

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791928

研究課題名（和文） 新規アプローチによる骨再生誘導法開発

研究課題名（英文） Development of guided bone regeneration method by a novel approach.

研究代表者

片渕 三千綱（KATAFUCHI MICHITSUNA）

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90454933

研究成果の概要（和文）：

歯牙を失った後の欠損部の修復に、インプラント治療は予知性のある治療法である。欠損部には骨が不足することが多く、侵襲の少ない骨再生誘導法の開発が求められている。本研究では、細胞外に存在するタンパク質 G11 (von Willebrand factor C domain containing 2, Vwc2) により、骨欠損部に骨を回復する可能性を検証した。結果として、骨様組織の添加量の差は不明であったが、添加の仕方に違いを認めた。G11 により異所性に骨を添加できる可能性があるため、タンパク量や投与方法によっては効果的な骨再生誘導の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Implant treatment is predictable to restore edentulous areas after teeth are lost. A development of less-invasive guided bone regeneration method has been required, since the amount of bone of edentulous area is inadequate in many cases. In this study, a possibility of bone formation by an extracellular protein G11 (von Willebrand factor C domain containing 2, Vwc2) was examined. As a result, the pattern of newly formed bone-like tissues in G11 group was different from that in control group, though the difference in amount was unclear. Since G11 might induce ectopic bone formations, it is indicated that G11 may contribute to the effective guided bone regeneration through propriety of protein amount and administration method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨再生誘導、石灰化、骨芽細胞、G11、抗体

## 1. 研究開始当初の背景

審美回復と機能回復が求められる現在の

補綴臨床において、インプラントによる欠損部修復は最も予知性の高い治療法の一つである。近年に於いては、良好な結果・予後を

得るために、最終補綴物に対して理想的な位置にインプラント埋入を行う補綴主導型のインプラント治療が求められる。しかし、欠損部の顎堤の形態はインプラント埋入に対して理想的な形態をしていることは稀であり、埋入手術前あるいは同時に骨移植を必要とする場合が多い。患者に対する侵襲が少なく、特別な技術を必要としない骨再生誘導法の開発は多くの臨床家の望むところであり、高齢化社会においてインプラント治療を希望する患者にとって期待度も非常に大きい。

骨のリモデリングは、骨芽細胞による骨添加と破骨細胞による骨吸収により成り立っている。骨粗鬆症などの骨疾患に対しては、ビスフォスフォネートなどの破骨細胞機能阻害薬が主に用いられている。近年、破骨細胞の分化に必要な RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand) に対するヒトモノクローナル抗体が、破骨細胞分化に抑制的に働き、骨量を改善することも報告された。しかし、このように破骨細胞の機能を抑制することによる相対的な骨量の増加は、局所における積極的な造骨を必ずしも期待できず、口腔内局所に対する積極的な骨再生誘導法には不適切である。これに対して、骨芽細胞の機能促進という観点からのアプローチは、口腔内という特殊な環境において再生する骨量、再生速度の改善を可能にすると思われる。

その一つとして、rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2) による局所的骨再生誘導に関する有用性が多くの研究報告で示され、2007 年には米国において rhBMP-2 を含んだ骨移植材の歯科領域適応が認可され、臨床で応用されることとなった。しかし、BMP-2 は生物学的に多機能であるが故、骨以外の組織への影響の懸念、担体の選択、投与量など未解決な問題も非常に多い。これに対してごく最近、整形外科領域を対象として“BMP 阻害分子を抑制することによる骨量の増加”という新しい治療法が確立されつつあり、臨床治験においても好成績を収めている。すなわち骨芽細胞の機能を阻害する分子をターゲットとしたのである。このことから顎骨においては、その適切な骨再生誘導のアプローチを行うために、顎骨における骨芽細胞阻害分子の探索とその機能解析は、極めて有効であると考えられる。研究代表者が以前所属していた研究室は、顎骨の骨芽細胞が発現する新規細胞外蛋白質である G11 遺伝子を単離し、骨芽細胞の機能を抑制する分子であることを報告した。

