論文で私は、移植骨と母床骨の定着、癒合が早期に起こるといった結果に至ったのは、宿主のコラーゲンクロスリンク量減少によることが示唆された。本実験系で、移植骨ではなく、母床の骨が骨の定着過程の主役であることを見出し、いままでの文献で示されてきたことと一致している。

2. BAPNは、ある種の豆類における毒性成分として知られ、中毒性神経疾患の“ラチリズム”や、解離性大動脈瘤、皮膚弛緩などを引き起こす可能性があります。本実験でBAPN投与による全身的な副作用は見られませんでしたか？ BAPNを投与した動物には、尾のわん曲、体重減少や、骨の軟化のような特異的症候がみられました。すべて、コラーゲンの質の低下と関係しています。
3. 本実験の組織形態計測によるCt.Th, B, Ar and DCの意義は何ですか？ Ct.Thと骨癒合は移植床ラットで、BAとDCはドナーラットで計測した。本文に記載がなかったが、BAとDCの計算式は以下のとおりである。Defect closure (%): $(b1 + b2)/a \times 100$. bone area ratio (%): $(B1 + B2)/A \times 100$. Ct.Th計測は移植床において、移植骨からの新生骨を評価するため、一方、BAとDCは、ドナーラットの骨採取部における基本的骨形成能の評価指標として計測した。
4. 本実験では他に、TUNEL, sclerostin and TRAP染色、骨膜の厚さを計測している。しかし、いずれの方法も関連性に乏しく、解析に一貫性がない印象がある。なぜか？ 4つとも異なる目的に使用したためである。TUNELとSclerostinは、移植骨の生活活性を示すことで、手術による骨細胞を評価することに使用した。TRAPは骨のリモデリングを間接的に評価するために使用した。また、骨膜の厚みは、宿主のどの部位が骨形成の前駆細胞を供給する環境にあるかを知るために測定した。しかし、図の登場順序を変更して、より論文の流れをよくするようにしたい。
5. 使用した動物の年齢は適正か？ 本実験では骨代謝と細胞活性が高い4週の若齢ラットを用いた。本実験の目的は、骨治癒におけるコラーゲンクロスリンク量減少の効果を探るためであるので、若齢ラットを用いたことは、実験の第1段階として適正と考える。次の実験では、同じ系において骨形成の成功率を検討することにしており、その際は老齢ラットを用いるべきと考えている。
6. “accelerated bone cells activity”とはどういう意味か？ 的確に答えるのは難しいポイントであるが、推測は可能である。例を挙げると、Idaらが推察しているのは、骨のコラーゲンクロスリンク量低下は、骨表面に存在するいわゆる受容体が、容易に周囲にいる骨細胞に露出するほど、骨質が柔らかい環境であることに匹敵するとしている。ただし、この概念は実験的にはまだ証明されていない。よって、より説得力のある説明としてはコラーゲン線維と骨細胞の相互作用といえる。Diazらは、コラーゲンが受容体を介したシグナリングのリガンドであることの多くの例を示していることから、コラーゲン線維構造の異常が骨細胞の活性を変えることは十分に考えられると思われる。

