

Concentrated Growth Factors が骨代謝能に及ぼす影響

奥羽大学大学院歯学研究科顎口腔外科学専攻

角 田 隆 太

(指導教員：高田 訓)

Effect of concentrated growth factors on bone metabolism

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

Ohu University, Graduate School of Dentistry

Ryuta Sumida

(Director : Satoshi Takada)

Abstract

The Concentrated Growth Factors (CGF) fraction is one of the platelet concentrates derived from complete autologous blood rich in growth factors in fibrin matrix. Although CGF has been clinically used for optimizing wound healing for soft and hard tissue, precise role of CGF on bone healing is still controversial. In this study, I determined role of CGF on healing of bone defects using the rat mandibular bone defect model and also osteoblastic differentiation *in vitro*. Whole blood was taken from rats under anesthesia and immediately centrifuged at $890 \times g$ for 13 min at room temperature to collect CGF. Bone defect in one side of metal foramen bone was grafted *in vivo* by CGF (“CGF-grafted group”) and the defect of the other side in same rat was not grafted as the control (“non-grafted group”). MC3T3-E1 cells were cultured with or without CGF to test for osteoblastic differentiation. Gene expression profiling was determined by RT-qPCR. Bone healing was accelerated in the CGF- grafted group and became obviously 7 days after transplantation. The decrease in TRAP positive cells were obviously observed in the CGF-grafted group 4 days after transplantation. *In vitro* study showed that CGF had no effect on calcification nor expression levels of mRNA for M-CSF and RANKL in MC3T3-E1 cells. However, OPG production was significantly induced by CGF, in whose result was in accordance with the decrease in TRAP positive cells in CGF-grafted group. These data suggest that OPG induction by CGF transplant plays an important role of bone healing process through suppression of osteoclastic differentiation and activation.

Key words: Concentrated Growth Factors (CGF), Osteoprotegerin(OPG), bone regeneration, TRAP stain

和文抄録

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。骨組織再生を促進する目的として使用されているが、その作用機序については不明な点が多い。本研究ではラット下顎骨欠損部位への 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。全身麻酔後、ラットより採血を行い室温で遠心分離 ($890g \times 13$ 分) して CGF を作製した。麻酔下でラットのオトガイ孔上部に移植床を形成し、作製した CGF を移植した。これを移植群とした。同時に反対側は非移植群とし対照とした。また、MC3T3-E1 細胞に CGF を添加、培養し骨芽細胞分化を確認した。さらに遺伝子発現を RT-qPCR で測定した。*in vivo* では CGF 移植後 7 日目で明らかな骨形成を示し、4 日目の移植群では TRAP 陽性細胞が減っていた。*in vitro* では CGF が MC3T3-E1 細胞における M-CSF および RANKL の mRNA の発現レベルと石灰化に影響を及ぼさなかった。しかし、OPG の mRNA 発現量は CGF により有意に増加され、その増加量は CGF 移植群における TRAP 陽性細胞の減少量と負の相関を示しているとみなされた。これらのことから、CGF による OPG 合成促進が破骨細胞分化、活性化の抑制を介して骨量を増加させていることが示唆された。

キーワード : Concentrated Growth Factors (CGF),
Osteoprotegerin(OPG), 骨再生,
TRAP 染色

緒 言

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。歯科の臨床で Concentrated Growth Factors (CGF) が，インプラント手術や抜歯術後の骨再生を促進する目的で使用されている。CGF は新鮮血をガラス製採血管や内面がガラスコーティングされたプラスチック採血管で採血し凝固剤を使用せずに 1 度の遠心分離で作製する。これは Platelet rich plasma (PRP) や Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) などの自己血由来の濃縮血小板材料の中では濃縮過程が最も簡便な材料である。また，線維間の結合が強いため，新生骨再生を促進する目的として，骨移植するための移植床粘膜の保護や移植床の空間を維持するために応用されている^{1,2)}。

骨組織はリモデリングにより骨吸収と骨形成を繰り返し，古い骨を新しい骨に置換している。骨吸収を担う破骨細胞の分化と活性化は，骨形成を担う骨芽細胞が接触することにより促進される。すなわち骨芽細胞表面に発現している膜結合型リガンドタンパク質 Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) が前破骨単球の細胞表面に発現する受容体 Receptor Activator of Nuclear Factor- κ (RANK) に作用し，成熟破骨細胞へと分化，活性化し，さらには骨代謝を促進している^{3,4)}。この過程には co-factor として Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) の作用が必須である。

一方，RANKL の作用はデコイレセプター（おとり受容体）である Osteoprotegerin (OPG) により負に調節されている^{4~6)}。すなわち OPG は骨芽細胞から分泌され，RANKL-RANK の結合を阻害することで破骨細胞の分化と活性化を抑制し，骨吸収と骨形成のバランスを骨形成

へ誘導させる骨代謝調整因子である。活性型ビタミン D₃ と副甲状腺ホルモンは，骨芽細胞において RANKL の発現を上昇させるとともに OPG の発現を抑制するのに対して Transforming Growth Factor- β (TGF- β) や Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) の OPG 発現を促進すると報告されている⁷⁻⁹⁾。

CGF に含まれる Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) や TGF- β などのサイトカインが骨代謝を促進すると考えられているが^{10,11)}，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，CGF がラット下顎骨の欠損部の骨代謝に及ぼす影響について *in vivo* および *in vitro* で検索した。

材料および方法

1. 実験動物

8~10 週齢，体重 400~450 g，雄性 Wistar 系ラット (CLEA Japan, Tokyo) を用いた。動物実験用固形飼料 (Oriental Yeast, Tokyo) と水を自由に摂取させ，奥羽大学実験研究施設内 (室温 23°C，湿度 65%) で飼育した。なお，飼育は奥羽大学動物実験委員会の承認 (動物実験許可番号：第 2016-22 号) を得て，奥羽大学動物実験規定を遵守し行った。

2. 手術方法

1) CGF の作製法

麻酔器とセボフルラン吸入麻酔薬 (マイラン[®], Pfizer, Japan) による全身麻酔後，胸部を剃毛し胸腔を開き，23G の注射針を用いて心尖部から 6ml 採血した。採取した血液は速やかに真空採血管 (BD バキュテイナ[®] 採血管 プ

レイン採血管, 日本 BD, Japan)に流入させ濃縮血小板フィブリン分離用卓上低速遠心分離機(Tomy)で $870 \times g$, 室温 13 分の設定で血液成分を分離した。遠心分離後、中間層の CGF を切断し滅菌シャーレに静置し作製した(図 1)。CGF の H-E 染色像を図に示す(図 2)。

2) オトガイ骨欠損部移植床作製と CGF 移植の方法

麻酔器とセボフルラン吸入麻酔薬による全身麻酔の導入後、顎下部にエピネフリン 1/80,000 含有 2% 塩酸リドカイン(オーラ®注)0.2ml による局所麻酔を施した。

顎下部を剃毛後, No.15 の替え刃メスにて皮膚切開を加え骨膜を剥離し, オトガイ孔を移植床形成の指標とした。左右のオトガイ孔の上部へ生理食塩水注水下に 1 分間 6,000 回転で直径 2mm のスチール製ラウンドバーを用いて直径 2mm の移植床を形成した(図 3 a)。右側を移植群とし, 移植床を CGF で満たした(図 3 b)。左側は非移植群として対照とした。それぞれ骨膜を戻し, 5-0 ナイロン糸で顎下部の皮膚縫合を行った。

3. 試料の採取と組織切片の作製

CGF 移植後 4 日, 7 日目にラットをセボフルラン吸入麻酔後, ペントバルビタールナトルウム(100 ~ 150mg/kg)腹腔内投与により安楽死させてから, 周囲軟組織と共に下顎骨を摘出した。その後 4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液(pH7.2)で 4°C , 24 時間浸漬固定した。さらに 10% 4NA(EDTA-4Na)液(pH7.0)にて 4°C の条件で 4 週間脱灰を行った。脱灰液は 2~3 日ごとに交換した。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 $4\mu\text{m}$ 厚の切片を作製した。CGF の移植の影響を組織学的に評価するために H-E 染色後, 光学顕微鏡にて組織学的観察を行った。

4. 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色 (TRAP 染色)

