

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名	齊 藤 悠
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 522 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Characterization of bioactive substances involved in the induction of bone augmentation using demineralized bone sheets (脱灰骨シートを用いた骨造成の誘導に関与する生理活性物質の特性) International Journal Implant Dent. doi: 10.1186/s40729-022-00449-9.
論 文 審 査 委 員	主査 教授 早 川 徹 副査 教授 小 川 匠 副査 教授 大 久 保 力 廣

内 容 の 要 旨

【緒 言】

抜歯後の骨量の増加を目的とした歯槽骨再生治療では自家骨移植や、同種骨、異種骨、人工骨などの補填材が用いられる。我々の先行研究において、ラット大腿骨を脱灰し作製したシート（脱灰骨シート）を用いて抜歯窩を被覆したところ歯槽骨の骨造成が促進され、脱灰骨に含まれる生理活性物質の作用によるものであると示唆された。我々は脱灰骨シートに含まれる生理活性物質がその機能を発揮するには、骨タンパク質中に共存する非コラーゲン性タンパク質（NCP）と相互に作用する必要があると考え、本研究では、ラット骨より調製した脱灰骨シートの石灰化誘導能の検証、脱灰骨に含まれる生理活性物質の同定、および生理活性物質との相互作用に関与する NCP の特定と機能を解析することを目的とした。

【材料と方法】

・動物実験

6 週齢ラット大腿骨を採取し、骨髓、海綿骨、骨膜の除去、超音波洗浄機とリン酸緩衝生理食塩水（PBS）による洗浄後、塩酸を用い脱灰した骨試料（DBS-P）から脱灰骨シートを作製した。また、DBS-P からグアニジンを用いて可溶性画分（G2 画分）を除去した脱灰骨シート（DBS-E）を作製した。さらに DBS-E を PBS 処理し、再度 G2 画分を混合したシート（DBS-R）と PBS のみで処理を行ったシート（DBS-C）を調製した。これら 4 種類の脱灰骨シートを用いて同種ラットへの移植実験を行い、移植 8 週後に各シートの micro-CT 撮影を行い、構造を解析した。

・生理活性物質の同定

6 週齢 SD ラット大腿骨および脛骨から調製した骨粉をグアニジンによる前処理、塩酸による脱灰、再度グアニジンによる抽出を行って可溶性画分（G2 画分）を得た。G2 画分をヘパリンアフィニティークロマトグラフィー（Hep-AFC）で分離し、電気泳動、質量分析、ヒト歯根膜由来細胞（hPDL）を用いたアルカリフォスファターゼ（ALP）活性測定と PAI-1 プロモーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、生理活性物質の同定を行った。

・生理活性物質と NCP との相互作用の検証

Hep-AFC にて得られた生理活性物質を含む画分（Hep-c）に対して質量分析法を行い、共存する NCP を特定した。さらに特定された各リコンビナント NCP を用いて生理活性物質と混合させ、混合試料をイオン交換高速液体クロマトグラフィー（IE-HPLC）で分離し、各溶出画分に対して hPDL 細胞を用いて ALP 活性を測定することで生理活性物質と NCP との相互

