

## 北海道大学博士論文の内容および審査の結果要旨（平成13年度）

氏名・(本籍)	國安宏哉(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第88号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	<b>Growth Differentiation Factor-5/<math>\beta</math>-TCP複合体によるビーグル犬前頭洞内骨形成に関する実験的研究</b>
論文審査委員	主査 教授 坂口 邦彦 副査 教授 賀来 亨 副査 教授 金子 昌幸

### 論文内容の要旨

#### [緒言]

サイナスリフト(上顎洞底挙上術)は1980年から口腔インプラント治療への応用が始まったが、いまだ移植材料には改良すべき問題点があると思われる。移植材料は自家骨、ハイドロキシアパタイト(以下、HAと略す)、凍結乾燥脱灰骨などがあるが、自家骨は骨採取部の疼痛や麻痺、HAは生体適合性、凍結乾燥脱灰骨は免疫原性などの問題がある。そして、洞内へ材料を移植してからインプラントの埋入までに、少なくとも4~6カ月の治療期間を必要とする。従来の研究において、サイナスリフトで形成した空洞内に対し、数カ月で骨を形成させる移植材料の報告は見当たらない。補綴学の観点からは、インプラント上部構造の装着までに要する治療期間を短縮することは有意義であり、洞内へ速やかに骨形成を誘導できる移植材料の開発は、臨床上重要な課題であると思われる。近年、骨誘導因子は組み換え体の大量生産が可能になり、骨形成のための薬剤として臨床応用が考えられている。そこで本研究は、異所性骨誘導活性が確認されているGrowth Differentiation Factor-5(以下、GDF-5と略す)に着目し、サイナスリフトへの応用を検討した。

GDF-5の異所性骨誘導活性は、アテロコラーゲンを担体にしたGDF-5/コラーゲン複合体をラット下腿部筋肉内ならびにラット頭部骨膜下に移植して検討した。GDF-5の異所性骨誘導は、下腿部筋肉内では10, 100 $\mu$ g/

siteで確認し、頭部骨膜下では1, 10, 100 $\mu$ g/siteで確認された(the ASBMR 21<sup>st</sup> Annual Meeting, October 1999)。この結果より、GDF-5にはサイナスリフトに応用できる十分な異所性骨誘導活性があることが示唆された。そして、ビーグル犬を使用し、サイナスリフトを想定したGDF-5/コラーゲン複合体による前頭洞内骨形成実験を行った結果、300, 1000 $\mu$ g/siteのGDF-5で洞内挙上部位に、移植2カ月後で既存骨と連続した新生骨の形成が観察された。移植3カ月後では2カ月に比較して、形成骨組織に観察される梁状部分が太く発達し、リモデリングが進んでいる状態が観察されたものの、洞内挙上部位の形成骨量は縮小傾向を示し、インプラントを埋入するための場を確保する必要があることが判明した。そこで、場を確保することに加えて、生体がHAを生成しやすい環境を設定するためにカルシウムとリンを含有し、生体内で吸収される $\beta$ -tricalciumphosphate(以下、 $\beta$ -TCPと略す)を担体としたGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体によるビーグル犬前頭洞内骨形成実験を行った。

#### [材料および方法]

実験動物は体重10~12kg、生後約2年のビーグル成犬を使用した。実験部位は左右の前頭洞とした。移植材料はrhGDF-5(MP52, BIOPHARM社)を担体である $\beta$ -TCP(Gerontcare社)にコーティングしたGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体(以下、複合体と略す)を使用した。 $\beta$ -TCPの粒径は0.5~1.0mm、複合体は1g当たり500 $\mu$ gの

rhGDF-5を含有する。実験は2gの複合体、すなわち、1000 $\mu$ g/siteを移植した。左右前頭洞はラウンドバーを使用して、注水下、800rpmの低速回転で開窓部を形成した。そしてサイナスリフトの術式に従って作成した洞粘膜挙上部に対し、複合体を滅菌生理食塩水に浸した状態でBONETITE注入器(三菱マテリアル社)を使用して移植した。対照側は $\beta$ -TCPのみを滅菌生理食塩水に浸した状態で移植した。開窓部は骨片と孔径0.5 $\mu$ mのPTFE膜(Millipore社)にて閉鎖した。移植後、2週、4週、8週、12週で、チオベンタールの過量投与にて屠殺し、頭頸部灌流固定を施して試料を摘出した。試料は脱水後に樹脂包埋し、非脱灰研磨標本を作成した。組織は塩基性フクシン・メチレンブルー重染色で観察した。

