

Recombinant human growth/differentiation factor-5 induced bone formation on murine calvaiae

(Recombinant human growth/differentiation factor-5 はマウスの頭蓋において骨形成を促進する)
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
(指導教員 和泉雄一 教授)

申請者氏名 吉元剛彦

[背景と目的]

近年、歯周病によって破壊された歯周組織を再生するために、様々な治療法が検討されている。しかし、現在臨床応用されている歯周組織再生療法にはいくつかの問題点があり、それらを改善した新たな歯周組織再生療法の研究開発が待たれている。現在、創傷治癒や硬組織発生時に重要な役割を担う増殖因子が歯周組織再生においても有効であるものと期待され、研究が進められている。今回、我々は、TGF- β superfamily に属する増殖因子のひとつである Growth/differentiation factor-5 (以下 GDF-5) に着目した。

GDF-5 は MP 52 等の別名をもつ増殖因子で、骨格形成予定領域に凝集した間葉系細胞に発現し、後に、四肢の長軸方向の成長をはじめ、関節・腱・靭帯の形成過程で発現・機能している。GDF-5 遺伝子の変異によりマウスにおいては、四肢の骨格の短縮が、ヒトにおいては、Hunter-Thompson 型 骨軟骨異形成症が発症することが知られている。また、recombinant human GDF-5 (rhGDF-5) の生物学的作用として、齧歯類において、異所性の骨・軟骨及び腱・靭帯様組織の形成、霊長類においては、頸骨骨欠損モデルでの治癒促進が認められている。そこで今回、マウスを用いた *in vivo* 実験系において、rhGDF-5 が骨形成に及ぼす影響を組織学的、免疫組織化学的、放射線学的手法を用いて検討した。また、rhGDF-5 が細胞増殖に与える影響を *in vitro* において検討した。

[材料と方法]

マウス頭蓋由来骨芽細胞(POB)、骨膜細胞 (POS)、マウス頭皮由来線維芽細胞 (CTF) を抽出し 10% FBS 添加・MEM 培地を用い培養した。上記の3種の細胞培養系に対して rhGDF-5 添加、非添加下で培養し、その細胞増殖能に与える影響を MTT 変法により解析した。

in vivo 実験においては ddy マウス、雄、8週齢を実験動物として使用した。

rhGDF-5 をアテロコラーゲンゲル(AC)を担体とし、pH 調整(pH 7.4)を行いよく混和した。成長因子投与のために rhGDF-5 (20 μ g)/AC (終濃度 0.5%)を、対照として 0.1N HCl (20 μ g/AC) (終濃度 0.5%)を準備した。全身麻酔後マウス頭蓋に rhGDF-5/AC を、対照として 0.1N HCl/AC を投与した。投与後 3, 7, 14, 21, 28 日後に屠殺、軟組織と共に頭蓋骨を採取した。4%パラホルムアルデヒド (pH 7.4, 24h, 4 $^{\circ}$ C) にて固定、EDTA (pH 7.4, 2~3週, 4 $^{\circ}$ C) にて脱灰、パラフィン包埋後、6 μ m 連続切片を作製した。組織染色としてヘマトキシリン・エオジン染色(H.E.)を、酸性ムコ多糖の発現を観察するためにアルシアンブルー染色(A.B.)を行った。免疫組織化学的染色として抗タイプ I コラーゲン、抗タイプ II コラーゲン、抗 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)、抗 TRAP 染色を行った。いずれも、streptavidin-peroxidase法を用い DAB にて発色した。

投与後 14 日後の個体について MCT-CB100MFZ[®] (株式会社日立メディコ) を用い CT 断層撮影を行った。撮影によって得られた画像を Micro CT Pro[®] (株式会社ケーゲーティ) を用いて 3次元構築を行った。

[結果及び考察]

1. POB, POS, CTF の細胞増殖能は rhGDF-5 非添加群と比較して、rhGDF-5 添加群において有意に上昇していた。

2. rhGDF-5/AC 投与後 3 日、7 日において膨隆が観察され、その膨隆には細胞が侵入し、その殆どが PCNA 免疫染色に対し陽性を示していた。rhGDF-5/AC 投与後 3、7 日後においては硬組織の形成は認められなかった。投与後 14 日では骨膜において僅かに PCNA 陽性を示す細胞が認められた。

3. rhGDF-5/AC 投与後 14、21 日後において軟骨、骨様の組織の形成が観察された。形成された硬組織中には骨髓腔様の構造も認められた。14、21 日後において認められた硬組織はアルシアンブルー、抗 II 型コラーゲン免疫染色に対する反応が強く軟骨様である事が示唆された。

