



Title	塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織及び歯槽骨の再生促進作用
Author(s)	永安, 利江
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56124
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (永安 利江)

論文題名 塩基性線維芽細胞増殖因子による歯周組織及び歯槽骨の再生促進作用

論文内容の要旨

【研究目的】

塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; FGF-2) は、歯根膜細胞の増殖及び遊走、骨髄に存在する骨芽細胞の前駆細胞の増殖を亢進することで投与部位における歯周組織再生を促進すると考えられている。しかしながら、FGF-2が歯周組織の再生を誘導する作用機序に関しては、*in vitro*で観察された複数の情報を根拠にした推察に留まっており、実際の生体でどのように歯周組織の再生がもたらされるのかについては十分に検討されていなかった。そこで、本研究では、FGF-2の歯周組織再生作用の機序を*in vivo*にて詳細に解析するため、イヌ3壁性歯周組織欠損モデルを作製し、再生初期段階における欠損部の新生組織量、増殖性細胞数及び血管新生並びに新生組織における骨形成関連遺伝子の発現を経時的に評価した。

また、FGF-2の優れた歯槽骨再生促進作用から、インプラント治療、特に埋入時に既存骨との接着が少ない初期固定不良インプラントに対する応用の可能性が期待された。そこで、初期固定不良インプラントモデルを作製し、osseointegration及びインプラントの安定性に対するFGF-2の作用を*in vivo*にて検討した。

【材料および方法】

1) イヌ3壁性歯周組織欠損モデルにおけるFGF-2の歯周組織再生促進作用の作用機序解析

欠損作製領域確保のため、全身麻酔下にて、下顎両側第4前臼歯を抜去した。抜歯後3ヵ月目に下顎両側第1後臼歯 (M1) 近心部の歯肉弁を形成し、同部に3壁性歯周組織欠損 (頬舌幅3 mm×近遠心幅5 mm×深さ4 mm) を作製した。FGF-2群の欠損部には0.3% FGF-2含有ハイドロキシプロピルセルロース (HPC) 製剤を、対照群にはHPC単独の対照製剤を投与し縫合した。投与後3、7、14及び28日目に欠損部を含む歯周組織を採取し、組織標本作製した。欠損内に形成された新生組織量を計測するとともに、抗proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を用いた免疫染色を実施し、増殖性細胞 (PCNA陽性細胞) 数を定量した。また投与後7及び14日目に欠損内に形成された新生組織を採取し、Real-time PCRにてBone morphogenetic protein-2 (BMP-2)、Osterix、alkaline phosphatase (ALP) 及びOsteocalcinのmRNAの発現量を評価した。

2) イヌ初期固定不良インプラントモデルにおけるFGF-2の安定性促進作用の検討

下記手順にて、実験1及び2を実施した。下顎両側第3及び4前臼歯 (実験1) もしくは第4前臼歯のみ (実験2) を抜去し、抜歯窩に新生骨が形成されたのを確認した後、下顎両側の第2もしくは3前臼歯遠心部からM1近心部にかけて歯肉弁を形成した。同部に直径3.7 mmの埋入窩を形成した (実験1: 2ヵ所/片側・計4ヵ所、実験2: 1ヵ所/片側・計2ヵ所) 後、0.3% FGF-2 HPC製剤もしくは対照HPC製剤を投与した。インプラントの初期固定力を低下させるため、埋入窩より直径が小さく、既存骨との接着が少ない陥凹したカスタムインプラントを埋入した。実験1では、インプラント埋入後4、8及び12週目にインプラントを含む組織ブロックを採取し、研磨標本作製した。埋入後4及び8週目では、インプラントの陥凹部を計測領域に設定し、計測領域における新生骨面積率及び骨接着長率を算出した。埋入後12週目では走査電子顕微鏡を用い、新生骨とインプラントの境界面を観察した。実験2では、インプラント安定性の指標として共振周波数解析から算出されるImplant Stability Quotient (ISQ) 値を埋入後16週間にわたり経時的に測定した。

