

氏名 こだま なおき  
小玉 直樹  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第54号  
学位授与の日付 平成18年3月23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

rhFGF-2 含浸ゼラチンハイドロゲルの組織徐放を用いた  
マウス上顎骨皮質骨新生とその機序の解析

論文審査委員 主査 教授 高木 律男  
副査 教授 齊藤 力  
教授 吉江 弘正

博士論文の要旨

唇顎口蓋裂における顎裂部の骨欠損、歯周病や歯の喪失に伴って失われた歯槽骨など、咬合の再建を行うにあたって、新たな骨の形成が必要となる機会は非常に多い。これまでは、これらの骨の需要に対し自家骨の移植術または仮骨延長術で対応しているが、移植術については、ドナーサイトへの侵襲が大きいことが問題であり、仮骨延長術では、長期間装置を装着する必要があるなどの問題がある。これらの問題点を改善し、新たな骨を必要としている部位に添加させることができれば、臨床的意義は非常に大きい。ひとつの可能性として、低侵襲で生体材料を適用することで、生体が本来備えている骨再生能力を賦活することが考えられる。

そこで今回我々は *in vivo* における骨形成活性が報告されている塩基性線維芽細胞成長因子(FGF-2)を用いて、その局所濃度維持による骨膜性の骨添加効果を調べるために、20 µg のヒト組換え(rh)FGF-2 を含浸したゼラチンハイドロゲル(徐放担体)を組織内へ埋入した。それにより、マウス上顎骨骨膜における rhFGF-2 の局所濃度を約一週間維持することが可能で、28 日間の実験期間では上顎骨体積は皮質骨の新生により、担体のみを埋入した対照群と比較して有意に増加していた。これを組織学的に評価したところ、rhFGF-2 含浸ゼラチンハイドロゲル埋入後 7 日目の骨膜では骨芽細胞の著しい増殖と仮骨の形成をみとめた。そして骨芽細胞の増殖活性は 7 日目以降、徐々に減少し 28 日目においてその増殖と仮骨形成は終息していた。これまでにも骨欠損モデルや骨折治癒モデルにおいて FGF-2 がもたらす骨再生が多く報告されてきているが、正常な骨への新生骨添加モデルは希である。我々の骨新生モデルは小動物ではあるが、新生する骨の体積は片側上顎骨の約 50%に達し、また組織学的に皮質骨であることから骨組織として十分な機械的強度が見込まれるため、臨床での実用も可能と考えられる。一回に形成される骨の量が少ない場合には、その操作を反復することにより、任意の部位へ任意の量の骨を添加させる事が可能となる。このように培養細胞ではなく生体既存の骨原性細胞の数をコントロールすることにより骨を形成させることが可能である点は、この方法の大きな利点である。

in vitro における FGF-2 の骨芽細胞系細胞分化や分裂活性へ及ぼす影響は、遺伝子発現解析を含めて詳細に報告されている。その内容を見ると、FGF-2 が骨芽細胞系細胞に対して増殖活性を高めるが、一方で骨芽細胞の発現型である I 型コラーゲンやオステオポンチン (OPN) などの骨基質をコードする mRNA の発現を抑制するというものが多い。これに対し、in vivo の研究ではその形態解析から FGF-2 が骨組織の形成を促進するという報告が多い。このように、FGF-2 は in vitro において骨芽細胞の発現型を抑制するのに何故 in vivo において骨の形成を促進する方向に働くのかという疑問が残る。この疑問に対する解答を得るためには、in vivo における詳細な遺伝子発現解析が必要であるが、これまでにそのような検討はほとんど行われていない。そこで我々は FGF2 の in vivo における骨芽細胞系細胞の遺伝子発現へ及ぼす影響の解析を行った。まず、骨形成過程にある骨膜の骨芽細胞分化マーカー、FGF 受容体 (FGFR)、転写因子 Runx2 および Osterix の mRNA の発現分布についてジゴキシゲニン標識 cRNA プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーション法により検出した。次に、レーザー顕微解剖により骨膜構成細胞のみを特異的に採取し、その細胞の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により定量した。その結果、まず rhFGF-2 を徐放した骨膜において FGFR-1, FGFR-2 および FGFR-3 は仮骨を取り囲む球状の骨芽細胞に強く発現し、rhFGF-2 の直接の影響はこの骨芽細胞へ強くおよぼされることが示唆された。さらに、FGFR を強く発現している骨芽細胞は OPN およびオステオカルシン (OC) を併せて発現しており、より成熟した骨芽細胞であることが示された。以上より、FGF-2 の作用の一つである細胞分裂誘起活性がより成熟した骨芽細胞に対して強く働いていると考えられた。また、我々の in vivo における遺伝子発現解析の結果からは rhFGF-2 が骨膜構成細胞の骨芽細胞発現型を高めることが示された。したがって、in vivo と in vitro での報告が合い反していたことは、FGF-2 が内在性のサイトカインと複雑に影響して細胞へ影響を与えている為であると考えられた。