### [結 果]

GDF-5/ $\beta$ -TCP複合体によるビーグル犬前頭洞内骨形成実験の結果、複合体を移植した2週後の実験側において、開窓部付近から既存骨と連続した骨組織が観察され、複合体と複合体の間に類骨様組織の侵入が観察された。対照側においても実験側と同様に開窓部付近から既存骨と連続した骨組織が観察されたが、 $\beta$ -TCP顆粒間への細胞の侵入はほとんど認められなかった。

4週後、実験側において、複合体を移植した部位は、その周囲から骨様組織の形成が観察された。また、対照側は実験側に比較して、移植した $\beta$ -TCPの顆粒と顆粒の間隔が狭く、凝縮された状態が観察された。

8週後、実験側は既存骨と連続した骨組織で満たされ、担体の $\beta$ -TCPは挙上部内の中心部に認められる程度にまで吸収が進んでいた。対照側では開窓部付近から骨組織が観察されたが、 $\beta$ -TCP顆粒の大半は吸収されずに残存していた。

12週後、実験側は4週、8週後と同様にGDF-5によって誘導されたとされる骨組織が観察され、単体はある $\beta$ -TCPの吸収はさらに進んでいた。形成骨組織は、既存骨と連続し、梁状部分に太く発達していた。複合体を移植した12週後では8週後と比較して、移植部位の形成骨量に縮小傾向が認められた。対照側は挙上部内の中央部に、8週後の対照側では見られなかった骨組織の形成が確認された。

## 学位論文審査の要旨

インプラント補綴の観点より、高い骨誘導能を有する生体材料の開発は、上部構造装着までの期間を短縮できるため、臨床で非常に有意義と思われる。特に、Sinus

### [考 察]

GDF-5の異所性骨誘導活性はラット背部皮下では全く確認されず、筋肉内と骨膜下では確認されたが、筋肉内では異所性骨誘導活性は骨膜下よりも低かった(the ASBMR 21<sup>st</sup> Annual Meeting, October1999)。これに対して、BMP-2の異所性骨誘導活性はラット背部皮下においても確認されることが報告されている。以上のことより、GDF-5とBMP-2の異所性骨誘導活性は異なることが判明した。近年、GDF-5のレセプターは、軟骨、骨、腱、靭帯、関節部位に存在し、皮膚、内臓などには存在しないことが報告され、このことは先の結果と一致する。したがって、本研究で使用したrhGDF-5は骨、靭帯、関節の治療を対象とした場合に、その骨誘導活性を利用できる可能性が示唆された。そして、GDF-5の歯科領域における応用としては、サイナスリフトの移植材料として使用することが有効であると考えられる。

本実験はサイナスリフトを想定し、GDF-5/ $\beta$ -TCP複合体によるビーグル犬前頭洞内の骨形成を検討した。本実験モデルは上顎洞ではないため、サイナスリフトの完全な再現とは言い難いが、前頭洞も生体内の副鼻腔であること、ヒトの術式に従って手術を行えること、手術の再現性などの理由から、サイナスリフトを想定した評価モデルとして有用と思われる。また、複合体の担体を使用した $\beta$ -TCPは洞挙上部内における骨形成の場の確保に有効であり、吸収の速度も適切であると思われた。従来より、骨形成過程において骨芽細胞がコラーゲンを合成後にアルカリホスファターゼを分泌し、これが周囲のリン酸エステルを加水分解し、リン酸が生成され、このリン酸とカルシウムイオンが結合することによってHAが生成すると考えられている。本実験で使用した $\beta$ -TCPは、これが溶解することでリンとカルシウムが周囲組織に拡散し、GDF-5で誘導される骨形成に影響を及ぼす可能性が考えられる。

