

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24792190

研究課題名(和文) FGF-2徐放を用いた低侵襲で確実性のある歯槽骨再生—生物学的裏付けを伴う組織工学

研究課題名(英文) A highly reliable alveolar bone regeneration using controlled release of FGF-2;
tissue engineering with biologic proof

研究代表者

小玉 直樹 (KODAMA, Naoki)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：90572355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの上顎骨へFGF-2を投与することにより生じる骨再生の至適条件を検索した。ゼラチンハイドロゲルを用いて20 μ gのFGF-2を徐放することで良好な骨再生が得られた。組織学的な解析からは、少量ながら骨膜性の皮質骨添加が確認された。また、FGF-2は骨膜に含まれるFGF受容体を発現している骨芽細胞を増殖させ、骨基質産生を促し、結果として既存骨への骨添加が生じると考えられ、一連の骨再生現象が4週間で終息することから、反復投与による相加的な再生効果が得られる可能性が示唆された。そのため、さらなる解析が望まれる。

研究成果の概要(英文)：It is reported that FGF-2 which is an anti-ulcer drug causes a bone regeneration. We searched optimal condition of the murine alveolar bone regeneration in mouse by FGF -2. The controlled released 20 microgram FGF-2 using gelatin hydrogel occurred good bone regeneration. From histologic analysis, periosteum-related cortical bone addition was confirmed. Also, FGF-2 proliferated the osteoblasts which expressed the FGF receptor included in the periosteum and promoted a bone matrix production, and the additive bone regeneration to, as a result, existing bones was thought. Because a series of bone regeneration phenomena ended in four weeks, the possibility that the additive reproduction effect with repeated doses was obtained was suggested. Further analysis is expected.

研究分野：外科系歯学

キーワード：FGF2 骨再生 歯槽骨 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

FGF-2 は近年、褥創性潰瘍治療薬として臨床応用されているが、in vivo において骨形成活性を持つことも報告されており、ゼラチンハイドロゲルを徐放キャリアーとして FGF-2 を局所投与することにより有意な量の歯槽骨再生が生じる。この実験系では FGF-2 の組織内徐放により、局所の骨芽細胞系細胞の一過性増殖と分化促進が生じ、皮質骨添加を得ることが可能である。しかし、歯科インプラントを植立するためには十分な再生骨量とはいえず、臨床的有用性を得るためには再生骨量を増加させることが求められる。この FGF-2 徐放製剤による骨再生を歯科インプラント症例への応用へ近づけるために、FGF-2 徐放製剤の反復投与を行うことで低侵襲に必要な部位へ必要とする量だけ皮質骨を再生・添加させることが可能になると考えられた。このような、組織採取や細胞培養を必用としない簡便な方法で確実な骨再生をもたらすシステムの臨床応用はいまだ例が無い。可能になれば歯科インプラント症例の適応拡大や唇顎口蓋裂治療における骨移植の代替など患者が受ける利益は大きい。

2. 研究の目的

(1) FGF-2 徐放システムの反復応用による骨再生現象の実証

FGF-2 徐放製剤を用いた低侵襲な歯槽骨再生の実用可能性を検索する。マウスを用いた実験系で有意な骨再生が生じる条件と反復応用の可能性を検索する。

(2) 分子生物学的な根拠の裏付け

組織像、細胞増殖、分化マーカーの発現を解析し、FGF2 刺激が組織・細胞に及ぼす影響を骨芽細胞系細胞の分化・増殖に関連する分子機構の一端を in vivo の環境で検証することでこの再生法に生物学的裏付けを付与する。

3. 研究の方法

(1) FGF-2 徐放システムの反復応用による骨再生現象の実証

ゼラチンハイドロゲルの調整

グルタルアルデヒドで架橋したゼラチンハイドロゲル (MW=99,000、等電点=5、含水率 98%、2.5×2.5×2.5mm) を既報に従い作製した。このハイドロゲルは歯槽骨内で FGF-2 を約 1 週間かけて徐放することを確認している。

