

論文の内容の要旨

氏名：北澤 伊

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Carbonate apatite increased osterix and BMP2 gene expressions and TNF- α and IL-6 reduced alkaline phosphatase activities via bone-related transcription factors in osteoblast-like cells

（炭酸アパタイトはオステリクスおよび骨形成タンパク質 2 遺伝子の発現を増加させ TNF- α および IL-6 は骨関連転写因子の発現を抑制し骨芽細胞様細胞でのアルカリホスファターゼ活性を減少させる）

抜歯窩を放置すると歯槽骨吸収が生じ、インプラント埋入が困難になるため、歯槽堤の高さと幅の保持のために抜歯窩への骨移植が行われる。炭酸アパタイト (CO₃Ap) 顆粒を用いた上顎洞底挙上術により、インプラント埋入に必要な骨高径が獲得でき、X 線および組織学的に上顎洞底挙上術における CO₃Ap 顆粒の有効性と安全性を解析した結果、生体適合性に優れた材料であることが報告された。骨移植部位からインプラント埋入時に歯槽骨を採取して遺伝子発現を解析すると、ハイドロキシアパタイトまたは β リン酸三カルシウム (β -TCP) 移植部位と比べて、脱タンパク質ウシ骨ミネラル移植部位では、骨芽細胞の分化や骨形成に関与する転写因子である RUNX 関連転写因子 2 (RUNX2) の発現量が亢進していた。以上の結果から、骨移植材は転写因子の発現を増加させることが示唆された。骨芽細胞の分化と骨形成には、RUNX2 以外にも distal-less homeobox 5 (DLX5) や Osterix (SP7/OSX) などの転写因子も重要な働きをしている。歯周病に関連する炎症性サイトカインには、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) およびインターロイキン-6 (IL-6) があり、IL-1 β は歯根膜幹細胞 (PDLSC) の骨形成能の阻害、TNF- α はオステオカルシン (OC) タンパク質量の減少、IL-6はアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の抑制に関与することが報告されており、炎症性サイトカインは、骨関連タンパク質の遺伝子発現の抑制や骨形成能の阻害を引き起こすことが示唆されている。本論文は、研究 1 で、抜歯窩への骨移植後の骨芽細胞関連遺伝子およびタンパク質発現に対する CO₃Ap の影響を解析し、研究 2 で、Saos2 ヒト骨芽細胞様細胞における骨関連転写因子の発現に対する炎症性サイトカインの影響を解析した。

研究 1 の対象患者は 31 名 (31 部位) で、既存骨から骨を採取したコントロール群の患者は 13 名 (男性 7 名、女性 6 名) で平均年齢は 58.4 \pm 12.5 歳、CO₃Ap 移植群の患者は 18 名 (男性 6 名、女性 12 名) で平均年齢は 60.7 \pm 17.8 歳であった。歯槽骨の垂直的高径、頬側骨の厚さおよび骨吸収率を評価するために、抜歯窩への CO₃Ap 移植後とインプラント埋入前にコーンビーム CT (CBCT) 撮影を行い、骨吸収率を計算した結果、CO₃Ap 移植部位の骨吸収率は 7.15 \pm 3.79%であり、過去の報告での β -TCP の吸収率 (17.5%) と脱タンパク質ウシ骨ミネラルの吸収率 (1%) の中間値を示した。インプラント埋入時に、既存骨または CO₃Ap 移植部位から骨を採取し、RUNX2、SP7/OSX、骨形成タンパク質 2 (BMP2)、BMP7 および血小

板由来成長因子 B (PDGFB) の mRNA 量をリアルタイム PCR で解析した結果, CO₃Ap 移植部位で, SP7/OSX および BMP2 の mRNA の発現量が既存骨と比較して有意に増加した。ヘマトキシリンエオジン染色と RUNX2 抗体, SP7/OSX 抗体, 間葉系細胞の中間径フィラメントである vimentin 抗体および上皮細胞の中間径フィラメントである cytokeratin 抗体を使用して免疫染色を行った結果, 移植した CO₃Ap の類骨への置換が観察され, 骨芽細胞様細胞が SP7/OSX 抗体と vimentin 抗体によって染色された。

研究 2 では, Saos2 細胞を IL-1 β , TNF- α または IL-6 で 12 および 24 時間刺激し, 3 種類の骨関連転写因子 (RUNX2, DLX5, SP7/OSX) の mRNA とタンパク質発現量の変化, アルカリホスファターゼ (ALP) mRNA 量と ALP 活性の変化を解析した。Saos2 細胞を IL-1 β (1 ng/ml) で 12 および 24 時間刺激すると, DLX5 mRNA およびタンパク質量は有意に増加した。TNF- α (10 ng/ml) で 12 および 24 時間刺激すると, RUNX2, DLX5, SP7/OSX の mRNA 量およびタンパク質量を抑制し, ALP の mRNA 量を抑制した。IL-6 (10 ng/ml) で 12 および 24 時間刺激すると, DLX5 と SP7/OSX の mRNA およびタンパク質量は抑制され, 24 時間刺激により ALP の mRNA 量は減少した。Saos2 細胞の ALP 活性に対する IL-1 β (1 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) または IL-6 (10 ng/ml) の影響を解析した結果, TNF- α と IL-6 で 3 日 (72 時間) 刺激すると, ALP 活性は有意に減少した。

抜歯窩への CO₃Ap の移植により SP7/OSX と BMP2 の遺伝子発現が有意に増加した。免疫染色の結果, 骨芽細胞様細胞で SP7/OSX の発現増加が認められ, BMP 経路の関与が示唆された。炎症性サイトカインである TNF- α は, RUNX2, DLX5, SP7/OSX, IL-6 は DLX5 と SP7/OSX の mRNA およびタンパク質発現を抑制し, TNF- α と IL-6 は, Saos2 骨芽細胞様細胞の ALP 活性を抑制した。以上の結果から, CO₃Ap は SP7/OSX および BMP2 の遺伝子発現を増加させ骨形成を促進した。また, 骨形成過程での炎症反応, 特に TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの増加を抑制する必要性が示唆された。