破骨細胞の存在を確認するために、TRAP 染色を行った。脱パラフィンした切片を TRAP Stain kit (Wako, Japan) を湿潤箱内で、37°C、45～60 分反応させ水洗後、マリノールで封入し光学顕微鏡下に TRAP 陽性細胞を観察した。

5. 細胞培養

CGF が直接骨芽細胞に作用しているかを確認するために以下の細胞培養を行った。細胞培用培地は 10% ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco, MA, USA) を含む Eagle's Minimum Essential Medium, α -Modification (α -MEM) 培地 (ICN, Canada) を用い、MC3T3-E1 細胞を 6well dish (Nunc, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で培養した。その後、70% コンフルエントに達した細胞を α -MEM 培地に 50 μ g/ml のアスコルビン酸 (Wako, Japan) と 10mM の β -グリセロリン酸 (Wako, Japan) を添加してさらに培養した。ラットから採血し作製した 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。尚、培地は 48 時間おきに交換を行った。

NIH3T3 細胞は 10% FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (以下 DMEM) 培地にて培養を行った。すべての細胞培養は、5% CO₂, 95% Air, 37°C, の湿潤条件下で行った。

6. Reverse-transcribed Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

CGF による各遺伝子発現を確認するために RT-qPCR を行った。細胞を目的日数まで培養し Ca²⁺/Mg²⁺ 不含ダルベッコリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform (AGPC) 法を用いて

total RNA 抽出した。その後、RNase フリー水に溶解し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo, Fisher, Scientific, MA, USA) にて逆転写反応を行った。GoTaq® Real-Time qPCR Kit (Bio Rad, CA, USA) にて定量 PCR を行った。なお、使用したプライマーの配列は表 1 に示した。また、各遺伝子発現は β -actin 遺伝子 (*Actb*) 発現量に基づいて補正した。

7. 石灰化試験

培養細胞の石灰化状態を確認するためアリザリンレッド-S 染色を行った。24well プレートに CGF を 0.2 g/well 添加して 4, 8, 12, 16 日間培養した。各培養時間後、MC3T3-E1 細胞の培養液を捨て、PBS で一度洗浄し 70% エタノールで 1 時間固定後、脱イオン水で 3 回洗浄した。その後、40mM アリザリンレッド-S (pH4.2) で染色した。

8. ALP 活性測定

骨芽細胞分化マーカーの一つである ALP 活性を調査した。細胞を剥離後に遠心 ($15,000 \times g$ 4°C 5 分) 後、0.1M Tris-HCl (pH7.2) / 0.1% TritonX-100 に懸濁し超音波処理にて細胞を溶解した。ALP 活性測定キット ラボアッセイ™ ALP (Wako, Japan) を用いて Bessey-Lowry 法にて測定した。

9. ウェスタンブロット

培養した細胞を RIPA buffer にて溶解し 20 μ g を試料として無血清もしくは培養上清を 10% SDS-PAGE で電気泳動 (20mA、100V) し PVDF 膜に転写し、スキムミルクにてブロッキングした。1 次抗体として anti-RANKL antibody (BioLegend, CA, USA) あるいは anti-OPG antibody (GeneTex, CA, USA) と 4°C 下にオーバーナイトで反応させた。2 次抗体としてビオチン化抗ウサギ抗体と 1 時間室温にて反応させた。さらにアビジン化 HRP を

と反応させた後，Luminate™ Forte Western HRP Substrate (MERCK MILLIPORE、Germany)を用いて発光法にて検出した。

10. 総タンパク質量の定量

Protein Assay (BioRad, CA, USA) を用いて Bradford 法で測定した。

11. 有意差検定

CGF 移植群と非移植群を比較した結果は平均±標準誤差として表記し，Student *t* 検定を用いて2つの独立したサンプルを比較した。p値は $p < 0.05$ で統計的に有意であると考えた。

結 果

1. オトガイ骨欠損モデルによる *in vivo* での検討

1) H-E 染色

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CGFの吸収を認めた。非移植群では移植床全体に炎症細胞が認められた(図4)。移植後7日目では両群に新生骨を認めたが，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。

2) TRAP 染色

移植後4日目の移植群のTRAP陽性細胞は，非移植群と比較して明らかに少なく，特にCGFに近接する部位に少なかった(図5)。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，両群間に差は認められなくなった。

2. 培養骨芽細胞を用いた *in vitro* での検討

1) 骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現におけるCGFの影響

石灰化試験では、培養4～16日間で石灰化粒の蓄積に変化は認めなかった(図6a)。また、ALP遺伝子(*Alpl*)発現では、CGF刺激により培養4～12日間で有意に発現が抑制(図6b)され、ALP活性の低下も確認された(図6c)。

骨芽細胞の初期分化マーカーである *Bmp2*、骨形成の調節因子である *Runx2*、血管新生に関わる *Vegfa* の遺伝子発現は、CGFに影響されなかった。*Bmp4* は4日目で有意差を認めた(図7)。

2)破骨細胞分化に関与するマーカー遺伝子発現におけるCGFの影響

M-CSF遺伝子(*Csf1*)は4日後でCGF刺激により低下を認めた。RANKL遺伝子(*Tnfsf11*)は2日後に上昇することを認めたが、ウエスタンブロットによる解析では、対照とともに約45kDaのバンドが同レベルで検出された(図8)。

RANKLのデコイレセプター(おとり受容体)であるOPG遺伝子(*Tnfrsf11b*)の発現は、CGF刺激により持続的に有意な増加を認めた(図9a)。この遺伝子発現に一致して、MC3T3-E1細胞培養上清中にOPGのタンパク質の増加を認めた(図9b)。また、MC3T3-E1細胞で見られたCGF刺激による*Tnfrsf11b*発現上昇は、NIH3T3細胞では見られなかった(図9c)。OPGの発現調節に関与する *Wnt3a* や *Wnt5a* は、CGF刺激による上昇を認めなかった(図10)。

考 察

組織再生を促進する増殖因子としてPDGF、TGF- β 、IGF-1などが知られている¹²⁾。血小板の α 顆粒にはこれら増殖因子が含まれているため、自己血由来の濃縮血

血小板は組織適合性に優れている上，組織の治癒や再生の促進能を有している^{13,14)}。1998年 Marxら¹⁵⁾が濃縮血小板として初めて報告された PRP は，自己血を採血した後に，抗凝固剤と混和し，遠心力の異なる2度の遠心分離操作により作製する。この PRP は複数回の分離操作が必要で，さらに，ゲル化にトロンビンや塩化カルシウムなどの活性化物質の添加が必要であるなど，作製工程が複雑であるという欠点を指摘されてきた¹⁶⁻¹⁹⁾。1999年 Anituaら²⁰⁾は PRP の欠点を補った PRGF を報告した。1度の低回転・短時間での遠心分離で作製でき，加熱システムや専用ピペットで赤血球や白血球を除去することにより，骨組織再生を抑制する炎症性サイトカインや細胞を破壊する白血球酵素を除去できる利点があると報告している。しかし，加熱やピペット操作，血小板の量についての問題点が指摘された²¹⁾。これらの濃縮血小板の欠点を排除した濃縮血小板として CGF が考案された^{1,2)}。

CGF などの濃縮血小板に含まれている TGF- β ，IGF-1，PDGF，FGF-2 などの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な要素であると言われている^{15,23)}。Takedaら¹⁰⁾は CGF 移植により2週間で骨組織を認めたことから CGF のサイトカインやフィブリンの効果は短期と考え，本実験では4日目，7日目に絞って観察した。Lingら²⁴⁾は，濃縮血小板刺激が長期間持続することで骨芽細胞の増殖および分化に大きな効果があると述べている。これはフィブリンマトリックスがサイトカインを保護し，徐放するためと考えられる。しかし，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難い。また今回，石灰化が促進されなかった事

実は、CGFが骨芽細胞からのサイトカインの合成促進を介したオートクライン作用により骨再生を促進する可能性を否定している。

本研究において、ラット下顎骨欠損部にCGF移植を行うことで欠損部のOPG合成が促進し骨形成が促されると考えられた。OPG合成増加は破骨細胞の分化や活性化、生存を負に調節するので、CGF移植4日後のTRAP陽性細胞が減った有力な根拠と考えられ、欠損部の修復を促進することが強く示唆された。一方、破骨細胞の分化・活性促進に関与する遺伝子として骨芽細胞内で発現するM-CSF遺伝子やRANKL遺伝子の発現はCGF刺激後2日目でRANKL遺伝子発現の有意な促進と4日目におけるM-CSF遺伝子発現の有意な抑制を認めたにもかかわらず、タンパク質レベルには反映されなかった。このCGFによる遺伝子発現変化は*In Vitro*においては一過性の反応であったが、*In Vivo*の環境下ではOPGに加えてこれらの因子が破骨細胞の分化や活性化に関与している可能性を否定しきれない。

