

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 RASHID MD. MAMUNUR
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第283号
学位授与の日付 平成25年9月20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 Effect of Valproic acid on bone healing in rat
(ラット骨欠損治癒におけるバルプロ酸の影響に関する研究)

論文審査委員 主査 教授 野村 修一
副査 教授 織田 公光
副査 教授 魚島 勝美

博士論文の要旨

【背景】デンタルインプラントにおいて、適切なインプラント埋入に“Top Down Treatment”や“Prosthetic driven Implant”という考え方が不可欠である。インプラント周囲の骨量・骨質はインプラント治療の成功率を左右する重要な因子であり、補綴学的観点から計画されたインプラント治療に先立ち、骨増成法が必要となるケースはしばしば見受けられる。数多くの骨増成法が臨床において行われており、それぞれ一定の成績を収めている。しかしゴールドスタンダードといわれる自家骨移植では採取量の制限や、採取部位への侵襲が問題点として存在し、骨補填材として注目され開発の進んでいる β TCPやハイドロキシアパタイトにおいても長期予後において吸収の問題がある。成長因子として添加される BMP2 や FGF12 も投与量や費用の面で臨床上十分といえる成績を上げていない。これら足場と成長因子、更に細胞成分を組み合わせた細胞工学的手法による骨増成法が様々に試みられているが、決定的な骨増成法は存在せず、新たな、信頼性、予知性の高い骨増成法の開発がいまだ求められているのが現状である。

エピジェネティック制御機構は遺伝子の転写制御によって遺伝子の発現量を調節する後遺伝学的制御機構であり、生体の発生や生殖細胞のリプログラミングにおいてみられる制御機構であり、臨床的には癌の発生機序解明や増殖制御、iPS 細胞の効率的な作成等に利用されている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) はクロマチンリモデリングにおいて、DNA とヒストン蛋白の親和性回復を阻害し、遺伝子発現制御、細胞増殖制御に関与するエピジェネティクス関連薬剤である。バルプロ酸 (VPA) は抗てんかん薬として 30 年以上臨床応用されている薬剤であるが、近年、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

(HDACi) としての機能が発見され、遺伝子発現制御や抗がん剤としての効果が注目されている。骨形成に関しては *in vitro* の実験系において Runx2 を介した骨芽細胞の分化関連遺伝子の活性化の事が知られている。しかし実験動物モデルにおける VPA 全身投与の骨形成に関する影響に関しては十分な知見が得られていない。

本研究はラット上顎骨欠損治癒モデルを用いた VPA の全身投与による骨欠損治癒促進機能について検索することを目的としており、最終的には HDACi を用いた新たな骨増成法の開発する事を目的とした研究である。

【方法】42 匹の Wistar 系ラットを実験群と対照群に分け、両群ともに 4 週齢で上顎第一、第二臼歯を抜歯、実験群においては抜歯後 3 週間後から 7 日間、腹腔内に VPA を 300 mg/kg/2times/day の濃度で投与し、対照群では生理食塩水を投与する。4 週間治癒を待ち抜歯後 4 週 (8 週齢) において第一臼歯相当部にピーソリマーにて直径 1.7 mm の円筒形骨欠損を両群に形成する。骨欠損形成後 3, 7, 14, 21 日後に標本を採取、 μ CT 画像を撮影、3 次的に再構成し、画像解析し、新生骨の骨量 (BV/TV), 骨梁幅 (Tb.Th), 骨梁間距離 (Tb.Sp) を計測した。固定、脱灰し作成した組織切片を H-E 染色し、組織学的解析により欠損治癒、新生骨形成を評価、更に血清中の ALP 活性から骨芽細胞の骨形成能について評価を行った。

