

# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者	坪井 健一郎
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教授 永原 國央 (副 査) 教授 江尻 貞一 (副 査) 教授 倉知 正和
論 文 題 目	Human parathyroid hormone (1-34) 間歇的投与の ラット骨膜細胞を用いた骨再生療法における基礎的研究
論文内容の要旨	<p><b>I. 目的</b></p> <p>歯科インプラント治療は、歯の欠損による口腔機能障害を回復する有効な手段として普及している。しかし、高度な顎堤吸収症例では、骨組織の増生が必要となる。骨組織の増生に有効な材料として臨床応用されているものは自家骨であるが、多くの症例が高齢であることから、自家骨採取のための外科的侵襲は大きな負担となる。</p> <p>こういった背景のもと、比較的容易に採取可能な骨膜に着目し、骨再生療法に応用する生体材料としての臨床応用の可能性に関する基礎的研究を行っている。</p> <p>今回、骨膜採取前の parathyroid hormone (PTH) 間歇投与が、採取した骨膜の骨芽細胞への増殖、分化に及ぼす影響を検索し、若干の知見を得たので報告する。</p>
	<p><b>II. 材料ならびに方法</b></p> <p>朝日大学動物倫理委員会の承認を得た後、5週齢 Wistar 系雄性ラット(平均体重 136±14 g)50匹を用い、実験群には human PTH (1-34) (PTH) (100 µg/kg BW) を生理食塩水に溶解したものを、対照群には同量の生理食塩水を腹腔内に投与(3回/週)し、2週後に、頭蓋骨より生検パンチにて直径 4 mm の円形状骨膜を採取した。1匹から採取可能な骨膜は平均6枚であった。採取した骨膜を 6 Well 培養シャーレ上に伸展し、乾燥させないように注意しながら 15分程度常温下にて培養シャーレ底面に自己接着させた。α-MEMを基礎培地として、10%ウシ胎子血清、ペニシリン・ストレプトマイシン 100U/mL、アスコルビン酸 (50 µg/mL) を添加した培養液中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下にて培養を行なった。培地交換は3日ごとに行ない、倒立顕微鏡にて随時細胞形態の観察を行なった。培養3, 7, 10, 14日目に培養シャーレの底面に増殖した細胞数を算定した。Alkaline phosphatase (ALP) 活性の検出にはアゾ色素法を用いた。7, 14日目において proliferating cell nuclear antigen (PCNA), runt-related transcription factor2 (RUNX2) の免疫組織学的観察を行った。また、Real Time-PCR (RT-PCR) 法を用いて bone morphogenetic protein 2 (BMP2), type I collagen (Col-I), ALP, osteonectin (ON), osteopontin (OPN), osteocalcin (OC) の mRNA 発現量の測定を行なった。有意差検定は Student's t-test を用い、p &lt; 0.05 をもって有意とした。</p>

### Ⅲ. 結果

対照群と比較し実験群では、細胞数が培養3日目から増加傾向を示し、7日目以降から14日目まで有意に増加していた。培養シャーレ全体で比較したALP活性陽性所見は、淡染された細胞の局在面積には差がみられなかったものの、濃染する細胞の局在面積は7日目以降から有意な増加を認めた。免疫組織学的所見では、PCNA陽性細胞およびRUNX2陽性細胞は共に、7日目で実験群の方が多く認められた。14日目でも同様に増加していることが認められた。RT-PCR法では7日目において、BMP2、Col-I、ALP、ON、OPN、OCのm-RNA発現量が多く、有意に増加しており、14日目では、BMP2、Col-I、ON、OPN、OCのm-RNA発現量が多く有意な増加を認めた。

### Ⅳ. 考察ならびに結論

実験群の骨膜細胞では、培養1週目および2週目で多くのPCNA陽性細胞が観察され、対照群との比較においても、有意な細胞数の増加が認められたことより、培養系での細胞増殖能が対照群よりも上昇していることが示された。実験群の培養骨膜細胞から増殖した細胞は、対照群と比較して、1週目ですでにBMP2の発現量が有意に上昇しており、またRANX2陽性細胞も多数認められることから、培養早期において対照群に比べ骨芽細胞への分化誘導が促進されていると考えられた。また、Col-I、ALP、ON、OPN、OCなど骨芽細胞の分化段階に従って発現する遺伝子がONを除き1週目に有意に発現、上昇を認めることから、PTHの間歇投与は、骨膜に存在する未分化な間葉系細胞に対し骨芽細胞への分化を培養早期に誘導していることが示された。

PTHの間歇投与は、臨床的にも骨粗鬆症の治療に期待されており、骨形成の促進が認められていることから、今回の実験において、採取した骨膜の未分化間葉系細胞の増殖能、分化能がすでに亢進していると考えられた。採取後に培養系に移すことで骨膜から増殖してくる細胞は2週目まで増加傾向にあり、また1週目からBMP2、ALP、OCの発現量が上昇し2週目まで増加傾向が認められることから、PTHの間歇投与後に採取し2週間培養した骨膜は、骨組織再生療法に応用可能な生体材料としての有用性が確認された。