OPGの上昇はサイトカインなどの液性因子ではなく骨芽細胞の受容体にフィブリンなどの刺激が加わり分泌されたのではないかと考える。さらにOPGの合成調節には、Wnt3aを体表とするWnt古典経路の活性化が促進的に、また、Wnt5aが非古典経路として抑制的に作用することが知られている²⁵⁻²⁸⁾。Wntは、Winglessとint1に由来して命名されたサイトカインであり、受容体であるFrizzled (Fzd)に結合すると β カテニンが蓄積し、転写因子であるTCF/LEF転写因子を活性化する。Wntはファミリーを形成し、哺乳類では19種類が同定されているが、分子種によって骨代謝制御が異なっている²⁹⁾。Wnt3aは骨芽細胞の古典経路を活性化し、骨形成を促進

するが、Wnt5a は破骨細胞前駆細胞に対して Ror2 (Frd 共役受容体) を介し Wnt シグナルの非古典経路を活性化して骨吸収を促進する²⁵⁻²⁸⁾。CGF 刺激で NIH3T3 細胞からの OPG 合成に変化が見られなかったことは、CGF 中の Wnt3a や Wnt5a の量比により MC3T3-E1 細胞からの OPG 合成が上昇したという可能性を間接的ではあるが否定している。また、CGF 添加による MC3T3-E1 細胞での Wnt3a や Wnt5a の遺伝子発現に変化は認められなかったことは、CGF から徐放されるサイトカインにより MC3T3-E1 細胞が分泌する Wnt がオートクリン/パラクリン因子として作用して OPG 発現を促進している可能性を否定している。この他、CGF 刺激により発現が変化することで OPG 発現を誘導する可能性として、 β -カテニンシグナルを抑制する Dickkopf-1 (DKK-1) の発現抑制が考えられた³⁰⁾。しかし、未刺激の MC3T3-E1 細胞における DKK-1 発現レベルは検出限界以下であり、DKK-1 のさらなる発現低下による OPG 発現促進機構は可能性が低い。CGF による OPG 発現上昇機構についてはさらなる研究が必要である。

フィブリンは治癒過程における細胞接着や細胞分化などに有用であるとされており、その機構にはフィブリンが足場 (スキャットホルド) として機能しているとされている³¹⁻³³⁾。本実験における欠損部位の骨の修復過程に CGF 中のフィブリンによるスキャットホルド作用がある程度関与したとみなされる。本実験の非移植群では、赤血球を主成分とした血餅が充満し、移植床にはフィブリンが満たされていた。これに対し CGF を移植した移植群は欠損部の骨再生が早期に誘導された。同様に、Moon ら³⁴⁾ は上顎洞粘膜下に静脈血を注入した場合、新生骨形成に平均 7 ヶ月を要したと述べたが、Shon ら³⁵⁾ が応

用した CGF では、4 ヶ月で新生骨形成を認めたと報告されていることから、CGF による主たる効果はフィブリンに加えて他の CGF 成分が相加的または相乗的に関与した可能性が高い。

結 論

CGF により誘導された OPG が破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制し骨代謝機能のバランスを骨形成に傾かせることを明らかにした。(図 1 1)

本論文に関して、利益相反関係にある企業などはない。

謝 辞

稿を終わるに臨み、終始直後ご指導、御校閲を賜った奥羽大学歯学部口腔外科学講座主任高田訓教授、口腔病態解析制御学講座（口腔病理学）伊東博司教授、口腔機能分子生物学講座（口腔生化学）加藤靖正教授、口腔機能分子生物学講座（口腔生化学）前田豊信准教授、口腔外科学講座川原一郎講師、寿泉堂総合病院歯科口腔外科河西敬子先生に深謝するとともに、ご指導、御鞭撻を頂いた口腔外科学講座大野敬教授に衷心より謝意を表します。また、数々のご協力を頂いた奥羽大学口腔外科学講座、口腔病理学講座、口腔生化学講座の諸先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第 59 回歯科基礎医学会学術大会（平成 29 年 9 月 18 日）、第 62 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会（平成 29 年 10 月 21 日）、第 64 回奥羽大学歯学会（平成 29 年 11 月 11 日）において発表した。

参考文献

- 1) Rodella,LF., Favero,G., Boninsegna,R., Buffoli,B., Labanca,M., Scari,G., Sacco,L., Batani,T. and Rezzani,R.:Growth Factors, CD34 Positive Cells, and Fibrin Network Analysis in Concentrated Growth Factors Fraction. *Microscopy Research and Technique* 74:772-777 2011.
- 2) Durmuşlar,MC., Balli,U., Dede,FÖ., Misir,AF., Bariş,E., Kürkçü,M. and Kahraman, SA.: Histological Evaluation of the Effect of Concentrated Growth Factors on Bone Healing. *The Journal of Craniofacial Surgery* 27:1494-1497 2016.
- 3) Suda,T ., Takahasi,N. , Udagawa,N., Jimi,E. , Gillespi,MT.,and Martin, TJ.: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 20:345-357 1999.
- 4) Yasuda,H., Shima,N., Nakagawa,N., Yamaguchi,K., Kinosaki, M., Mochizuki, S. and Tomoyasu,A.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastgenesis-inhibitiry factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc natl Acad Sci. USA* 95:3597-3602 1998.
- 5) Siomonet,WS ., Lacey,DL. and Dunstan,CR. : Osteoprotegerin. a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319 1997.

- 6) Yoshida,H., Hayashi,S. and Kunisada,T.:The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345:442-444 1990.
- 7) Yang,X., Wang,Y. , Han, X., Shu, R., Chen, T., Zeng, H., Xu, X., Huang, L., Ren, A., Song, J., Cao, L. and Bai,D.:Effects of TGF- β 1 on OPG/RANKL expression of cementoblasts and osteoblasts are similar without stress but different with mechanical compressive stress. *Scientific World Journal* 718180, 2015.
- 8) Takeda,S., Yoshizawa,T., Nagaki,Y., Yamamoto,H., Fukumoto,S. and Sekine,K.:Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor(VDR) in osteoblast cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* 140:1005-1008 1999.
- 9) Tachi,K., Takami,M., Zaho,B., Mochizuki,A. , Yamada, A. and Miyamoto, Y.: Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. *Cell and tissue Research* 342:213-220 2010.
- 10) Takeda, Y., Katsutoshi, K., Matsuzaka, K. and Inoue, T. The Effect of Concentrated Growth Factor on Rat Bone Marrow cells in Vitro and on Calvarial Bone Healing inVivo. *The international Oral Maxillofacial implants* 30:1187-1196 2015.

- rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects-a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac surg.* 36:132-136 2007.
- 19) Plachokova, AS., Nikolidakis, D., Mulder, J., Jansen, JA. and Creugers, NH.: Effect of Platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: asystematic review. *Clin Oral Implants Res.* 19:539-545 2008.
- 20) Anitua, E.: Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:529-535 1999.
- 21) Simonpieri, A., Choukroun, J., Del Corso, M. and Dhon Ehrenfest, DM.: Simultaneous sinus-left and implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as also grafting material: a six-year experience. *Implant Dent.* 20:1-2 2011.
- 22) Anitua, E., Aguirre, J.J., Algorta, J., Ayerdi, E., Cabezas, A.I., Orive, G. and Andia, I.: Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 84:415-421 2008.
- 23) Litvinov, R.I. and Weizel, J.W.: What is the biological and clinical relevance of Fibrin? *Semin Thromb Hemost.* 42:333-343 2016.
- 24) He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y. and Wu, H.: A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect proliferation and differentiation of rat

- osteoblast in vitro. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology. 108:707-713 2009.
- 25) Loilome, W., Bungkanjana, P., Techasen,A., Namwat,N., Yongvanit,P. , Puapairoj,A. , Khuntikeo,N. and Riggins,GJ.: Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling in cholangiocarcinoma cells. Tumour Biol. 35:5357-5367 2014.
- 26) Lin, SS., Ueng, SW., Niu, CC., Yuan,LJ, Yang,CY., Chen,WJ., Lee,MS. and Chen,JK.: Hyperbaric oxygen promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by regulating Wnt3a/ β -catenin signaling--an in vitro and in vivo study. Stem Cell Res. 12:260-274 2014.
- 27) Dejmek, J., Safholm, A. and KampNielson, C.: Wnt5a/ca induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cds42-casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells. Mol Cell Biol. 26:6024-6036 2006.
- 28) Maeda,K., Kobayashi,Y., Udagawa,N., Uehara,S., Ishihara,A.,Mizoguchi,T.and Kikuchi,Y.:Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblastlineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. Nat Med. 18:405-412 2012.
- 29) Kikuchi,A.:New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. Int Rev Cell Mol Biol. 291:21-71 2011.
- 30) Skaria, T., Bachli, E. and Schoedon, G.: WIF1 prevents Wnt5A mediated LIMK/CFL

phosphorylation and adherens junction disruption in human vascular endothelial cells. *Journal of Inflammation*. 14:10 2017.