動物実験

5 週齢雌 ddY:Std マウス (体重 24.0g ± 2.0g) の腹腔内へ 110mg/Kg のケタミンと 13.2mg/Kg のキシラジンを投与することにより全身麻酔状態を得た。消毒条件下にて鼻背正中部へ縦方向に 2mm の切開を入れ、鼻背部から右側上顎切歯歯槽骨へ向かって盲嚢状の皮膚骨膜弁を形成し、その内部へ FGF-2 を含浸したゼラチンハイドロゲルを埋入した後、切開部位を縫合した。対照として PBS を含浸したゼラチンハイドロゲルを同様の操作で埋入した。全ての操作は手術顕微鏡下で

行った。

骨形成量の評価

単回投与での至適投与条件を検索するため、FGF-2 の水溶液投与を対照として、1, 10, 20, 50 μg の FGF-2 を徐放し、28 日後に X 線写真を用いて歯槽骨形成量を評価した。評価は健側の歯槽骨厚と実験側の歯槽骨の厚みの比とした。

組織学的な評価

ゼラチンハイドロゲル埋入後 7, 14 および 28 日後、FGF-2 徐放群および対照群のマウスをそれぞれ安楽死させた直後に 4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝溶液 (pH7.4) を灌流し固定を行った。続いて、4℃、24 時間の浸漬固定を加えた後、4℃、240mM の EDTA-リン酸緩衝に 28 日間、浸漬することで骨組織の脱灰を行った。続いて、エタノール上昇系列による脱水を行い、キシレン置換、パラフィン包埋を行い、3 μm の前頭断切片を作製し、シランコートスライドガラスに貼り付けた。次にマイヤーのヘマトキシリンおよび 0.25%エオジン-60%エタノール-0.05%酢酸にて染色を行った。染色後は光学顕微鏡を用いて再生骨の組織学的な性状を確認した。

(2) 分子生物学的な根拠の裏付け

標本の作成

骨形成過程にある FGF-2 徐放開始 7 日目に脱灰標本および非脱灰凍結標本を作成した。脱灰標本では 4%パラホルムアルデヒドで還流固定した後に 10%EDTA で脱灰し、パラフィン包埋、薄切を行った。非脱灰標本では液体窒素に浸漬して凍結した後に骨膜および歯槽骨を切除し、凍結切片を作成した。

アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色

骨形成過程の骨膜組織における骨芽細胞系細胞の分布を評価するために、アルカリホスファターゼ酵素染色を行った。0.1%ファストレッド TR 塩、0.02%ナフトール AS-MX リン酸-0.1M トリス塩酸緩衝溶液 (pH8.5) で 10 分間、室温でインキュベーションした。0.1%メチルグリーンにて対比染色を行った後、水溶性封入剤を用いて封入し光学顕微鏡で観察した。

PCNA 免疫染色

細胞増殖活性を評価するために、埋入後 7, 14 および 28 日目の脱灰パラフィン包埋切片スライドを用いて PCNA の免疫染色を行った。PCNA の抗原性を賦活するために 0.05% Tween20-10mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で 30 分間、オートクレーブ処理 (121℃) を行った。次に、3%過酸化水素 PBS 溶液にて室温、30 分インキュベートした後、5%スキムミルク-0.05% Tween20/PBS 中で 1 時間、37℃ でインキュベートした。続けて 150 倍に希釈した抗 PCNA マウスモノクローナル抗体 (clone10 M0879 DAKO) で 2 時間、室温でインキュベートした。PCNA 抗体の検出には ENVISION (DAKO) を使用した。DAB 基質溶液で発色を行った後、マイヤーのヘマトキシリンで対比染色を行った。染色後は光学顕微鏡

を用いて観察した。

In situ hybridization

骨形成過程の骨膜における FGF 受容体、Runx2 および骨基質蛋白をコードする mRNA の発現分布を検証するために新鮮凍結切片を用いて insitu ハイブリダイゼーションを行った。

