

氏名（本籍）：高^{こう}山^{やま}慎^{しん}騎^き（埼玉県）

学位の種類：博士（歯学）

学位記番号：歯博第 968 号

学位授与年月日：2022 年 3 月 25 日

学位授与の要件：学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科・専攻：東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目：リン酸オクタカルシウム系人工材料による骨再生における血管新生の役割に関する研究

論文審査委員：（主査）教授笹野 泰之教授高橋 哲教授鈴木 治

論文内容要旨

氏名 高山 慎騎

【目的】欠損した骨組織を修復する方法に、自家骨の移植が第一に選択されているが、正常組織の侵襲や採取量の制限といった問題から、人工骨再生材料が注目されてきている。しかし、人工骨再生材料の骨再生能は十分とはいえず、さらなる研究が必要である。血管新生は骨再生において良好な予後に影響をもたらす要因とされ注目されており、早期の血管新生は、酸素や栄養素などを供給し、幹細胞を運ぶことで骨芽細胞を増殖させ骨再生に寄与する。銅イオンは血管内皮細胞増殖因子の発現を増大させるなどで血管新生を促進する。

リン酸オクタカルシウム (OCP) は高い吸収骨置換性を示し、近年は *in vivo* において、初期の骨再生において血管新生を促進させ、骨形成を促進させることが報告されている。しかし、血管新生が OCP による骨再生に及ぼす影響の詳細については未だ不明である。本研究では、OCP に血管新生促進作用のある銅イオンを含有させた Cu-OCP を作製し、血管新生が OCP による骨再生をどのように調節するのか明らかにすることを目的とした。

【方法】OCP は湿式法により合成した。また、グルコン酸銅を用いて銅が低含有量 (low-Cu-OCP) もしくは高含有量 (high-Cu-OCP) の OCP を合成した。顆粒径を 300~500 μm に整粒した。 *in vitro* においては、トランスウェルを用いて、規定量の OCP もしくは high-Cu-OCP と low-Cu-OCP に加え、OCP と high-Cu-OCP もしくは low-Cu-OCP を同量ずつ配合した試料 (high-Cu-OCP+OCP もしくは low-Cu-OCP+OCP) を調製し、共存下でヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を培養した。24 時間培養後、HUVECs が形成する架橋構造の数および長さを計測した。また、マウス骨髄由来間葉系幹細胞株 (D1 細胞) を規定量の OCP、low-Cu-OCP、low-Cu-OCP+OCP 共存下で培養した。培養 14 日後に DNA 量および ALP 活性を測定し、骨芽細胞分化能を評価した。

in vivo 試験では、顆粒径 300~500 μm の OCP もしくは low-Cu-OCP を Gel と混合し、直径 9 mm の複合体ディスクを作製した。これらを Wistar rat (12 週齢、雄性) の頭蓋冠に作製した臨界径骨欠損 (直径 9 mm) に埋入した。2 および 4 週間後に組織を回収し、X 線造影剤 (Microfil[®]) にて造影後に μCT を撮影し、血管新生と骨形成を評価した。また、血管新生の評価では、組織学的解析も実施した。

【結果】 *in vitro* での検討の結果、low-Cu-OCP 共存下において、最も HUVECs が形成する管腔構造の架橋点が増加し、長さが減少する傾向にあることが示された。このことから、 *in vitro* では最適な銅含有量によって OCP が HUVECs の管腔構造形成促進に影響を及ぼすことが示唆された。D1 細胞の培養においては、試料の銅イオン含有量増えるほど ALP 活性の値が低下することから、銅イオンによって骨芽細胞の分化が抑制された可能性が示唆された。 *in vivo* においては、血管新生量および骨形成量ともに、OCP/Gel 群よりも low-Cu-OCP/Gel 群で多く認められた。特に OCP/Gel 群では 2 週間で多くの血管新生が誘導され、4 週間では増加しないが、low-Cu-OCP/Gel 群では 4 週間でさらに血管新生が促進された。

