


学位論文内容の要旨

受付番号	第 381 号	氏 名	角田 隆太 
論文題名	Concentrated Growth Factorsが骨代謝能に及ぼす影響		
指導教員	高田 訓		

論文内容の要旨(2,000字程度)

I 研究目的(300字程度)

近年、外科手術時における再生療法が急速に発展している。concentrated growth factors (CGF) は増殖因子を含む完全自己血由来の濃縮血小板である。また、線維間に結合が強く組織再生を促進する目的として使用されている。しかし、CGFによる骨代謝への影響についてはいくつかの研究が行われているが、骨芽細胞の分化や骨分化マーカーの遺伝子発現との関連については不明な点が多い。そこで、本研究では、ラット下顎骨の欠損部へCGF移植による組織変化およびCGFが骨芽細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

II 研究方法(500字程度)

実験動物は8~10週齢、雄性Wistar系ラットを用いた。CGFは、全身麻酔下にラットより23Gの注射針を用いて心尖部から採血を行い室温で遠心分離(890g×13分)して作製した。In vivoでは、セボフルランによる全身麻酔後、顎下部に局所麻酔を施行した。皮膚切開し骨膜剥離後、オトガイ孔の上部へ生理食塩水注水下に直径2mmになるように移植床を形成した。CGF移植後4日、7日目に試料を摘出し4%パラホルムアルデヒドで24時間浸漬固定した。さらに、4℃の条件で4週間脱灰を行った。脱灰終了後、通法に従いパラフィン包埋し、オトガイ孔と平行になるようにミクロトームで4μm厚の切片を作製した。それぞれH-E染色、TRAP染色を行い光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。In vitroでは、培地はFBSを含むα-MEM培地を用い、MC3T3-E1細胞を培養した。その後、作製したCGFを0.2g/wellで加え培養後に経時的にサンプリングを行った。また、NIH3T3細胞は10%FBSを含むDMEM培地にて培養を行った。mRNAを抽出しRT-qPCRで各遺伝子発現を測定した。またタンパクの検索・解析にウエスタンブロットとALP活性を測定し石灰化の指標にアリザリンレッド-S染色を行った。

III 研究結果(600字程度)

In vivoにおいて、移植後4日目では移植床にCGFの残存が確認され、CGF周囲に吸収を認めた。非移植群では移植床全体に炎症性細胞の浸潤が認められた。移植後7日目では両群において新生骨を認めたが、移植群では非移植群と比較して移植床全体に骨形成を認め、移植床は骨組織で満たされていた。また、TRAP染色では、移植後4日目で移植群のTRAP陽性細胞は、非移植群と比較して明らかに少なくなっていた。7日目では両群ともに4日目と比較してTRAP陽性細胞が増加し、両群間での差は認められなかった。In vitroでは、培養16日間でCGFによる石灰化に対する影響は認められなかった。さらに、骨芽細胞の分化マーカーであるALP遺伝子 (*Alpl*) 発現はCGF刺激により培養4~12日間で有意に発現が抑制され、ALP活性の低下も確認された。また、骨芽細胞の初期分化マーカーであるBmp2, Bmp4, 骨形成の重要な調節因子であるRunx2, 血管新生に関わるVegfaの遺伝子発現はCGFによる影響は及ぼさなかった。破骨細胞の分化・活性促進に関与する遺伝子マーカーであるM-CSF遺伝子 (*Csf1*) やRANKL遺伝子 (*Tnfrsf11*) の発現にはCGFの効果は示されなかった。しかし、RANKLのデコイ受容体であるOPG遺伝子 (*Tnfrsf11b*) の発現が、CGF刺激によって持続的に有意な増加を認め、この遺伝子発現に一致して、MC3T3-E1細胞培養上清中のOPGのタンパク質の増加を認めた。

IV 考察及び結論(600字程度)

血小板の α 顆粒にはPDGF, TGF- β , IGF-1などの増殖因子が含まれており、患者の自己血由来の濃縮血小板を用いる治療法は、自己血由来である為に組織適合性に優れていることから組織治癒・再生促進を目的とした有用性が注目されている。濃縮血小板には以前よりPRPやPRGF使用されているが、作製過程や骨組織再生の用途として改善の余地があると述べられている。これらの欠点を排除した濃縮血小板としてCGFが考案された。

濃縮血小板に含まれているサイトカインが細胞増殖分化を刺激することや、フィブリンマトリックスの密度が骨再生に重要であると言われている。しかし、本研究ではCGF刺激によるサイトカインの変化はなかった。これは濃縮血小板が含有しているサイトカインがプロテアーゼにより分解されることを考慮すると、1週間以上徐放性に骨再生を促進するとは考えづらい。しかし、CGFはOPGに対しては遺伝子のみならずタンパク質レベルでも有意に上昇させた。この結果を反映するようにTRAP染色では移植後4日でCGF移植群は非移植群と比較しTRAP陽性細胞が少なくなっていた。

本研究は、ラット下顎骨欠損部にCGF移植を行うことで欠損部のOPG合成促進し骨形成が促されることを明らかにした。この結果は、この骨の修復過程へのCGFの役割が、OPG合成増加により破骨細胞の分化や活性化、生存を負に調節することで、欠損部の修復を促進することを示唆している。