作用を検証した。

【結果および考察】

動物実験の結果、G2 画分を含む脱灰骨シート（DBS-P、DBS-R）は、高度に石灰化が誘導されたが、G2 画分を含まない脱灰骨シート（DBS-E、DBS-C）では石灰化が生じなかった。この結果から脱灰骨シートは石灰化誘導能を有しており、その効果は G2 画分に含まれる生理活性物質や NCP によるものと示唆された。また実験に用いたラットに移植による免疫反応が認められなかったことから、同種骨を用いた脱灰骨シートは骨補填材や吸収性メンブレンとして今後のインプラント治療に貢献できる可能性が示された。G2 画分は Hep-AFC により 5 つの画分に分離され、そのうち 3 番目の溶出画分である Hep-c は、hPDL 細胞に対する ALP 活性を上昇させた。また、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) 応答性 PAI-1 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイにおいても高い活性を示したことから Hep-c に生理活性物質として TGF- β が存在することが判明した。さらに Hep-c の電気泳動像では、分子量約 25-150 kDa に渡って酸性 NCP のバンドがいくつか観察され、質量分析にて象牙質マトリクスタンパク質 1 (DMP1)、Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)、ビグリカン (BGN) が主に特定された。これら 3 種類の NCP と TGF- β による *in vitro* 結合実験において、IE-HPLC での分析後の TGF- β 活性は、TGF- β 単体では約 11.3% の活性が残存したが、3 種類の NCP と結合させることで、その活性は約 14.7 ~ 32.7% に増加することが明らかとなった。この結果から 3 種類の NCP が TGF- β に結合することで TGF- β 活性が維持されることが示唆された。

【結 論】

本研究では、脱灰骨シートが石灰化誘導能を有すること、その作用が脱灰骨に含まれる TGF- β によること、さらに TGF- β 活性は脱灰骨中の DMP1、MEPE、BGN などの NCP と結合することで活性が維持されることを見出した。脱灰骨シートは、骨誘導因子を徐放し、定量的・定性的な骨造成を可能とするメンブレンとして、GBR 法やリッジブリザベーションなどのインプラント治療に利用できる可能性がある。今後は、シートの多孔度の測定、*in vivo* および *in vitro* での徐放時間の測定などの実験が必要であると考えられる。さらに、人工的に生理活性物質を添加した脱灰骨シートを用いて、インプラント周囲の骨造成への有効性を調べることも非常に有用であると思われるので今後検討をする予定である。

審査の結果の要旨

歯槽骨再生治療においては、自家骨、同種骨、異種骨、人工骨などの各種骨補填材が用いられている。一方、ラット大腿骨を脱灰して製作したシート（脱灰骨シート）を用いて抜歯窩を被覆したところ歯槽骨の骨造成が促進されることが見出された。本研究では、脱灰骨シートの石灰化誘導能の検証、脱灰骨に含まれる生理活性物質の同定、および生理活性物質との相互作用に関与する非コラーゲン性タンパク質 (NCP) の特定と機能を解析することを目的とした。

6 週齢ラット大腿骨を採取し、骨髓、海綿骨、骨膜の除去、次いでリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) による超音波洗浄後、グアニジンにて細胞成分を除去し、塩酸にて脱灰した骨試料 (DBS-P) から脱灰骨シートを製作した。また、DBS-P からグアニジンを用いて可溶性画分 (G2 画分) を除去した脱灰骨シート (DBS-E) を作製した。さらに DBS-E を PBS 処理し、再度 G2 画分を混合したシート (DBS-R) と PBS のみで処理を行ったシート (DBS-C) を調製した。これら 4 種類の脱灰骨シートを用いてラット皮下への移植実験を行った。その結果、G2 画分を含む脱灰骨シート (DBS-P、DBS-R) では高度に石灰化が誘導されたが、G2 画分を含まない脱灰骨シート (DBS-E、DBS-C) では石灰化が生じなかった。この結果から石灰化誘導能は G2 画分に含まれる生理活性物質や NCP によるものと示唆された。

そこで、次に大腿骨および脛骨から G2 画分を調製して生理活性物質の同定を行った結果、生理活性物質としてトランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) が、また、NCP として象牙質マトリクスタンパク質 1、Matrix extracellular phosphoglycoprotein、ビグリカンの 3 種類の存在が確認された。TGF- β と NCP との相互作用を検証した結果、3 種類の NCP が TGF- β に結合することで TGF- β 活性が維持されることが分かった。

以上、本研究では脱灰骨シートの骨補填材としての有用性および NCP の生理活性物質への相互作用について明確にすることができ GBR 法やリッジブリザベーションなどへの適応の可能性を示唆するものであり、歯科臨床へ大いに貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。