そこで研究代表者は、“G11 に対する抗体は、骨芽細胞の活性化を促進させ、また局所的な骨再生誘導に応用できる”と仮説を立てた。この仮説を検証するための本研究の具体的な目的を次に挙げる。

## 2. 研究の目的

本研究課題申請時における当初の研究目的

- (1) マウス G11 のモノクローナル抗体を作製する。
- (2) *In vitro* において、G11 抗体に対する骨芽細胞の表現型を解析する。
  - ① 骨芽細胞の石灰化が促進されるかを検証する。
  - ② 骨芽細胞の増殖・分化においてどのような変化があるかを明らかにする。
- (3) *In vivo* での骨再生誘導に対し、G11 の抗体が効果的かを検証する。

BMP を用いた骨再生誘導が多くの研究でその有用性が認められ、ついには歯科領域で臨床応用へ至った。BMP が効力を示さない場合の対応や、再生する骨量、再生速度の改善が今後の課題となると考えられる。他因子による新たな骨再生誘導のための本研究は、細胞増殖因子を直接作用させず、新規に発見された細胞外タンパク質の骨芽細胞への抑制的機能を対象とすることが、骨芽細胞活性化に有効であるというユニークな仮説のもとに成り立っている。本研究で対象となる G11 は、細胞外タンパク質であることから、*in vivo*、*in vitro* 両面での抗体による抑制が容易と考えられ、結果的に骨芽細胞活性を起すことが十分に考えられる。医科分野での遺伝学的診断学の急速な発展から、次代においては歯科分野でも患者個々の遺伝的背景に基づいた骨再生誘導法の適用が予想されるため、新たな骨再生誘導法確立を目指す本研究は極めて時宜を得た有意義なものと思われる。本研究の仮説が証明された場合、ヒト G11 抗体による骨再生誘導法の確立・臨床応用の礎となり、従来法との代替または併用をすることにより今後の課題を解決する一手段となり得るため、近年に於ける審美的インプラント治療の普及やカスタム医療の発展を考慮すると、歯科臨床上その意義は極めて大きい。

研究当初は、G11 抗体による骨芽細胞の石灰化の促進を予想していたが、それに反して G11 タンパク質自体の投与による骨芽細胞の石灰化促進が認められた。そこで本研究課題申請時における当初の研究目的を変更した。*In vivo* での骨再生誘導に対し、G11 の抗体が効果的かを検証するのではなく、G11 タンパク質自体の投与が効果的かを検証することに目的を変更した。

### 3. 研究の方法

マウス G11 抗体は、海外の研究協力者から購入した。これを用いて、*in vitro*における骨芽細胞石灰化促進と、*in vivo*における骨再生誘導の効果を検証することを当初の研究目的としていた。しかし予想に反して、G11 タンパク質自体を投与することにより、*in vitro*での骨芽細胞の石灰化促進と、*ex vivo*での頭蓋骨培養で骨様組織の増加が、研究協力者の実験で認められたため、G11 抗体ではなく、G11 タンパク質自体による骨再生誘導の効果を検証する実験へと途中で変更した。

麻酔下で 11 週齢の雄のラットの頭蓋骨に、トレフィンバーを用いて直径約 6mm の円形の骨欠損を作製した。G11 タンパク質

(Recombinant Human Brorin/VWC2) 0.5  $\mu$ g を染み込ませたコラーゲンスポンジ (コラブラグ) を填入し縫合した。コントロール群としてコラーゲンスポンジに BSA を染み込ませたものを使用した。G11 群とコントロール群でそれぞれ 4 匹ずつ準備した。術後 1 週後と 5 週後に、麻酔下で頭蓋骨骨欠損相当部をマイクロCTで撮影し、*in vivo*における G11 タンパク質の骨再生誘導の効果を検証した。骨欠損部のマイクロCT像の観察は、同一個体を継時的に行った。