【結論】銅イオンを含有させた OCP は血管新生を促進するとともに骨形成を促進する可能性が示唆された。

審査結果要旨

氏名 高山 慎騎

欠損した骨組織を修復する方法に、自家骨の移植が第一に選択されているが、正常組織の侵襲や採取量の制限といった問題から、人工骨再生材料が注目されてきている。しかし、人工骨再生材料の骨再生能は十分とはいえず、さらなる研究が必要である。血管新生は骨再生において良好な予後に影響をもたらす要因とされ注目されており、早期の血管新生は、酸素や栄養素などを供給し、幹細胞を運ぶことで骨芽細胞を増殖させ骨再生に寄与する。銅イオンは血管内皮細胞増殖因子の発現を増大させるなどで血管新生を促進する。リン酸オクタカルシウム (OCP) は高い吸収骨置換性を示し、近年は *in vivo* において、初期の骨再生において血管新生を促進させ、骨形成を促進させることが報告されている。しかし、血管新生が OCP による骨再生に及ぼす影響の詳細については未だ不明である。本研究では、OCP に血管新生促進作用のある銅イオンを含有させた Cu-OCP を作製し、血管新生が OCP による骨再生をどのように調節するのか明らかにすることを目的とした。

OCP は湿式法により合成した。また、グルコン酸銅を用いて銅が低含有量 (low-Cu-OCP) もしくは高含有量 (high-Cu-OCP) の OCP を合成した。顆粒径を 300~500 μm に整粒した。*in vitro* においては、トランスウェルを用いて、規定量の OCP もしくは high-Cu-OCP と low-Cu-OCP に加え、OCP と high-Cu-OCP もしくは low-Cu-OCP を同量ずつ配合した試料 (high-Cu-OCP+OCP もしくは low-Cu-OCP+OCP) を調製し、共存下でヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を培養した。24 時間培養後、HUVECs が形成する架橋構造の数および長さを計測した。また、マウス骨髄由来間葉系幹細胞株 (D1 細胞) を規定量の OCP、low-Cu-OCP、low-Cu-OCP+OCP 共存下で培養した。培養 14 日後に DNA 量および ALP 活性を測定し、骨芽細胞分化能を評価した。*in vivo* 試験では、顆粒径 300~500 μm の OCP もしくは low-Cu-OCP を Gel と混合し、直径 9 mm の複合体ディスクを作製した。これらを Wistar rat (12 週齢、雄性) の頭蓋冠に作製した臨界径骨欠損 (直径 9 mm) に埋入した。2 および 4 週間後に組織を回収し、X 線造影剤 (Microfil[®]) にて造影後に μCT を撮影し、血管新生と骨形成を評価した。また、血管新生の評価では、組織学的解析も実施した。

in vitro での検討の結果、low-Cu-OCP 共存下において、最も HUVECs が形成する管腔構造の架橋点が増加し、長さが減少する傾向にあることが示された。このことから、*in vitro* では最適な銅含有量によって OCP が HUVECs の管腔構造形成促進に影響を及ぼすことが示唆された。D1 細胞の培養においては、試料の銅イオン含有量増えるほど ALP 活性の値が低下することから、銅イオンによって骨芽細胞の分化が抑制された可能性が示唆された。*in vivo* においては、血管新生量および骨形成量ともに、OCP/Gel 群よりも low-Cu-OCP/Gel 群で多く認められた。特に OCP/Gel 群では 2 週間で多くの血管新生が誘導され、4 週間では増加しないが、low-Cu-OCP/Gel 群では 4 週間でさらに血管新生が促進された。

銅イオンを含有させた OCP は血管新生を促進するとともに骨形成を促進する可能性が示唆された。本研究の成果は骨再生研究および臨床歯科の分野に大きく貢献することが期待され、博士 (歯学) の学位論文として相応しいと判断する。