【結果】実験群に対する7日間のVPA腹腔内投与による体重減少は対照群と比較して有意差を示さなかった。 μ CT画像解析よりVPA投与群では円筒形窩洞形成後7, 14, 21日後において新生骨形成量に対照群と比較して有意な骨形成量の上昇が見られた。新生骨における骨量(BV/TV), 骨梁幅(Tb.Th)は実験群において対照群と比較して有意な上昇を、骨梁間距離(Tb.Sp)は減少傾向を示した。血清中ALP活性はVPA投与群において円筒形窩洞形成後7, 14, 21日後で対照群と比較して高い値を示した。H-E染色による組織学的解析では、窩洞形成3日後で実験群の炎症性細胞は対照群と比較して減少傾向を示し、窩洞形成7日後の実験群において対照群では見られない新生骨形成像が見られた。窩洞形成14日後においては実験群、対照群ともに新生骨形成が観察されるが、形成量はVPA投与群において多く、強拡大像において、実験群では規則的な骨芽細胞様細胞類骨細胞の配向が観察されるのに対し、対照群では不規則な細胞、新生骨組織形成像が観察された。窩洞形成21日後において新生骨形成量は実験群と比較して顕著に増加し強拡大像からは実験群の規則的な配向構造を示す新生骨形成が観察された。

【考察】実験群において7日間のVPA腹腔内投与による有意な体重減少傾向が見られなかったことはVPAの有害性、全身に対する影響が比較的軽微である可能性を示唆している。大腿骨 μ CT画像解析からは実験群、対照群に有意差が見られず、異所性の骨化等も観察されなかった。VPAの投与量が抗てんかん薬として人体に投与される濃度と同等であったこと、投与期間が7日間という比較的短期間であったことが理由と考えられる。 μ CT画像解析、組織学的解析よりVPA全身投与による窩洞治癒、新生骨形成の促進が見られ、血清中のALP活性の上昇から骨芽細胞数の増加、もしくは細胞単位での活性上昇の可能性が考えられる。これまでの報告と我々の*in vitro*の実験系からVPAが骨芽細胞の分化を促進する結果が得られており、欠損治癒部位の骨芽細胞の活性化、骨形成促進に全身投与されたVPAが関与しているものと考えられるが、治癒部位に動員された細胞が近傍の骨膜、骨髄由来の細胞か、血行性に動員された遠隔骨髄由来細胞か、その細胞供給源に関しては不明であり、全身投与されたVPAが血行性に治癒部位へ直接作用したのか、治癒に関与する細胞の供給源に作用したのかその作用機序、作用機構については、さらなる研究が必要である。

【結論】本研究結果は、VPAがインプラント術前骨増成法や新たな骨増成法開発へ応用できる薬剤である可能性を強く示唆するものである。

審査結果の要旨

インプラント周囲の骨量・骨質はインプラント治療の成功率を左右する重要な因子であり、補綴学的観点から計画されたインプラント治療に先立ち、骨増成法が必要となるケースは少なくない。数多くの骨増成法が臨床応用され、それぞれ一定の成績を収めている。しかし、ゴールドスタンダードといわれる自家骨移植では、採取量の制限や採取部位への侵襲が問題点として存在し、骨補填材として注目され開発の進んでいる β TCPやハイドロキシアパタイトにおいても長期予後において吸収の問題がある。成長因子として添加されるBMP2やFGF12も投与量や費用の面で临床上十分といえる成績を上げていない。これら足場と成長因子、更に細胞成分を組み合わせた細胞工学的手法による骨増成法が様々に試みられているが、信頼性、予知性の高い骨増成法の開発が今なお求められているのが現状である。

エピジェネティック制御機構は遺伝子の転写制御によって遺伝子の発現量を調節する後遺伝学的制御機構であり、生体の発生や生殖細胞のリプログラミングにおいてみられ、臨床的には癌の発生機序解明や増殖制御、iPS細胞の効率的な作成等に利用されている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)はクロマチンリモデリングにおいて、DNAとヒストン蛋白の親和性回復を阻害し、遺伝子発現制御、細胞増殖制御に関与するエピジェネティクス関連薬剤である。バルプロ酸(VPA)は抗てんかん薬として30年以上臨床応用されている薬剤であるが、近年、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)としての機能が発見され注目されている。骨形成に関しては*in vitro*の実験系においてRunx2を介した骨芽細胞の分化関連遺伝子が活性化する事が知られている。しかし、実験動物モデルにおけるVPA全身投与の骨形成に関する影響に関しては十分な知見が得られていない。