- 31) Sahni,A. and Francis,CW.:Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and simulates endothelial cell proliferation. *Blood* 96:3772-3778 2000.
- 32) Van Hinsbergh,VW., Collen,A. and Koolwijk,P.: Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 936:426-437 2001.
- 33) Choukroun., Diss, A., Simonpieri,A ., Girard,MO. Schoeffler,C. and Dhon,SL.: Platelet-rich fibrin(PRF): a second-generation platelet concentrate. PartIV:clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod*. 101:56-60, 2006
- 34) Moon,JW. , Shon,DS. , Heo,JK. , Shin,HI. and Lee, WH.: New bone formation in the maxillary sinus using peripheral venous blood alone. Submitted to *Int J Oral Maxillofac implants*. 69:2357-2367 2011
- 35) Shon,DS., Moon,jw., Moon,SY. ,Park,JS. and Jung,HS. : The Use of Concentrated Growth Factors(CGF) for Sinus Augmentation. *The Journal of Oral Implants*. 38:25-38 2009.

付図説明

図 1 CGF の肉眼的特徴

上層(血清), 中間層(CGF), 下層(RBC) 3層に分離している。

(a) 遠心分離後の血液サンプル

(b) 試験管内より摘出されたゲル状の CGF 塊と RBC 塊

(c) 機械的手段により RBC 塊から (b) の点線で分離された CGF 塊

図 2 光学顕微鏡による CGF 塊と RBC 塊の表面構造

フィブリンネットワークを認める CGF 塊と RBC 塊に分離していて, 中間に白血球層を認める。

図 3 下顎骨への移植床形成と CGF 移植

(a) オトガイ孔上部に形成された直径 2 mm の移植床

(b) 移植床に CGF を移植(矢印: CGF)

図 4 H-E 染色の光学顕微鏡像

4 日目で非移植群(CGF-)は炎症性細胞の浸潤を認め, 移植群(CGF+)は CGF で満たされていた。7 日では移植群は非移植群と比較して骨の増加を認める。●: Bone, ▲: CGF (H-E; scale bars=100 μ m)

(a) 非移植群(CGF-)の H-E 染色像

(b) 移植群(CGF+)の H-E 染色像

図 5 TRAP 染色の光学顕微鏡像

移植後 4 日目で非移植群と比較して TRAP 陽性細胞は明らかに少なかった。●: Bone,

▲: CGF (HE; scale bars=10 μ m)

(a) 非移植群 (CGF-) の TRAP 染色像

(b) 移植群 (CGF+) の TRAP 染色像

図 6 アルカリフォスファターゼと石灰化における CGF の影響

アリザリンレッドによる石灰化の評価では, CGF の効果は確認できず, ALP は mRNA レベルや活性ともに CGF により抑制された。

(c; n=4) (**p < 0.01, ***p < 0.001)

(a) アリザリンレッド染色

(b) *Alpl* 遺伝子発現量

(c) ALP 活性の比較

図 7 骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現における CGF の影響

CGF を添加したことによる *Bmp2*, *Bmp4*, *Runx2*, *Vegfa* 遺伝子発現の促進は認められなかった。 (**p < 0.01)

(a) *Bmp2* 遺伝子発現量

(b) *Bmp4* 遺伝子発現量

(c) *Runx2* 遺伝子発現量

(d) *Vegfa* 遺伝子発現量

図 8 CGF の M-CSF や RANKL 発現に及ぼす影響

CGF は, *Csf1* mRNA レベルには影響せず, *Tnfsf11* mRNA レベルは 2 日後に上昇したが, 細胞のライセートによるウエスタンブロットでは, RANKL レベルには CGF の効果はなかった。 (*p < 0.05)

(a) *Csf1* 遺伝子発現量

(b) *Tnfsf11* 遺伝子発現量

(c) RANKL タンパク質発現の比較

図 9 CGF が OPG 発現に及ぼす影響

MC3T3-E1細胞では，CGFにより *Tnfrsf11b* mRNAレベルウエスタンブロットによるタンパク質レベルともに上昇したが，NIH3T3細胞に対しては影響しなかった。（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ）

- (a) MC3T3-E1細胞における *Tnfrsf11b* 遺伝子発現量
- (b) OPGタンパク質の分泌量の比較
- (c) NIH3T3細胞における *Tnfrsf11b* 遺伝子発現量

