

論文の内容の要旨

氏名 舘野 敦

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名 ラット臨界骨欠損への dedifferentiated fat cells と I 型コラーゲン組換えペプチドの移植効果

顎顔面領域の骨欠損は外傷、腫瘍切除あるいは遺伝性疾患などを原因としており、機能的および整容的な問題がある。上下顎骨における骨欠損はしばしば歯の欠損を伴い、その修復は口腔機能の回復にとって極めて重要な問題である。顎骨欠損の修復には、自家骨移植が多く用いられてきた。しかし、移植片の大量採取が困難なため、広範な顎骨欠損に対してはより有効な方法の検討が必要である。一方、顎骨欠損修復には hydroxyapatite や beta-tricalcium phosphate などの骨補填材が多用されている。骨修復において最も重要な細胞外マトリックスは骨を構成する I 型コラーゲンだが、分子内に多くの Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を有している。この配列は生体内の細胞表面に発現しているインテグリンに結合することが明らかとなっており、骨増生に有効であることが報告されている。本研究では新規開発された recombinant peptide (RCP) という RGD 配列を 12 個有する新規骨填材と脂肪組織から分離された脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT cell) の併用が骨再生に及ぼす影響について検討した。

DFAT 細胞および脂肪細胞由来幹細胞 (adipose-derived stem cell: ASC) は 10 週齢の F344/Jcl 雄性ラット (200 ± 10 g) から従来より報告されている方法に従って分離し、ラット下顎骨欠損部への移植に用いた。RCP ブロック足場と細胞複合体 (DFAT 細胞または ASC) の調製は、500 μL の細胞懸濁液 (2 × 10⁶ 細胞/mL) を RCP 上に播種し、600 × G で 5 分間遠心分離後 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 6 時間インキュベートすることにより作製した。

臨界骨欠損の作成は以前の報告 (Fan J et al. 2014) に従って行った。すなわち、F344/Jcl 雄性ラットをイソフルラン (5% 導入, 2% 維持) 吸入により全身麻酔を施し、右下顎骨の下縁に沿って皮膚切開を加え、下顎骨の頰側表面を覆っている咬筋および骨膜をフラップとして反転させた。切歯後方下顎骨下縁をインバーテッドコーンバーを用いて切削し 4 × 3 × 1 mm の骨欠損を作成した。欠損部に各材料を移植した。移植部を Bio-Gide 膜 (Geistlich Pharma) で被覆後、咬筋を復位させ、非吸収性縫合糸により縫合し閉創した。新生骨の形成状況をマイクロ CT 撮影装置 (R_mCT; 株式会社リガク) を用いて経時的に撮影し解析した。また術後 8 週において下顎骨を摘出し 10% 中性緩衝ホルマリンにより固定後、パラフィン切片を作製し、H & E 染色により組織学的解析を行った。4 群の構成は以下のとおりである。

- (1) 対照群：骨欠損を作成し、そのまま縫合した群
- (2) RCP 単独群：RCP ブロック足場のみを移植した群
- (3) ASC/RCP 群：ASC を播種した RCP ブロック足場を移植した群
- (4) DFAT/RCP 群：DFAT 細胞を播種した RCP ブロック足場を移植した群

RCP の DFAT に対する直接的な効果を判定する目的で、上記により得られた DFAT 細胞に RCP を作用させ、osteocalcin 及び osterix 遺伝子の発現変化について real-time PCR により検討を加えた。すなわち 3.2 × 10⁵/6 well plate に調製した DFAT 細胞に対し、骨芽細胞分化誘導培地 (100 nM デキサメタゾン, 10 mM β-グリセロリン酸 (Sigma-Aldrich), 50 mM L-アスコルビン酸 (Wako) を添加した増殖培地) を用いて RCP を 400 倍に希釈し添加した。細胞を 3 日間培養した後 total RNA を抽出し、complementary DNA (cDNA) を作製し、real-time PCR に供した。

実験の結果、骨新生は、移植後 4 週間で全ての群の欠損部位に明確に観察された。このとき、DFAT/RCP 群の新生骨量は ASC/RCP 群および RCP 単独群よりも多かった。さらに、新成された骨組織は、DFAT/RCP 群において 6 週後に近心側で、8 週後で近心側と遠心側の両方で既存の皮質骨に結合した。これに対して、対照群、RCP 単独群および ASC/RCP 群では、DFAT/RCP 群に比べ、8 週時点で新生骨量が少なかった。新生骨量を、マイクロ CT 画像を用いて定量したところ、DFAT/RCP 群における新生

骨量は6週ではASC/RCP群よりも有意に多く、8週ではRCP単独群およびASC/RCP群よりも多かった。またH&E染色標本による組織学的解析を行ったところ、DFAT/RCP群において骨欠損領域全体が新生骨により満たされていたのに対し、ASC/RCP群、RCP単独群および対照群においては、新生骨の形成は認められたものの、DFAT/RCP群と比較して少量であった。また、RCPのDFAT細胞に対する効果をreal-time PCRにより判定した実験では、RCP処理により、コントロールと比較して*osterix*が約5倍の発現増強を示したのに対し、*osteocalcin*ではむしろ発現が減少する傾向を示した。

以上の結果、新規開発されたRCPはDFAT細胞と併用することにより、骨再生を有意に誘導することが明らかとなった。