#### 審査結果の要旨

インプラント治療、歯の移植などの欠損補綴においては、管理方法、手術手技などの検討が充分に行われ、基本的な症例選択を間違わなければ、これまでの義歯に比較して高い成功率で、より高い QOL を得ることが可能になってきている。また、これらの方法が一般化するに伴い、これまでは義歯製作においても難症例とされていた低歯槽堤症や術後の骨欠損、唇顎口蓋裂などの先天的骨欠損に対しても自家骨移植を中心としての対応策が充実しつつある。すなわち、新しい補綴手技を活かすためには健康な幅と高さを同時に持つ歯槽骨または顎骨が不可欠となり、これまでは、これらの骨の需要に対し自家骨の移植術または仮骨延長術が用いられてきた。しかし、移植術については、ドナーサイトへの侵襲が大きいことが問題であり、仮骨延長術では、長期間装置を装着する必要があるなどの問題がある。これらの問題点を改善し、新たな骨を必要としている部位に添加させることができれば、臨床的意義は非常に大きい。そのひとつの可能性として、低侵襲で生体材料を適用することで、生体が本来備えている骨再生能力を賦活することが考えられる。

本研究では、この生体材料として FGF-2 を選択したばかりでなく、それを含浸させた除放射性担体としてゼラチンハイドロゲルを用いたところに特色があり、これまでの欠損部への骨添加のみでなく、健康な骨面上への骨添加が可能であることを示しており、低歯槽堤症を中心とする難症例に対して非常に広い適応が考えられる。また、形成された骨については、組織学的に皮質骨であることから、十分な強度、固定力が得られるものと思われる。さらに、研究結果より考えて、培

養細胞ではなく生体既存の骨原性細胞の数をコントロールすることにより骨を形成させることが可能である点は、この方法の大きな利点である。

さらに、FGF-2の *in vivo* と *in vitro* での作用の違いについても言及し、これまではほとんど検討されていなかった *in vivo* における詳細な遺伝子発現解析について、骨形成過程にある骨膜の骨芽細胞分化マーカー、FGF受容体(FGFR)、転写因子 Runx2 および Osterix の mRNA の発現分布について、ジゴキシゲニン標識 cRNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により検出し、次に、レーザー顕微解剖により骨膜構成細胞のみを特異的に採取し、その細胞の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により定量した。その結果、rhFGF-2 を徐放した骨膜において FGFR-1, FGFR-2 は仮骨を取り囲む球状の骨芽細胞に強く発現し、rhFGF-2 の直接の影響はこの骨芽細胞へ強くおよぼされることが示唆された。また、FGFR を強く発現している骨芽細胞は OPN およびオステオカルシン (OC) を併せて発現しており、より成熟した骨芽細胞であることが示された。以上より、FGF-2 の作用の一つである細胞分裂誘起活性がより成熟した骨芽細胞に対して強く働いていることが示唆された。さらに、*in vivo* における遺伝子発現解析の結果から rhFGF-2 が骨膜構成細胞の骨芽細胞発現型を高めることが示され、*in vivo* と *in vitro* で作用が異なるとされる報告については、FGF-2 が内在性のサイトカインと複雑に影響して細胞へ影響を与えている為であることが考えられた。

以上、本論文は今後の歯科臨床において欠くべからざる重要な問題を取り上げ、具体的に臨床応用につながる有用性が示唆されるとともに、その基礎となる FGF-2 の働きについて、新しい手法を用いて十分な検討がなされており、学位論文としての価値を認める。