図 10 CGF が Wnt に及ぼす影響

CGF添加による *Wnt3a*，*Wnt5a* 遺伝子の発現レベルに変化は認められなかった。

- (a) *Wnt3a* 遺伝子発現量
- (b) *Wnt5a* 遺伝子発現量

図 11 CGF による骨増加のメカニズム

表 1 RT-qPCR に使用したプライマーの配列

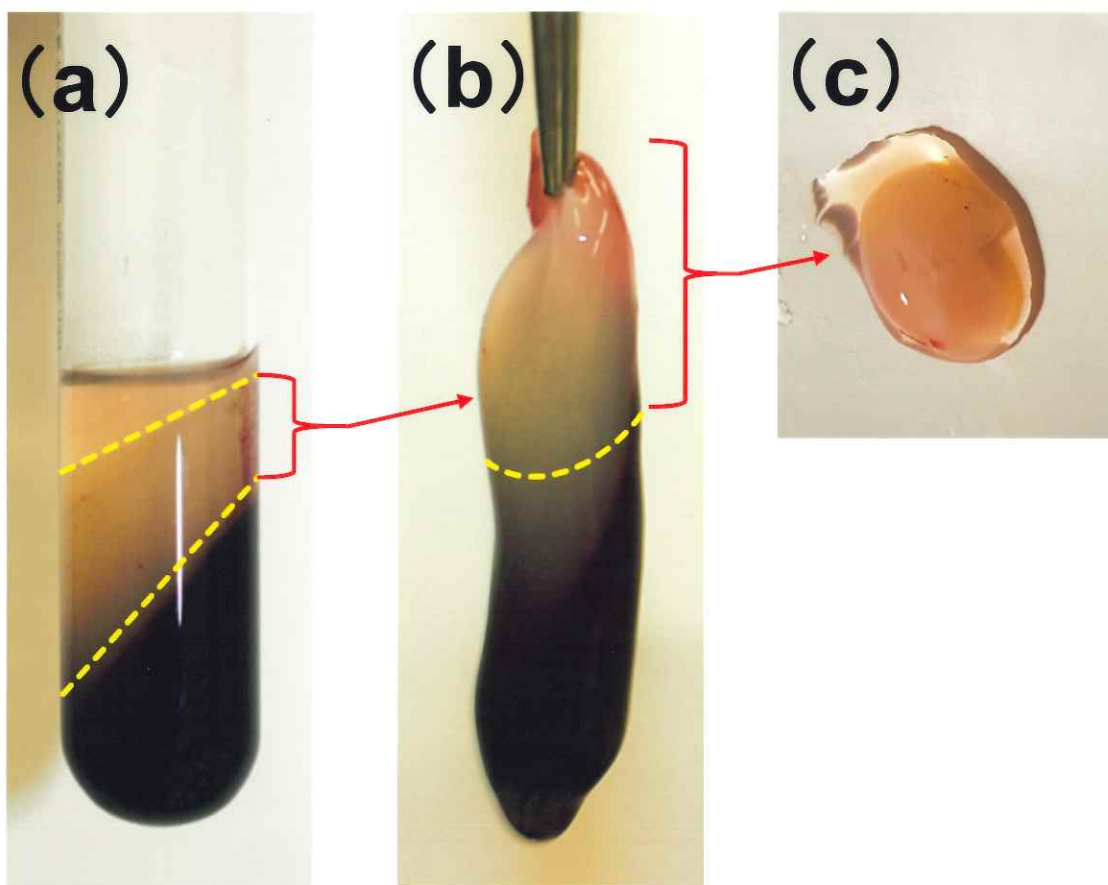


图 1

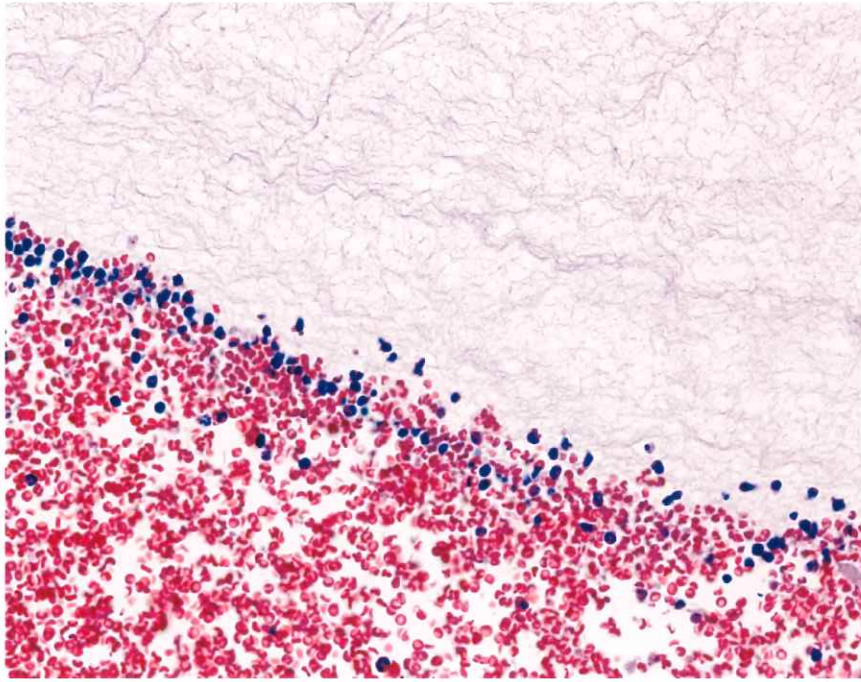


图 2

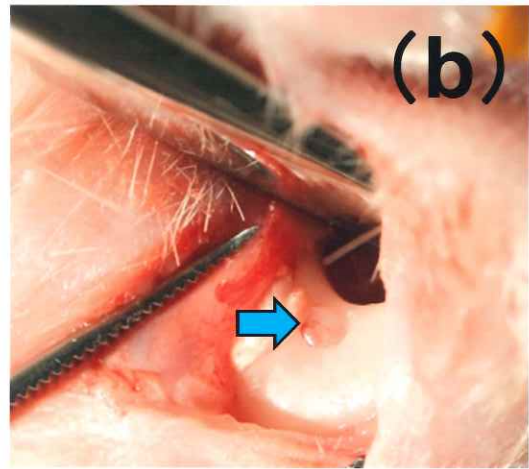
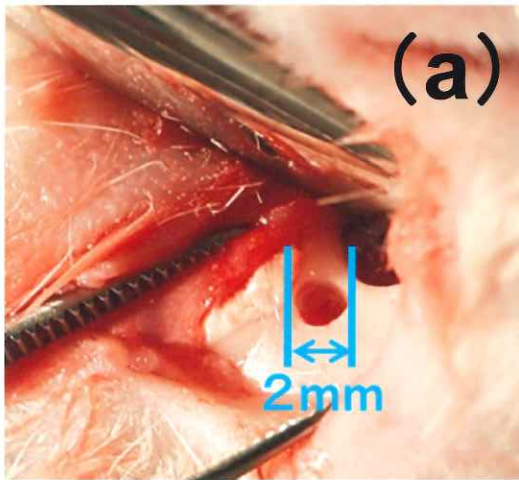