そこで、本研究はラット上顎骨欠損治癒モデルを用いたVPAの全身投与による骨欠損治癒促進機能について検索し、最終的にはHDACiを用いた新たな骨増成法の開発することを目的としている。

42匹のWistar系ラットを実験群と対照群に分け、両群ともに4週齢で上顎第一、第二臼歯を抜歯した。実験群においては抜歯後3週間後から7日間、腹腔内にVPAを300 mg/kg/2times/dayの濃度で投与し、対照群では生理食塩水を投与した。4週間治癒を待ち抜歯後4週(8週齢)において第一臼歯相当部にピーソリーマーにて直径1.7 mmの円筒形骨欠損を両群に形成し、骨欠損形成後3, 7, 14, 21日後に標本を採取、 μ CT画像を撮影、3次元的に再構成し、画像解析し、新生骨の骨量(BV/TV), 骨梁幅(Tb.Th), 骨梁間距離(Tb.Sp)を計測した。固定、脱灰し作成した組織切片をH-E染色し、組織学的解析によって、

欠損治癒、新生骨形成を評価、更に血清中の ALP 活性から骨芽細胞の骨形成能について評価した。

実験群に対する 7 日間の VPA 腹腔内投与による体重減少は対照群と比較して有意差を示さなかった。 μ CT 画像解析より VPA 投与群では円筒形窩洞形成後 7, 14, 21 日後において新生骨形成量に対照群と比較して有意な骨形成量の上昇が見られた。新生骨における骨量 (BV/TV), 骨梁幅 (Tb.Th) は実験群において対照群と比較して有意な上昇を、骨梁間距離 (Tb.Sp) は減少傾向を示した。血清中 ALP 活性は VPA 投与群において円筒形窩洞形成後 7, 14, 21 日後で対照群と比較して高い値を示した。H-E 染色による組織学的解析では、窩洞形成 3 日後で実験群の炎症性細胞は対照群と比較して減少傾向を示し、窩洞形成 7 日後の実験群において対照群では見られない新生骨形成像が見られた。窩洞形成 14 日後においては実験群、対照群ともに新生骨形成が観察されるが、形成量は VPA 投与群において多く、強拡大像において、実験群では規則的な骨芽細胞様細胞類骨細胞の配向が観察されるのに対し、対照群では不規則な細胞、新生骨組織形成像が観察された。窩洞形成 21 日後において新生骨形成量は実験群と比較して顕著に増加し強拡大像からは実験群の規則的な配向構造を示す新生骨形成が観察された。

実験群において有意な体重減少傾向が見られなかったことは VPA の為害性、全身に対する影響が比較的軽微である可能性を示唆するものと考察している。大腿骨 μ CT 画像解析からは実験群、対照群に有意差が見られず、異所性の骨化等も観察されなかったことは、VPA の投与量が抗てんかん薬として人体に投与される濃度と同等であったこと、投与期間が 7 日間という比較的短期間であったことが理由と考えられる。 μ CT 画像解析、組織学的解析から VPA 全身投与による窩洞治癒、新生骨形成の促進が見られ、血清中の ALP 活性の上昇から骨芽細胞数の増加、もしくは細胞単位での活性上昇の可能性があると考察している。

これまでの報告と今回の *in vitro* の実験系から、VPA が骨芽細胞の分化を促進する結果が得られており、欠損治癒部位の骨芽細胞の活性化、骨形成促進に全身投与された VPA が関与していると考えられるが、治癒部位に動員された細胞が近傍の骨膜、骨髄由来の細胞か、血行性に動員された遠隔骨髄由来細胞か、その細胞供給源に関しては不明である。また、全身投与された VPA が血行性に治癒部位へ直接作用したのか、治癒に関与する細胞の供給源に作用したのかその作用機序、作用機構については、さらなる研究が必要である。

以上の様に、本研究は VPA が骨欠損治癒の促進機能を有し、インプラント術前骨増成法や新たな骨増成法開発へ応用できる薬剤である可能性を示した点に学位論文としての価値を認める。