

氏名	岡本 憲太郎
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6151号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子はその高い組織内滞留性によって効率的に歯周組織再生を促進する
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 久保田 聡 教授 松本 卓也 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) の臨床応用が開始された。しかし、bFGF製剤は局所組織中における滞留性の低さから、適応が垂直性骨欠損に限定され、水平性骨欠損への適応は困難である。

そこで、増殖因子に滞留性を持たせる薬物送達システムに着目した。C. histolyticumが産生するコラーゲン一ゼのC末端側には、コラーゲン結合ドメイン (Collagen binding domain : CBD) が存在する。このCBDとbFGFから成る融合タンパク質 (Collagen binding-bFGF : CB-bFGF) を精製した。精製したCB-bFGFを基材としてのコラーゲンパウダー (CP) と混和し、ラットの水平性骨欠損モデルへ投与したところ、術後8週において、bFGFと比較して有意に歯槽骨形成を促進した。

本研究では、CB-bFGFの歯周組織再生療法への応用を目指し、bFGFの有効性が示されている中型動物を用いて、CB-bFGFの有効性を評価した。また、CB-bFGFの動態と生物学的活性を検討した。

【材料と方法】

- 試料** : CB-bFGF は、大腸菌発現系を用いて生産し、アフィニティ・クロマトグラフィーにて精製した。精製したタンパク質は、ロットごとにコラーゲン結合活性と細胞増殖活性を確認した。併用するコラーゲン基剤は、CPを用いた。
- 使用動物** : イヌの2壁性骨欠損モデルを用いて、CB-bFGF/CPの有効性を検討した。ラットの水平性骨欠損モデルを用いて、CB-bFGFの組織内滞留性と生物学的活性を検討した。
- イヌの2壁性骨欠損の作製** : 第二前臼歯遠心と第一後臼歯近心に2壁性骨欠損を作製し、CB-bFGF/CP (比 1.45 nmol/12.5 mg) を填入した。対照群として、bFGF/CPとリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) /CPを用いた。術後4週において、下顎骨を摘出した。
- ラット水平性骨欠損の作製** : Nakamuraらの方法 (*J. periodontol.* 2019) に従って水平性骨欠損を作製した。各実験で設定した時間経過後、上顎骨を摘出した。
- 組織切片の作製** : 前述の方法で得たイヌの下顎骨または、ラットの上顎骨を固定および脱灰後、パラフィン包埋した。ブロックを連続的に厚さ 4 μm で薄切し、組織切片を得た。
- 新生骨体積の定量** : イヌの下顎骨を単純CTで撮像し、三次元構築して新生骨量を定量した。

7. イヌ歯周組織の組織学的形態計測：イヌ歯周組織の組織切片を Azan 染色後に、新生骨面積と新生セメント質の長さを計測した。
8. CB-bFGF のコラーゲンパウダーからの徐放量と滞留量の定量：CB-bFGF/CP または bFGF/CP (比 0.1 nmol/5 mg) を 1 mL の PBS 中に浸漬し、経時的に上清を回収した。上清中の CB-bFGF/CP または bFGF/CP 量を ELISA 法で定量した。実験開始から 168 時間後に、CP 中に残存している CB-bFGF または bFGF を Western blotting で検出した。
9. ラット歯周組織の免疫組織化学染色：ラット歯周組織の組織切片を抗ヒト bFGF 抗体、抗ラット Ki67 抗体、そして抗ラット PDGFR α 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。
10. フローサイトメトリー法による MSC 数と FGFR1 陽性細胞の定量：第一大臼歯口蓋側歯肉を摘出し、得られた細胞中の間葉系幹細胞 (MSC) 細胞数と FGFR1 陽性細胞数をフローサイトメトリー法で定量した。
11. 統計解析：2 群間以上の差の検定には、one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用いた。多重比較検定には、Tukey/Kramer test を用いた。2 群間の差の検定には、Student's *t*-test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. イヌ歯周組織における CB-bFGF/CP の有効性の確認：CB-bFGF/CP 群では、術後4週にて、PBS/CP 群と比較して有意に新生歯槽骨量が増加した。また、組織学的形態計測の結果から、CB-bFGF/CP 群では、術後4週で、PBS/CP 群と bFGF/CP 群の両群と比較して有意に新生歯槽骨面積が増加した。一方で、新生セメント質の形成は、全ての群において確認され、増加傾向にあったが有意な差ではなかった。
2. CB-bFGF のコラーゲンパウダーからの徐放性と滞留性 (*in vitro*)：bFGF と比較して CB-bFGF の方がより緩徐に徐放された。さらに、168 時間後の CP 中に、CB-bFGF は明瞭に検出されたが、bFGF はかすかに検出したのみであった。
3. CB-bFGF の滞留性 (*in vivo*)：bFGF と CB-bFGF はいずれも組織中で確認された。bFGF は術後3日目から顕著に減少した、CB-bFGF は術後5日目でも明瞭に確認された。
4. ラット歯周組織における細胞増殖への影響：Ki67 陽性細胞は、bFGF 群では、術後3日目から5日目まで大きな変化が無かったが、CB-bFGF 群では、術後5日目と顕著に増加した。PDGFR α 陽性細胞は、両群で、術後3日目と比較して術後5日目と増加し、CB-bFGF 群においてその傾向は顕著であった。
5. ラット歯周組織における間葉系幹細胞と FGFR1 陽性細胞への影響：FGFR1 の陽性細胞数に差はなかったが、MSC 数および FGFR1 陽性 MSC 数は、CB-bFGF 群の方が増加する傾向があった。