图 3

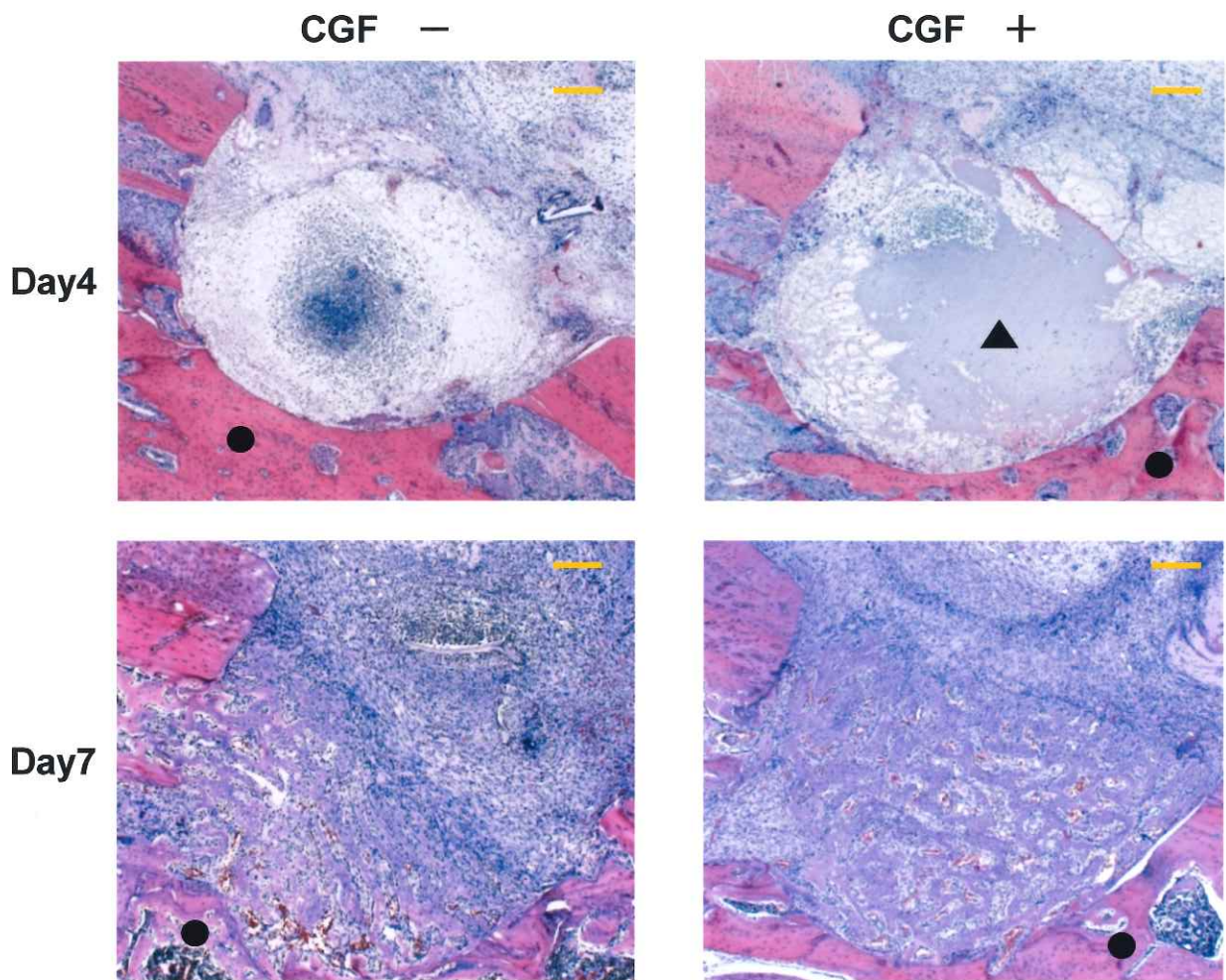


图 4

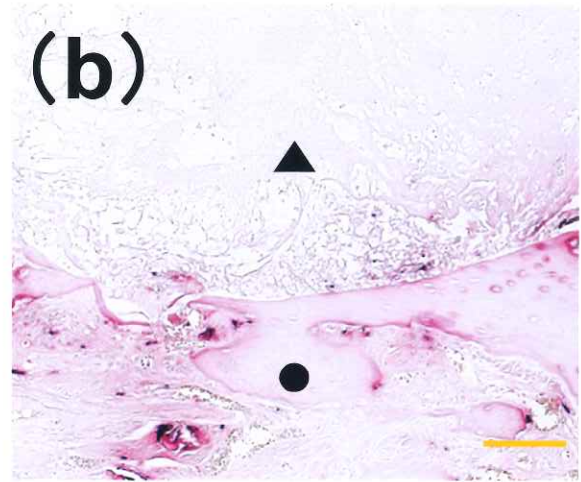
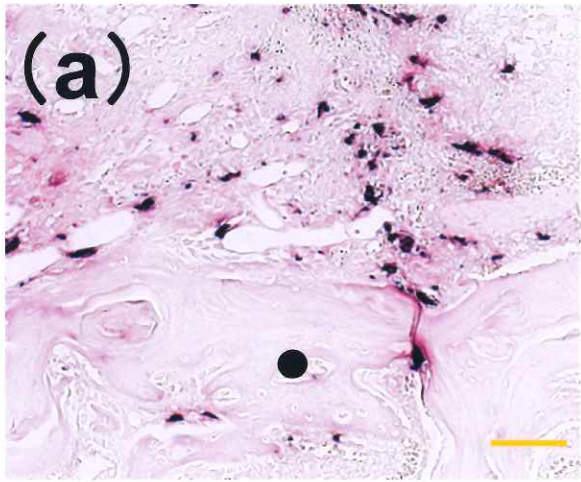


图 5

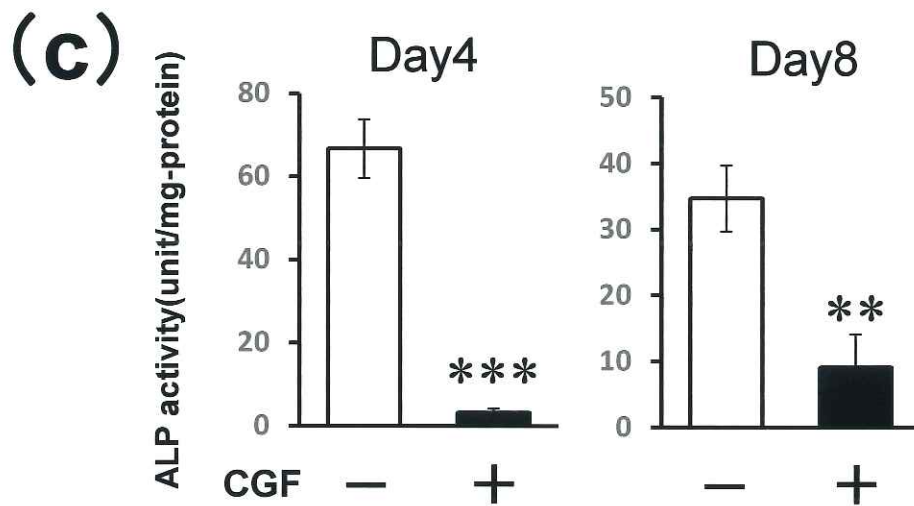
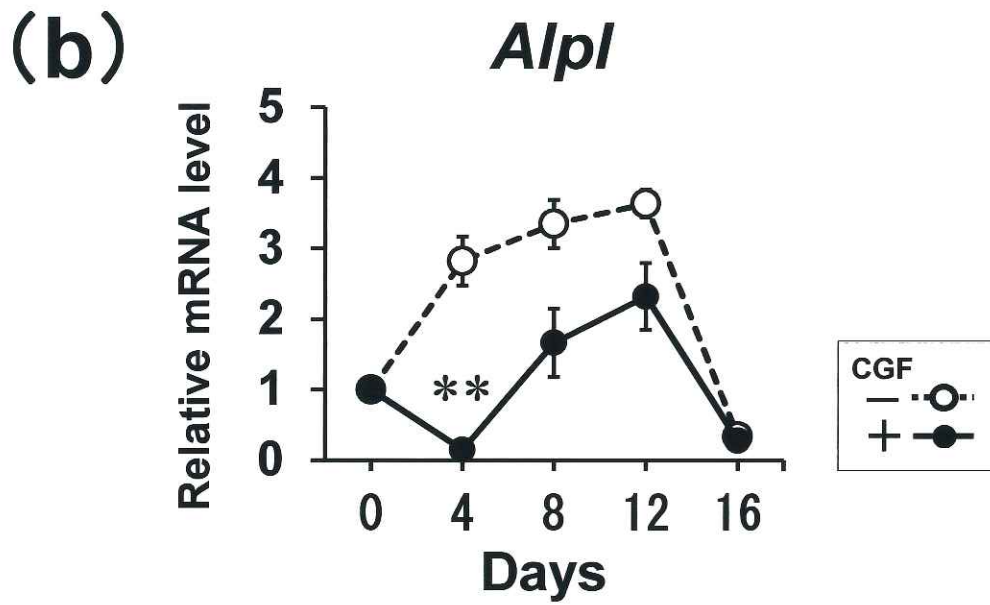
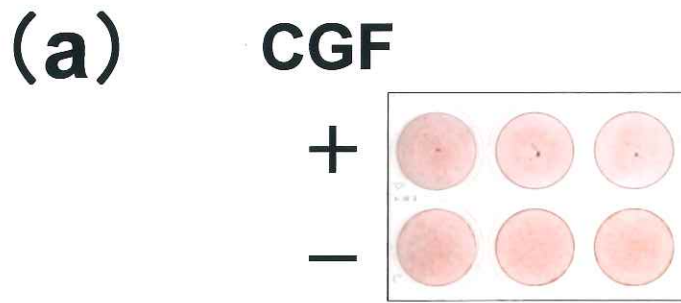


