

Title	Dentin Matrix Protein 1添加I型アテロコラーゲンを 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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文につ いて 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【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 22838 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(100μg/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μCT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Ca²⁺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、μCT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られる。