【考察】

イヌの垂直性骨欠損モデルにおいて、CB-bFGF/CP は bFGF/CP と比較して、歯槽骨再生を促進し、セメント質や歯根膜新生が確認された。この結果から CB-bFGF/CP がより効率的に歯周組織再生を導く可能性が示された。

In vitro での徐放性および滞留性試験において、CB-bFGF はコラーゲン基剤からより緩徐に放出され、基剤中に長期に滞留した。また、*in vivo* において、CB-bFGF は、bFGF と比較して、局所組織中に長期に滞留した。さらに、免疫組織化学染色の結果から、CB-bFGF は、より長期に細胞増殖活性を刺激し、結合組織のリモデリングを促進する可能性が示された。最後に、フローサイトメトリー解析の結果から、CB-bFGF を投与すると、bFGF 投与時と比較して、FGFR1 を発現している細胞数には差がないが、MSC 数は増加し、FGFR1 陽性の MSC 数も増加する傾向があった。このことから、CB-bFGF が通常発現している FGFR1 に持続的に作用することで MSC の増殖を促進する可能性が示された。

以上のことから、CB-bFGF は、局所組織および基剤中に滞留し徐放されることによって、創傷治癒初期の細胞増殖や局所組織中の再生環境を整えるといった bFGF が本来持っている機能を、より長期に発揮することで歯周組織再生における有効性を増強すると考えられる。CB-bFGF は、その徐放性と滞留性から、より困難な条件の再生療法への応用が期待できる。今後は、中型動物における水平性骨欠損モデルにおいて有効性を検討する必要がある

【結論】

CB-bFGF とコラーゲン基剤から成る複合剤の中型動物の歯周組織再生療法における有効性は、bFGF と比較して同等以上であった。また、CB-bFGF は bFGF と比較して歯周組織中に基剤とともに長期に滞留し、bFGF の効果を長期に持続することで、より歯周組織再生を亢進すると考えられる。

論文審査結果の要旨

塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) の臨床応用が開始された。しかし、bFGFは局所滞留性が低いため、その適応症は垂直性骨欠損に限定されている。我々はbFGF製剤の適応拡大を目指して、細菌性コラーゲナーゼ由来のコラーゲン結合ドメイン (collagen-binding domain : CBD) を用いて、bFGFをコラーゲン基剤に結合させ、局所滞留性を付与する薬物送達システムを考えた。これまでにCBDとbFGFの融合タンパク質 (collagen-binding bFGF : CB-bFGF) をコラーゲンパウダー (CP) と混和し、ラットの水平性骨欠損モデルへ投与した。その結果、CB-bFGFはbFGF単独と比較して有意に歯槽骨形成を促進することを明らかにした。本研究では、CB-bFGFの臨床応用を目指し、中型動物であるイヌの垂直性骨欠損に対する歯周組織再生療法におけるCB-bFGFの有効性を評価した。また、ラットの水平骨欠損モデルにおけるCB-bFGFのCP中および歯周組織中における滞留性を評価した。さらに、CB-bFGFの生物学的活性を検討するために、治療部位における細胞増殖マーカーであるKi67の陽性細胞と、結合組織の形成のマーカーであるPDGFR α の陽性細胞を確認した。また、bFGF受容体であるFGFR1の発現陽性細胞の割合と、間葉系幹細胞のマーカー因子の発現を確認した。

- 1) CB-bFGFのイヌ垂直的歯槽骨欠損モデルにおける有効性 : CB-bFGF/CP群では、リン酸緩衝食塩水 (PBS) /CP群と比較して有意に新生歯槽骨量が増加した。一方で、bFGF/CP群とPBS/CP群の間には新生歯槽骨量に有意差はなかった。また、アザン染色後の組織学的形態計測の結果から、CB-bFGF/CP群では他の2群と比較して有意に新生歯槽骨面積が増加した。
- 2) CB-bFGFの*in vitro*における徐放性 : CB-bFGF/CPは、bFGF/CPと比較して、緩徐にbFGFを放出する性質を示し、168時間後にかけてその徐放が継続した。また、168時間後のCP中からbFGFはわずかにしか検出されなかったが、CB-bFGFは明瞭に検出された。
- 3) CB-bFGFのラット歯周組織中における滞留性 : CB-bFGF/CP群では、術後5日目においても歯周組織中にbFGFが検出されたが、bFGF/CP群は術後3日目で検出されなかった。
- 4) ラット歯周組織中における細胞増殖活性 : CB-bFGF/CP群では、bFGF/CP群と比較して、Ki67の陽性細胞数が術後5日目で顕著に増加した。PDGFR α の陽性細胞数は、両群とも術後3日目から5日目で増加したが、CB-bFGF/CP群でその傾向が顕著に認められた。
- 5) ラット歯周組織中におけるFGFR1陽性細胞と間葉系幹細胞の発現 : CB-bFGF/CP群とbFGF/CP群間でFGFR1陽性細胞数に差はなかったが、間葉系幹細胞数およびFGFR1陽性の間葉系幹細胞数は、CB-bFGF/CP群で増加する傾向があった。

以上のことから、中型動物においても歯周組織再生療法におけるCB-bFGFの有効性が示された。また、CB-bFGF/CPに使用により、局所組織におけるbFGFの滞留性が高まり、その作用を長期的に維持することで間葉系幹細胞の増殖が促進されることが示唆された。

これらの成果は、bFGFによる歯周組織再生療法の適応症を拡大させる可能性を示唆するものであり、中型動物での水平性歯槽骨吸収への有効性評価等さらなる研究の発展が期待される。よって本審査委員会は、本申請論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。