图 6

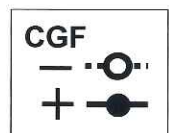
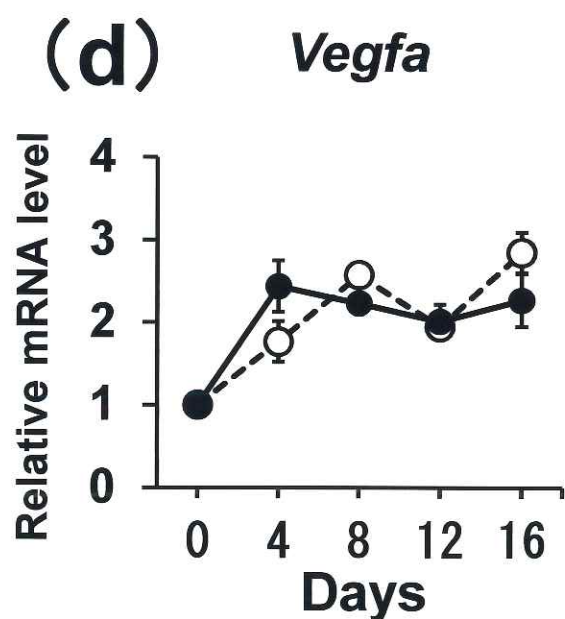
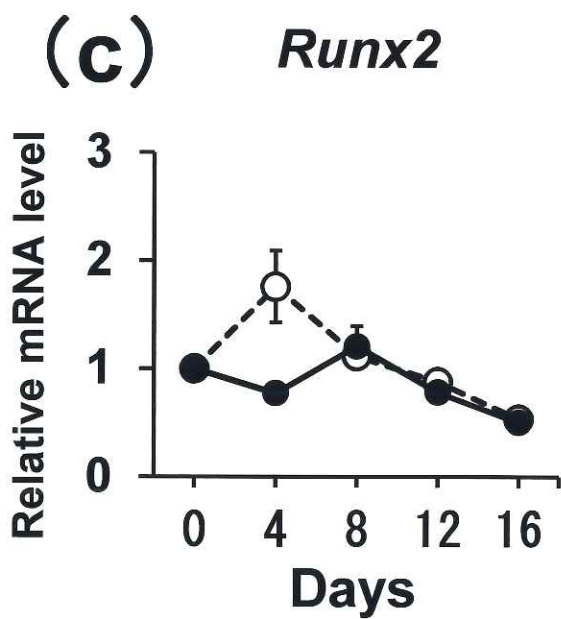
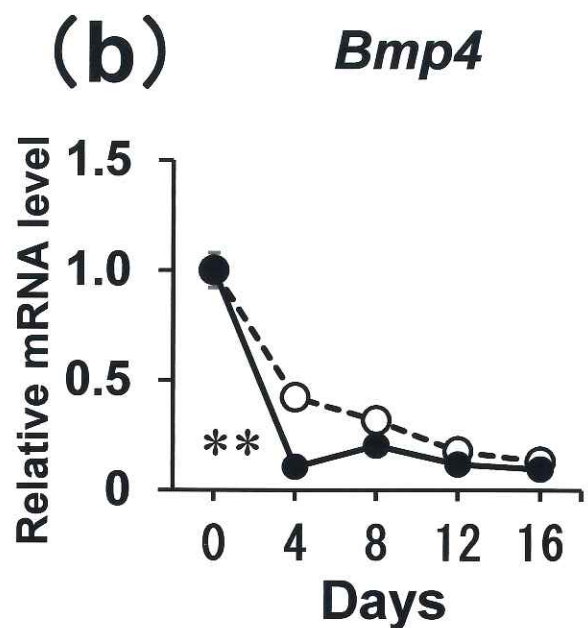
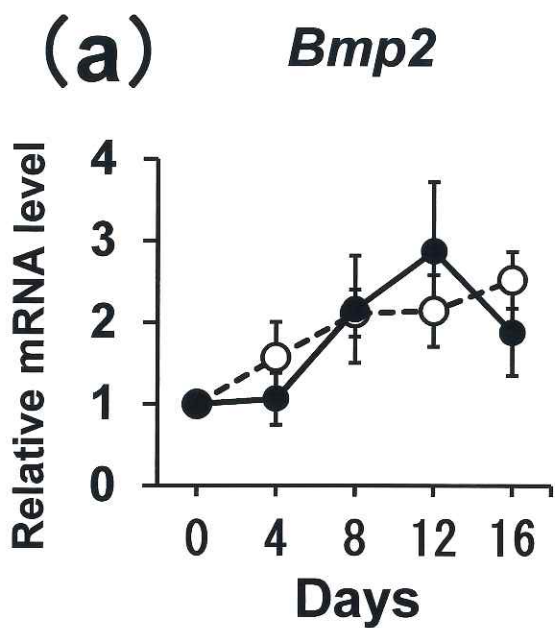
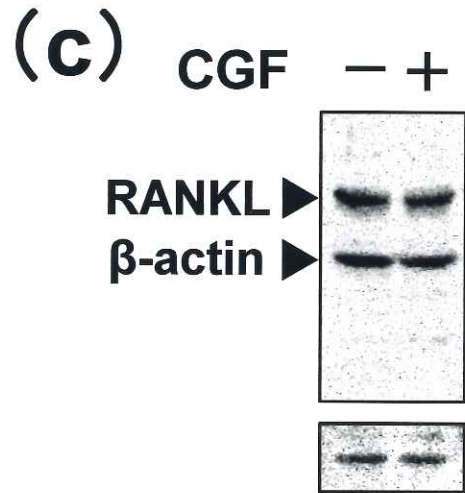
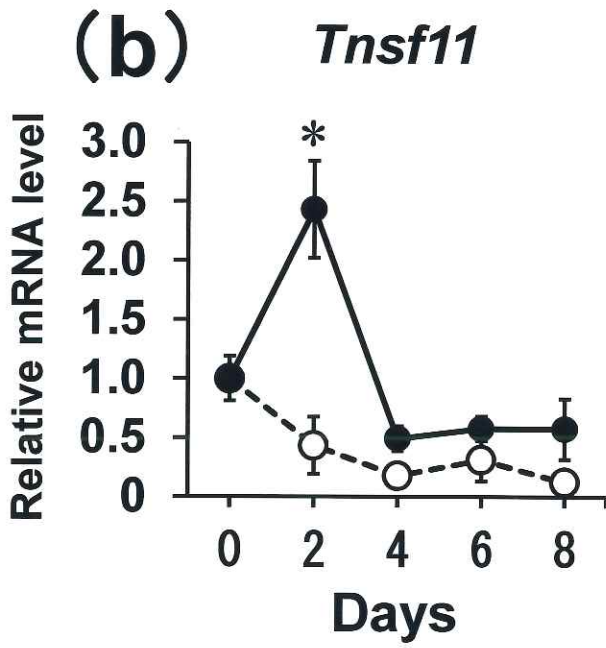
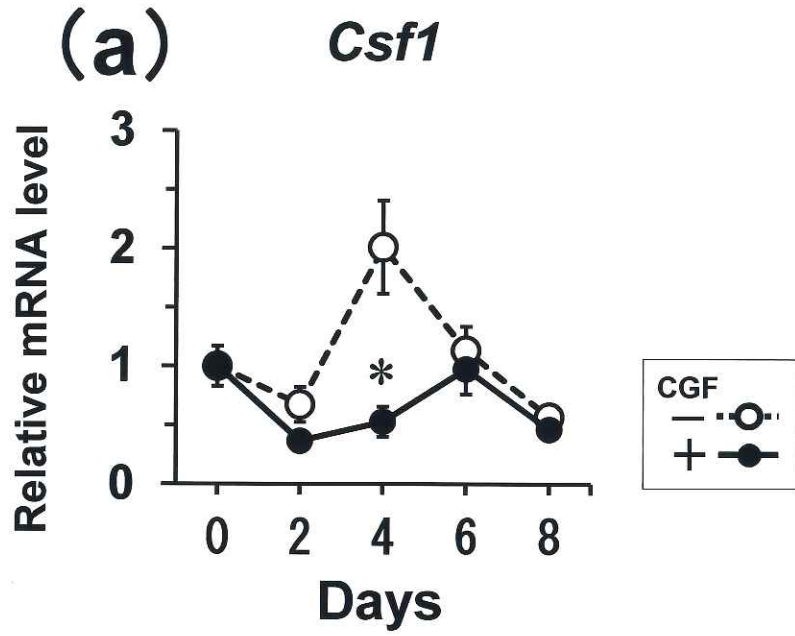
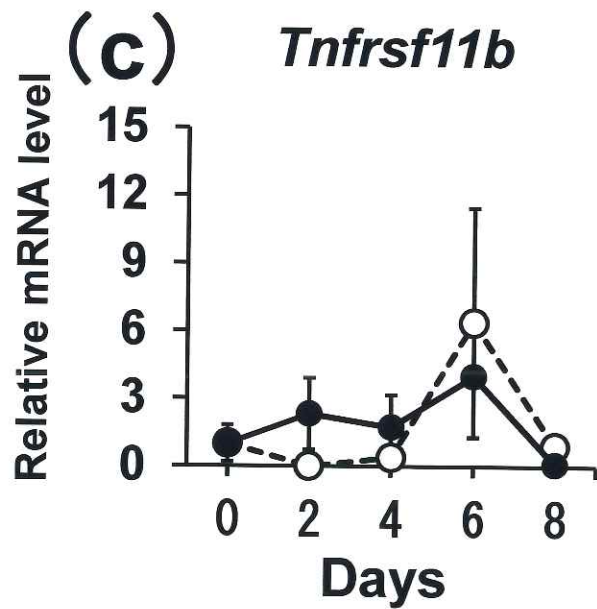
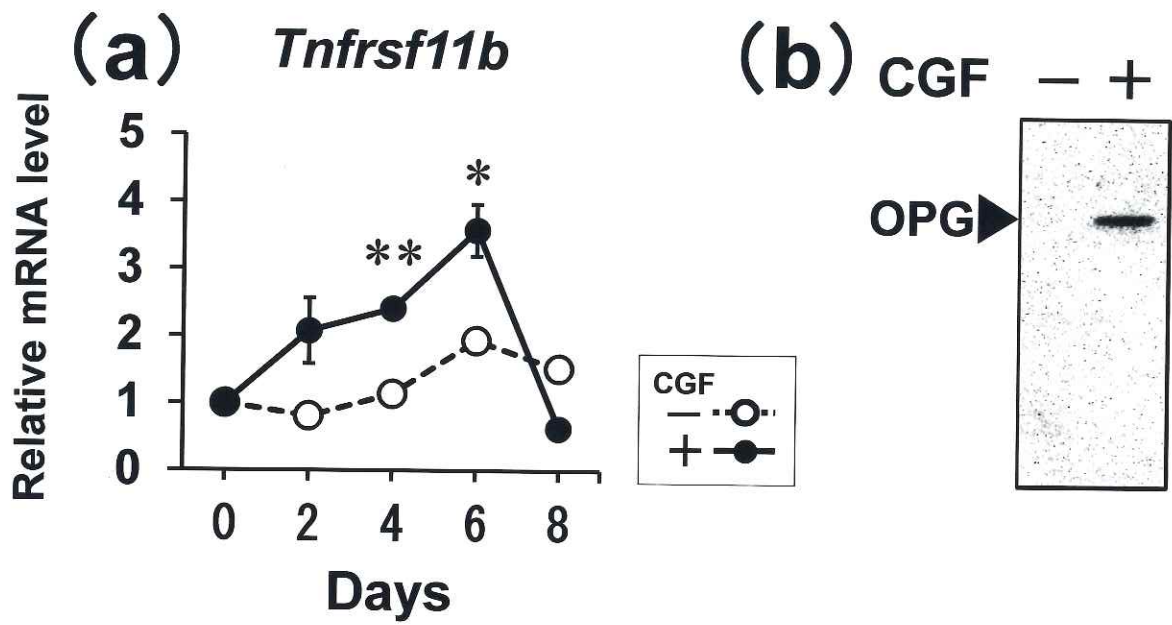