### [結 論]

本実験結果より、GDF-5/ $\beta$ -TCP複合体は従来のサイナスリフトの移植材料と比較して、より速やかに洞挙上部内の骨形成を誘導する材料であることが推察され、その臨床応用の可能性が示唆された。

Liftを応用したインプラント治療において、短期間かつ安全に骨を形成させる移植材料の使用は、インプラントによる口腔機能を速やかに回復することが可能になる。

Sinus Liftを行った場合、術後の治癒期間は少なくとも4～6カ月を必要とし、さらに、インプラントを埋入した後の免荷期間は6カ月以上が必要であるため、インプラントによる口腔機能の回復までに要する期間は、一般に1年以上とされている。

従来より、異所性に骨と軟骨を誘導する活性を有する骨形成タンパクは、この異所性骨誘導活性を薬理活性として捉え、歯科領域に応用することが考えられている。近年、BMP-2・7、GDF-5の組み換え体が大量生産可能となり、骨再生治療の薬剤として、その臨床応用は現実のものになりつつある。そこで本研究は、rhGDF-5のSinus Lift移植材料への臨床応用の可能性を検討する目的で、ラットにrhGDF-5を移植して異所性骨誘導活性を組織学的に検討、次にビーグル犬をSinus Liftを想定した実験モデルとし、前頭洞内にrhGDF-5を移植しその担体、骨形成状態について組織学的に検討を行い、以下の結果を得た。

1. ラットにおいてrhGDF-5が誘導した骨形成は筋肉内と骨膜下で確認され、その濃度に依存した異所性骨誘導活性があることが明らかになった。
2. rhGDF-5は、ビーグル犬前頭洞内に対して骨形成が

可能であった。

3. 担体にコラーゲンをを用いた場合には、骨形成の場を確保する必要性が考えられた。
4. rhGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体は、前頭洞内移植後1週間で幼若な骨組織が観察され、2週間で既存骨と連続した新生骨組織が観察された。
5. 生体内吸収性材料である $\beta$ -TCPは骨形成の場を確保するのに有効であった。

本研究結果より、rhGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体は、ヒト上顎洞内に対して、速やかに骨形成を誘導できることが推察された。rhGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体は、従来からSinus Liftに使用されている自家骨、ハイドロキシアパタイト、凍結乾燥脱灰骨などの移植材料に比較して、骨採取や感染の危険性が無く、大量生産が可能であり、骨形成の場を確保できるため、従来のSinus Liftの問題点を解決する移植材料として、臨床応用の可能性が示唆された。

本研究は、骨誘導因子の基礎研究とその臨床応用において有益な貢献をし、歯科医学における骨組織再建の発展に寄与するところが大きい。

審査の結果、本論文は博士（歯学）の学位論文に値すると判定した。

氏名・(本籍)	小林 徳 栄 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第89号
学位授与の日付	平成13年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	マウス退縮型線維肉腫細胞の炎症による悪性化進展におけるサイモシン $\beta$ 4の役割
論文審査委員	主 査 教 授 有 末 眞 副 査 教 授 田 隈 泰 信 副 査 教 授 東 城 庸 介

## 論文内容の要旨

### 【緒 言】

口腔癌を含むヒト主要臓器の発癌要因に炎症の関与が、明らかにされつつある。今回、炎症がどのような機構で発癌、そしてその後に続く癌細胞の悪性化進展を促進するのかを明らかにするために、すでに確立されてい

るマウス退縮型線維肉腫細胞の炎症による悪性化進展モデルを用いて、悪性化に伴い発現増強する遺伝子の解析を行った。既に、differential display法を用いて炎症により悪性化進展した癌細胞には、サイモシン $\beta$ 4、カルサイクリン、ヴィメンチンの3つの遺伝子が、発現増強する予備成績を得た。そこで、この3つの遺伝子について