



Title	Dentin Matrix Protein 1添加Ⅰ型アテロコラーゲンゲルを用いた新規骨再生材料の開発について
Author(s)	香川, 良介
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49777
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【16】

氏 名	香 川 良 介
博士の専攻分野の名称	博 士（歯 学）
学 位 記 番 号	第 2 2 8 3 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	Dentin Matrix Protein 1 添加 I 型アテロコラーゲンをを用いた新規 骨再生材料の開発について
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 前田 芳信 （副査） 教 授 豊澤 悟 講 師 斉藤 正寛 講 師 上松 節子

論 文 内 容 の 要 旨

非コラーゲン性骨基質タンパク質の一つである Dentin Matrix Protein1 (DMP1) は、強力な Ca^{2+} 結合能により生体内で石灰化作用を有すると考えられている。すなわち、DMP1 は多くの酸性アミノ酸を含むため pH 中性領域の生体内では負に荷電し、加えて、骨細胞が産生するカゼインキナーゼ (CK) によりリン酸化を受けてさらに負に強く荷電するため、強力な Ca^{2+} 結合能を有するようになると考えられている。実際、その石灰化作用は DMP1 組み換えタンパク質を用いた *in vitro* の石灰化実験でも報告されている。一方、骨基質タンパク質の約 9 割を占める I 型コラーゲンは、非コラーゲン性骨基質タンパク質の添加により石灰化して、骨形成の主役となることが知られている。この I 型コラーゲンの石灰化は、最初に I 型コラーゲンのホールゾーンから始まることが知られており、近年、そのホールゾーンに DMP1 が結合することが報告された。従って、強力な Ca^{2+} 結合能を

有し、I 型コラーゲンのホールゾーンへ結合する DMP1 は、I 型コラーゲンの石灰化、すなわち骨形成に関与すると考えられる。

本研究では、上記の生体における骨形成過程を模倣して、I 型コラーゲンに DMP1 を添加した場合の、*in vivo* における DMP1 の骨形成能を評価し、新規骨再生材料としての応用の可能性を検討した。

【材料と方法】

1：I 型アテロコラーゲンゲルを足場とした骨再生モデルの作製

4 週齢 Wistar 系雄性ラット頭蓋骨にインプラント用トレフィンバーを用いて直径 3mm の骨欠損を作製し、I 型アテロコラーゲンゲルを填入後、コラーゲン膜にて被覆し、創部を閉鎖した。術後 1,2,3,4 週に、4%パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液による灌流固定後、頭蓋骨を取り出し 10% EDTA 溶液にて低温脱灰した。パラフィン包埋し、前頭断切片を作製後、HE 染色および免疫染色による組織学的手法により検討を行った。

2：DMP1 過剰発現マウスを用いた骨再生の検討

口腔病理学教室にて作製された骨芽細胞特異的に DMP1 を過剰発現させたマウス(Tg)、および野生型マウス(Wt)の頭蓋骨に直径 2mm の骨欠損を作製し、上記の骨再生モデルと同様に I 型アテロコラーゲンゲルを填入して、術後 1,2,3,4 週の再生骨量を検討した。骨再生量の評価は HE 染色にて欠損部内の組織学的に骨と認められる領域を等倍で撮影したコンピュータ画像上で抽出し、その面積を比較した。

3：組換えラット DMP1（組換え rDMP1）の作製、およびリン酸化の検討

発現ベクター（pGEX-6P-1）を用いて大腸菌に発現させた組換え rDMP1 をカラムにて回収した。また、Phos-tag®を用いて組換え rDMP1 の CKII によるリン酸化の検出を行った。

4：組換え rDMP1 添加 I 型アテロコラーゲンゲルを用いた骨再生の検討

上記 1 の骨再生モデルにおいて、作製した骨欠損部に組換え rDMP1 添加 I 型アテロコラーゲンゲル(100 μ g/ml)、およびコントロール群として I 型アテロコラーゲンゲルのみの填入を行った。術後 1,2,3,4 週に、再生骨量を組織学的手法および μ CT を用いた二つの計測方法により検討した。

【結果と考察】

1：骨再生モデルにおいて、填入された I 型アテロコラーゲンゲルは生体内で炎症反応、および異物反応を示すことはなかった。また、I 型アテロコラーゲンゲル内部への血管侵入が観察され、その周囲には骨芽細胞への分化が観察された。さらに、填入された I 型アテロコラーゲンの吸収像は観察されず、石灰化してそのまま骨形成に利用されたと考えられた。

2：DMP1 過剰発現マウスを用いた骨再生モデルにおいて、Wt 群と比較して Tg 群では骨再生部における DMP1 の産生亢進が免疫染色にて確認された。また、術後 2 週において、

Tg 群では骨再生量に有意な増加が認められた。このことから I 型アテロコラーゲンゲルに DMP1 が添加されることにより骨形成が促進することが示された。

3：大腸菌を用いて作製した rDMP1 は、生体内で産生された DMP1 と同様に、CK によりリン酸化されることが確認された。従って、組み換え rDMP1 も生体内で CK によるリン酸化を受けることにより、強力な Ca^{2+} 結合能を有し、石灰化を促進すると考えられる。

4：組換え rDMP1 添加群では、術後 1,2 週において、コントロール群と比較して骨再生量が有意に増加していた。術後 3,4 週では骨再生量はほぼ一定の値となり、両群間に有意な差は認められなかった。また、 μ CT を用いた骨再生量の計測結果においてもほぼ同様の結果が得られた。従って、生体内で産生された DMP1 と同様に、組換え rDMP1 を I 型アテロコラーゲンゲルに添加しても骨形成速度が促進することが示された。

【結論】

DMP1 を I 型コラーゲンに添加することにより、骨再生における骨形成を促進することが分かり、組換え rDMP1 添加 I 型アテロコラーゲンゲルは新規骨再生材料として有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は骨基質の約 9 割を占める I 型コラーゲンと非コラーゲン性骨基質である Dentin Matrix Protein 1(DMP1)を用いた骨再生材料について検討を行ったものである。

その結果、担体として用いた I 型コラーゲン（アテロコラーゲンゲル）は直接骨再生に利用され、さらに石灰化促進能を有する DMP1 を添加することにより骨再生が促進されることが明らかとなった。

以上の研究結果は、骨基質タンパク質のみからなる新規骨再生材料の開発を行う上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認め