7. **骨のコラーゲンクロスリンク量低下状態において、移植骨は最終的にはどうなるのか？** 本実験の観察期間は4週間であるが、コラーゲンクロスリンク量の低下した移植骨は、低下していない移植骨と同様の結果を呈した。壊死やアポトーシスは見られなかった。さらに、移植骨の吸収やリモデリングも対照群とほぼ同様であった。しかし、それより長期に及ぶ骨の運命については未知数であり、今後の研究が待たれる。
8. **BAPN はコラーゲンクロスリンク量低下をもたらしても、“acceleration of bone cells activity”をもたらしてはいないことは、どうやって担保したのか？** Turecek Cらは、BAPN が骨細胞に与える副作用はないとしている。
9. **本実験の結果から将来的に見込める可能性は？** 本実験は、新たな臨床的な骨質評価指標、すなわちコラーゲンクロスリンク量、を設定するにあたっての基礎となる。かつ、本実験結果から、コラーゲンクロスリンク量低下状態における骨移植の長期予後を推測するのに重要である。
10. **臨床的見地からして、骨の質を評価するにあたり、コラーゲンやコラーゲンクロスリンク量は考慮すべきか？** 骨移植過程において、本実験はコラーゲン構造の重要性に関する情報を提供する。唯一、臨床的に相関関係があるのは、たとえコラーゲンクロスリンク量の低下があっても、骨移植術の可能性が高い。
11. **どのような因子が骨質を左右するのか？** 臨床的に歯科領域での骨質評価法はレントゲンによる骨密度 (BMD)のみである。この不都合な面は、骨の6割を占める無機質成分しか評価しないことである。実際、骨質は多くの因子で評価されるべきである。たとえば、骨組織構造、ミネラル率、損傷の蓄積、代謝、リモデリング、コラーゲンと無機質の性質や比(NIH consensus 2001)など。最近ようやく、BMD以外の骨質評価法が注目されるようになった。本実験では、コラーゲンやコラーゲンクロスリンク量の重要性を骨質評価法として強調したが、現在、それを術前に評価する方法やツールはない。骨組織構造(海綿骨、皮質骨など)については、皮質骨はBMDが高く、機械的強度もあるの、骨の再生に好ましいと考えられてきた。たとえば、下顎骨の方が、上顎骨より初期の安定が図られる。しかし、興味深いことにLiらによれば、海綿骨の方が骨細胞活性と骨結合が高いため、再生能に優れていることが示唆されている。このことは、BMD以外の骨質を指標とする因子も考慮することが重要であることを示している。
12. **どのような因子がコラーゲンクロスリンクに効果があるのか？** コラーゲンクロスリンクを論じるのに、酵素性と非酵素性に分けるのが重要である。酵素性クロスリンクはLOX(リシルオキシダーゼ)により形成され、二価性のクロスリンクが生じ、後に三価性になる。健常状態や病的状態で、いくつかの因子がこのクロスリンクに関わっている。LOXは骨形成領域や、炎症のある状態で発現上昇し、骨吸収領域では発現が低下する。(Cai et al 2017)。ビタミンもコラーゲンクロスリンクに必須である。ビタミンDはLOX発現を上昇させる(Nagaoka)。ビタミンB6はLOXの共因子として必須であり、ビタミン不足は酵素性クロスリンクを阻害し、非酵素性クロスリンクのAGE(終末糖化産物)を減少させる。共因子としてのビタミンCは鉄の酸化を予防し、LOXの不活性化を予防する。従ってビタミンC至適なりシルおよびプロリルハドロキシラーゼ活性を維持することで、成熟した正常なコラーゲンネットワークの合成を促進する。ビタミンB12間接的にコラーゲンクロスリンクの維持に関わっている。骨の脆弱性に関与し、加齢に伴い増加するホモシステインはコラーゲンのクロスリンクを阻害するが、そこで、ビタミンB12はホモシステインの増加とコラーゲンクロスリンクの維持とのバランスをとるのに必須である(Dhonukshe-Rutten2005)。非酵素性のクロスリンクには、ペントシジンやグルコセパンなどのAGEが含まれる。それらは加齢に伴い自発的に形成され、骨組織に対して悪影響を及ぼす。AGEの蓄積は骨折発生率に関係している。尿中のAGE測定は、骨粗しょう症と糖尿病における骨折のリスク予測に使用されている(Saito et al 2006)。
13. **なぜコラーゲンクロスリンク量不足ラットの骨膜の細胞活性と骨質は、対照群ラットのそれらより高いのか？なぜクロスリンク量不足のラットは、骨形成性細胞を多く供給するのか？**

コラーゲンクロスリンク量不足ラット骨膜に見られる高度な骨細胞活性については、2つの推測がある。1つめはIdaらによるもので、BAPNを投与された個体の骨細胞は、骨の表面受容体により多く曝されていることが考えられている。しかし、この推察の科学的立証はなされていない。2つめは、骨基質の有機質の主要成分であるI型コラーゲンが受容体を介するシグナリングのリガンドとして機能していることが推測されている(Diaz et al 2017)。本実験で我々はコラーゲンの構造を乱した結果、細胞のシグナリング機構に変化が生じ、骨細胞活性にも乱れが生じたと考えている。ただし、詳細なメカニズムは解明されていない。また、いくつかのインビトロ研究から骨形成タンパクと骨形成性の転写因子の発現上昇が報告されている。(Ida et al 2018, Thaler et al 2010)。このことは、骨芽細胞の骨組織沈着能が向上している結果と解釈できる。このような実験群の骨細胞の反応は、異常な骨質を補償する意味で、骨を治癒させ、より多くの骨を形成しようとする正のフィードバックメカニズムともなり得る。詳細なメカニズム解明のためにはさらなる研究が必要である。また、このような骨細胞は、より多くの骨形成性細胞の増殖を可能にさせ、より骨質のよい骨を産生する機能を急速に獲得しているのかもしれない。

骨膜は外側の線維性の層と、内側の骨形成層 (Cambium layer) の2層で構成されている。骨形成層は骨芽細胞の前駆細胞を供給する層で、この層が肥厚することは、コラーゲンクロスリンク量不足環境にある骨膜が、より多くの前駆細胞を蓄えていることを意味している可能性がある。

14. コラーゲンクロスリンク量不足ラットの骨質はよいのか悪いのか？

コラーゲンクロスリンク量不足ラットにおける骨細胞が、より多くの骨組織を形成する能力があるという結果を得ているが、このことは形成された骨組織の骨質がよいことは意味しない。実際、コラーゲンクロスリンク量の不足した骨は機械的強度が非常に低く、外部からのストレスや変形に耐えることができないという過去の報告がある (McNerney 2015)。ただし、それでも BMD は正常である (Paschalis 2011)。私自身の動物実験の経験からも、実験群ラットの骨は軟らかく、トレフィンバーによる骨の切削が、対照ラットにくらべて容易にできた。