【結果】

1) 対照群の欠損部は、投与後3日目、出血巣で占められ、投与後7日目でも辺縁部に肉芽組織が僅かに形成されるのみであった。投与後14日目になると、出血巣は退縮し、肉芽組織及び線維性結合組織が形成され、辺縁部には新生骨が観察された。投与後28日目には、欠損部に凹状に新生骨が形成され、歯根面では僅かな新生セメント質及び歯根膜が観察された。一方、FGF-2群では、投与後3日目、対照群に先立って、極軽度の肉芽組織形成が辺縁部で観察された。投与後7日目には、対照群に比べ、肉芽組織及び線維性結合組織が広範囲に形成され、新生骨形成も辺縁部で認められた。さらに血管が占める面積も増加した。投与後14日目には、新生骨が欠損部の全域を占め、投与後28日目には新生骨面積、新生セメント質及び歯根膜長は、対照群と比較し、FGF-2群で高値を示した。以上のことから、FGF-2により投与後早期に新生組織の形成が促進されることが、最終的な再生歯周組織量の増大をもたらすと考えられた。次に、PCNA陽性細胞の分布を観察した。PCNA陽性細胞は、既存骨及び歯根膜から出現し、欠損部全体へと広がっていくこと、FGF-2の局所投与により細胞の早期出現及び総数の増加が起こることが明らかとなった。これらPCNA陽性細胞は、その出現部位から骨髄及び歯根膜由来の線維芽細胞様細胞であると考えられた。さらに、FGF-2の局所投与によりBMP-2、Osterix、ALP、OsteocalcinのmRNAの発現が上昇した。これらの結果より、FGF-2の局所投与は、BMP-2の産生を介し、骨芽細胞への分化を誘導することで、新生骨形成を促進する可能性が示唆された。

2) 実験1の組織学的形態計測において、埋入後4週目のFGF-2群の新生骨面積率及び骨接着長率は、対照群に対して有意に高値を示した。特に、既存骨から遠い領域で対照群とFGF-2群の差が大きく、FGF-2の作用は、骨形成が遅れる領域においてより顕著に発揮されることが明らかとなった。また、埋入後4週目のFGF-2群の新生骨面積率は、埋入後8週の対照群とほぼ同程度であったことから、FGF-2群では早期に骨形成が起こったと考えられた。埋入後12週目の電子顕微鏡観察において、両群ともインプラント周囲は新生骨基質と密接しており、osseointegrationが形成されていることが示された。実験2では、FGF-2群のISQは、6週から16週にかけて対照群に比べ有意に高値を示した。以上のことから、組織学的また物理学的解析から、初期固定不良モデルにおいてFGF-2の局所投与によりosseointegrationの獲得及びインプラントの安定性が促進することが明らかとなった。

【結論および考察】

本研究では、*in vivo* におけるFGF-2の作用機序として、①局所投与したFGF-2は、間葉系幹細胞に由来する線維芽細胞様細胞の増殖及び血管新生を誘導する、②その後、投与したFGF-2が消失する頃には、増殖した線維芽細胞様細胞は、骨芽細胞・セメント芽細胞・歯根膜細胞への分化を開始する、③さらに、FGF-2によりBMP-2などの産生が上昇し骨形成が促進されることにより、最終的に歯周組織再生の促進がもたらされることが明らかとなった。また、初期固定不良インプラントモデルにおいてFGF-2の局所投与によりosseointegrationの獲得及びインプラントの安定性が亢進されたことから、FGF-2は、歯周病だけでなく、インプラント施術時など骨新生を必要とする疾患において、有用である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (永 安 利 江)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	西村 理行
	副 査	准教授	野村 良太
	副 査	講師	高橋 雄介

論文審査の結果の要旨

本研究は、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; FGF-2) の *in vivo* における歯周組織再生作用の機序を解析すると共に、インプラント治療に対する応用の可能性を検討したものである。イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、FGF-2 が、既存骨髄及び歯根膜由来の線維芽細胞様細胞の増殖及び血管新生を促進することを明らかにした。さらに、FGF-2 が、BMP-2 などの産生を介して骨芽細胞の分化誘導及び骨形成反応を亢進することが示唆された。これらの多面的な作用に基づき、FGF-2 による新生組織の形成促進が、結果として再生歯周組織量の増大をもたらすことを明らかとした。また、イヌ初期固定不良インプラントモデルにおいて FGF-2 は、骨形成及び osseointegration の獲得を促進し、インプラントの安定性を亢進することを明らかとした。

これらより、FGF-2 は、歯周病だけでなく、インプラント施術時など骨新生を必要とする疾患において、有用である可能性が示唆された。以上の研究結果は、FGF-2 が“歯周組織再生薬”として歯周治療の新たな選択肢に加わる上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。