图 7





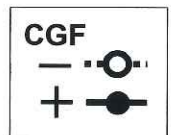
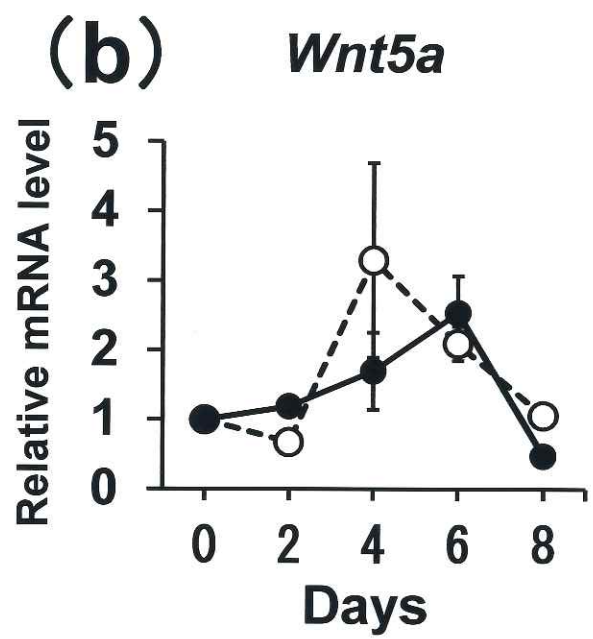
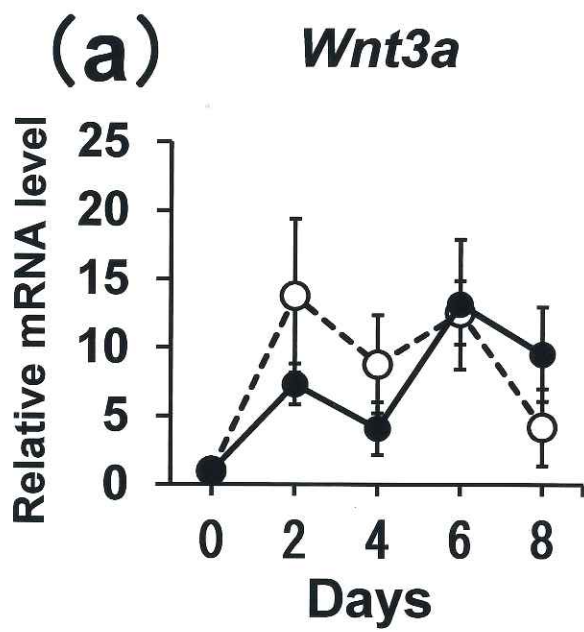


图 10

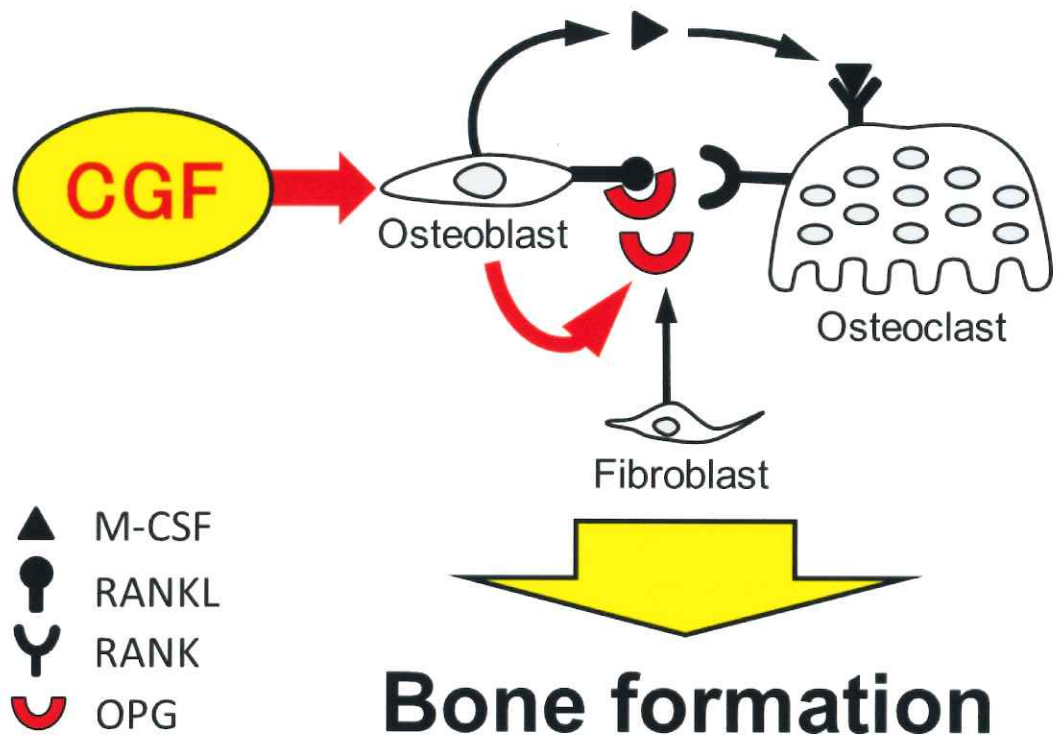


图 1 1

表 1

Genes	Primer sequences	Genes	Primer sequences
<i>Bmp2</i>	Forward: TGA CTGGATCGTGGCACCTC Reverse: CAGAGTCTGCACTATGGCATGGTTA	<i>Csf1</i>	Forward: AGTGCTCTAGCCGAGATGTG Reverse: CTGCTAGGGGTGGCTTTAGG
<i>Bmp4</i>	Forward: AGCCGAGCCAACACTGTGAG Reverse: TCACTGGTCCCTGGGATGTTT	<i>Infsf11</i>	Forward: AGCCGAGATGGATCCTAACA Reverse: CCAGAGTCGAGTCCTGCAAAT
<i>Runx2</i>	Forward: ACTCCAGGCATACTGTACAAC Reverse: AGGCTGTTTGACGCCATAGT	<i>Infrsf11b</i>	Forward: AGTGTGAGGAAGGGCGTTAC Reverse: AATGTGCTGCAGTTCGTGTG
<i>Alpl</i>	Forward: GCAGTATGAATTGAATCGGAACAAC Reverse: ATGGCCTGGTCCATCTCCAC	<i>Wnt3a</i>	Forward: CTACCCGATCTGGTGGTCTT Reverse: ACAGAGAATGGGCTGAGTGC
<i>Tgfb1</i>	Forward: CCCGAAGCGGACTACTATGC Reverse: CATAGATGGCGTTGTTGCCG	<i>Wnt5a</i>	Forward: AAAGGGAACGAATCCACGCT Reverse: CAGCACGCTTGAGGCTACA
<i>Vegfa</i>	Forward: GCCTCCGAAACCATGAACTTT Reverse: TGGGACCACTGGCATGGT	<i>Actb</i>	Forward: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC Reverse: ATGGAGCCACCGATCCACA