### 4. 研究成果

術後 1 週後は、G11 群、コントロール群ともに骨欠損部には不透過像は認められなかった。5 週後になると、コントロール群では周囲骨の辺縁に不透過像が認められ、周囲骨からの骨様組織の添加が認められた。それに対し、G11 群では骨欠損の中央付近にも不透過像が認められ、中央付近からも骨様組織の添加が認められた。しかし、両群を比較した場合の骨様組織の添加量の差は不明であった。図 1 に骨欠損部のマイクロCT像を、図 2 に G11 群とコントロール群の経時的な比較における顕著な例を示す。

G11 は、cysteine knot protein (CKP) family に属し、骨芽細胞で発現し、骨中に存在する細胞外タンパク質である。研究協力者の実験により、G11 タンパク質自体を投与することにより、*in vitro*での骨芽細胞の石灰化促進と、*ex vivo*での頭蓋骨培養で骨様組織の増加が認められたため、G11 は骨芽細胞の活性化を促進することが考えられる。本研究における *in vivo*での結果を考慮すると、実際の骨欠損中に過剰に存在した場合、骨芽細胞の活性化を通して異所性に骨様組織を形成することが考えられる。G11 の骨中における分子生物学的役割は明確にはされていないが、G11 タンパク質の投与により異所性の骨様組織を添加できる可能性があり、タンパ

ク量や投与方法によっては、効果的な骨再生誘導の可能性が示唆された。

本研究は当初、骨芽細胞の機能を抑制する分子をターゲットとし、その抑制を行うことで、骨芽細胞の活性化を促進させようとしたものであり、また抗体を使用することでそれを容易に行うことを考えていた。当初の仮説とは反するが、G11 タンパク質も抗体と同様に細胞外に使用できるものであり、異所性の骨様組織の添加を認めたことは、局所的な骨再生誘導に応用できる可能性が示唆されるため有意義な結果であると思われる。将来的には、BMP などの現在臨床応用が可能な細胞増殖因子が効力を示さない場合への対応や、再生する骨量、再生速度の改善などに応用できる可能性も示唆された。

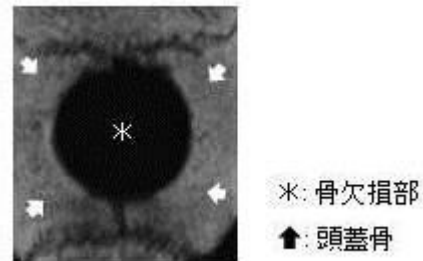


図 1 骨欠損部のマイクロCT像

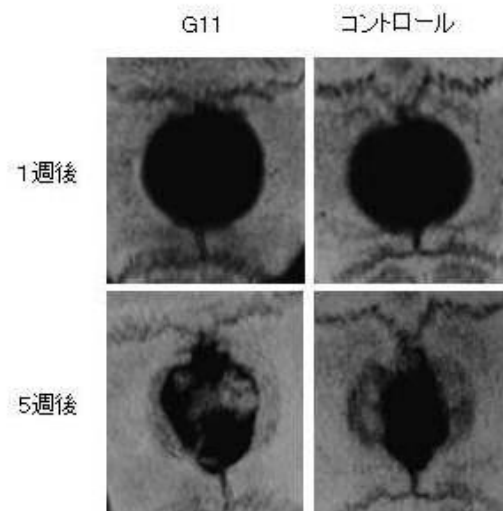


図 2 G11 群とコントロール群の経時的比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Ohyama Y, Katafuchi M, Almeahmadi A, Venkitapathi S, Jaha H, Ehrenman J, Morcos J, Aljamaan R, Mochida Y. Modulation of matrix mineralization by Vwc2-like protein and its novel splicing isoforms. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2012 Feb 3;418(1):12-6.

[学会発表] (計1件)

- ① Ohyama Y, Katafuchi M, Almeahmadi A, Venkitapathi S, Jaha H, Ehrenman J, Morcos J, Aljamaan R, Mochida Y. Modulation of matrix mineralization by Vwc2-like proteins. IADR, #162935, 2012, Iguacu Falls, Brazil (2012年6月予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片渕 三千綱 (KATAFUCHI MICHITSUNA)  
福岡歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：90454933

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

持田 欣幸 (MOCHIDA YOSHIYUKI)  
ボストン大学・歯学部・准教授