

## 論文審査の結果の要旨

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- $\alpha$  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- $\alpha$  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）

審査委員：（主査） 日本大学教授 博士(理学) 吉垣 純子

（副査） 日本大学教授 歯学博士 小方 頼昌

日本大学教授 博士(歯学) 平塚 浩一

インプラント治療にあたって、抜歯窩の放置は歯槽骨吸収を招きインプラント体の埋入が困難になるため、歯槽堤の高さと幅を保持するために抜歯窩への骨移植が行われる。炭酸アパタイト (CO<sub>3</sub>Ap) 顆粒を用いた上顎洞底挙上術は、インプラント埋入に必要な骨高径を獲得し、X 線および組織学的に上顎洞底挙上術における CO<sub>3</sub>Ap 顆粒の有効性と安全性の解析の結果、生体適合性に優れていることが報告された。インプラント埋入時に骨移植部位から採取した歯槽骨の遺伝子発現を解析すると、脱タンパク質ウシ骨ミネラルの移植や、ハイドロキシアパタイトまたは  $\beta$  リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) のような人工骨移植はいずれも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) の発現量を亢進したものの、ウシ骨ミネラルの方が RUNX2 の発現が高く、これらの人工骨にはまだ改善の余地があると考えられた。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) などの転写因子が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 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) およびインターロイキン-6 (IL-6) があり、IL-1 $\beta$ は歯根膜幹細胞 (PDLSC) の骨形成能の阻害、TNF- $\alpha$ 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 CO<sub>3</sub>Ap 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 の対象部位は 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, CO<sub>3</sub>Ap 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 CO<sub>3</sub>Ap 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、CO<sub>3</sub>Ap 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  $\beta$ -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 CO<sub>3</sub>Ap 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, CO<sub>3</sub>Ap 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 CO<sub>3</sub>Ap 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 $\beta$ , TNF- $\alpha$  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) の mRNA 量と ALP 活性の変化を解析した。Saos2 細胞を IL-1 $\beta$  (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- $\alpha$  (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 (10ng/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 $\beta$ , TNF- $\alpha$  または IL-6 の影響を解析した結果, TNF- $\alpha$  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 CO<sub>3</sub>Ap の移植により SP7/OSX と BMP2 の遺伝子発現が有意に増加し, 免疫染色の結果から, 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- $\alpha$  は, RUNX2, DLX5 および 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- $\alpha$  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, CO<sub>3</sub>Ap は SP7/OSX および BMP2 の遺伝子発現を増加させ骨形成を促進することが明らかとなった。また, 骨形成過程では, 特に TNF- $\alpha$  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。

本研究の結果, CO<sub>3</sub>Ap は骨関連転写因子である SP7/OSX および骨形成を誘導する BMP2 の遺伝子発現を増加させ骨形成を促進すること, 骨形成過程では, 特に炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6 等の増加を抑制することの必要性が明らかになった。これらの研究成果は, 歯周病およびインプラント治療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は, 博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 年 月 日