4. rhGDF-5/AC 投与後 28 日においても軟骨、骨様の硬組織形成が認められ、骨髓腔様の構造も観察された。28 日後において認められた硬組織は抗 I 型コラーゲン免疫染色に対し強い反応を示し骨様である事が示唆された。また、骨髓腔様の組織中に TRAP 陽性の多核細胞が観察された。

以上の結果より rhGDF-5 は細胞増殖、細胞外基質の産生を促進することが明らかとなった。rhGDF-5/AC 複合体は異所性の骨形成を促進する上で有効であり、その骨形成の過程は内軟骨性骨化に類似していることが明らかとなった。

(Journal of Periodontal Research, 2005 掲載予定)

報告番号	歯研第128号		氏名	吉元 剛彦	
論文審査担当者	主査	和泉 雄一			
	副査	中村 典史	馬嶋 秀行	田沼 順一	

Recombinant human growth/differentiation factor-5 induced bone formation on murine calvariae

(Recombinant human growth/differentiation factor-5 はマウスの頭蓋において骨形成を促進する)

歯周病によって破壊された歯周組織を再生するために、様々な治療法が検討されている。しかし、現在臨床応用されている歯周組織再生療法にはいくつかの問題点があり、それらを改善した新たな歯周組織再生療法の研究開発が待たれている。現在、創傷治癒や硬組織発生時に重要な役割を担う増殖因子が歯周組織再生においても有効であるものと期待され、研究が進められている。TGF- β superfamily に属する増殖因子のひとつである Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) は、骨格形成予定領域に凝集した間葉系細胞に発現し、四肢の長軸方向の成長をはじめ、関節・腱・靭帯の形成過程で発現・機能している。Recombinant human GDF-5 (rhGDF-5) の生物学的作用として、齧歯類において、異所性の骨・軟骨及び腱・靭帯様組織の形成、霊長類においては、頸骨骨欠損モデルでの治癒促進が認められている。そこで、本論文では、マウスを用いた *in vivo* 実験系において、rhGDF-5 が骨形成に及ぼす影響を組織学的、免疫組織化学的、放射線学的手法を用いて検討した。また、rhGDF-5 が細胞増殖に与える影響を *in vitro* において検討した。

その結果、

1) マウス頭蓋由来骨芽細胞、骨膜細胞、マウス頭皮由来線維芽細胞の細胞増殖能は rhGDF-5 非添加群と比較して、rhGDF-5 添加群において有意に上昇していた。

2) rhGDF-5/AC 投与後 3 日、7 日において膨隆が観察され、その膨隆には細胞が侵入し、そのほとんどが PCNA 免疫染色に対し陽性を示していた。rhGDF-5/AC 投与後 3、7 日後においては硬組織の形成は認められなかった。投与後 14 日では骨膜において僅かに PCNA 陽性を示す細胞が認められた。

3) rhGDF-5/AC 投与後 14、21 日後において軟骨、骨様の組織の形成が観察された。形成された硬組織中には骨髓腔様の構造も認められた。14、21 日後において認められた硬組織はアルシアンブルー、抗 II 型コラーゲン免疫染色に対する反応が強く、軟骨様である事が示唆された。

4) rhGDF-5/AC 投与後 28 日においても軟骨、骨様の硬組織形成が認められ、骨髓腔様の構造も観察された。28 日後において認められた硬組織は抗 I 型コラーゲン免疫染色に対し強い反応を示し骨様である事が示唆された。また、骨髓腔様の組織中に TRAP 陽性の多核細胞が観察された。

本論文は、rhGDF-5/アテロコラーゲンによる骨形成メカニズムを明らかにしたものであり、そのメカニズムは、軟骨を経て骨化する内軟骨性骨化に類似したものであることが示された。また、*in vitro* において、細胞増殖促進作用があることも明らかとなった。これらの結果より、rhGDF-5/AC は異所性の骨形成を促進する上で有効であり、歯周病などにより失われた骨再生の可能性を示唆し、rhGDF-5 の歯周組織再生療法への応用を検討する上で、極めて有効な基礎情報を提供している。

よって、本審査委員会は、本論文が学位論文として十分に価値があるものと判断した。

最終試験の結果の要旨および担当者

様式 8

報告番号	歯研第128号	氏名	吉元 剛彦	
論文審査担当者	主査	和泉 雄一		
	副査	中村 典史	馬嶋 秀行	田沼 順一

審査委員会は平成17年10月31日（月）、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めるとともに、これと関連した細胞増殖因子および細胞生物学的諸問題、手技や研究結果の解釈および歯周組織再生療法との関連に関する事項について試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。

以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格をもつと判断した。