ジゴキシゲニン(DIG)標識 cRNA プローブの準備: ddY マウスの上顎骨より抽出した totalRNA を用いて、cRNA プローブ認識部位 [表 1] を増幅させる RT-PCR を行った。逆転写と PCR はそれぞれ INVITROGEN と ROCHE のプロトコルに従った。それぞれの PCR 産物を T7 および T3 RNA 転写酵素のプライミング領域を持つプラスミドベクター (pCR4) を用いて、クローン化を行った。プラスミドベクターは Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて精製した。クローン化とプラスミドベクターの精製方法は INVITROGEN および QIAGEN のプロトコルに従った。DIG 標識 cRNA プローブは T7 もしくは T3RNA 転写酵素を用いて 7.5mM の ATP, 7.5mM の GTP, 7.5mM の CTP, 4.875mM の UTP, 2.625mM の DIG-11-UTP (Roche) を含む RNA 転写バッファー中で 2 時間、37 °C で転写した。転写されたプローブはドットプロット法により DIG の標識効率がそれぞれのセンスプローブとアンチセンスプローブで同等であることを確認した。

OCT コンパウンドで包埋した新鮮凍結標本から作製した 8µm 厚の凍結切片をシランコートスライドガラスに貼り付け、4%パラホルムアルデヒド-100mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4) で 20 分間、室温で固定した。次に、2×SSC で洗浄した後、1.0 [µg/ml] ProteinaseK -50mM トリス塩酸 (pH7.4) -5mMEDTA で 8 分間、室温でインキュベートした。続いて、100mM グリシン-100mM トリス塩酸 (pH7.4) で 10 分間、室温でインキュベートし、2×SSC で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝溶液 (pH7.4) で 5 分間、室温で後固定を行った。その後 2×SSC で洗浄し、室温で 20 分かけてアセチル化を行った。2×SSC で洗浄した後、プローブを含まないハイブリダイゼーション溶液 (50%脱イオン化ホルムアミド, 3×SSC, 1×デンハルト, 0.02%ドデシル硫酸ナトリウム, 250ng/µl の断片化したサケ精子 DNA, 250ng/µl のイースト菌 tRNA, 50mM トリス塩酸 (pH7.4)) で 2 時間、54 °C でプレハイブリダイゼーションを行った。引き続き 800-1000ng/µl の DIG 標識 cRNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液で 14 時間、54 °C でハイブリダイゼーションを行った。次に、2×SSC で 54 °C, 15 分間×2 回、洗浄した後、ハイブリダイズしていないプローブを 20 µg/ml RNaseA -50mM トリス塩酸 (pH7.4) -150mM 塩化ナトリウム-1mM EDTA で 37 °C, 30 分間インキュベートすることで分解した。次に 1×SSC で 54 °C, 15 分間×2 回、の洗浄, 0.2×SSC で 54 °C, 15 分間の洗浄, 0.1×SSC で 40 °C, 15 分間の洗浄,

0.1×SSC で室温, 15 分間の洗浄を行った。次にブロッキング試薬 (Roche) -0.05% Tween20-マレイン酸バッファーで室温、60 分インキュベートし抗体の非特異的な吸着を予防した。次にアルカリホスファターゼ標識ウサギ抗 DIG ポリクローナル抗体 (DAKO) を 150 倍希釈し室温で 2 時間インキュベートした。0.05% Tween20-マレイン酸バッファーで洗浄した後、2.0mM テトラミゾール塩酸塩-100mM トリス塩酸 (pH9.5) -100mM 塩化ナトリウム-50mM 塩化マグネシウムで洗浄し、2.0mM テトラミゾール塩酸塩-BCIP/NBT 基質溶液 (DAKO) で 4, 30 分~14 時間インキュベートすることによりアルカリホスファターゼの検出を行った。エンテランを用いて標本を封入し、光学顕微鏡にて観察した。

表1 RNAプローブの認識部位

| Target gene | Probe name | Accession Number | Recognition site | Length (mer) |
|---|----------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Fibroblast growth factor receptor 1 | FGFR1 | NM_010206 | 902-1638 | 737 |
| Fibroblast growth factor receptor 2 transcript variant 1 | FGFR2 IIIc | NM_010207 | 711-1283 | 573 |
| Fibroblast growth factor receptor 3 | FGFR3 | NM_008010 | 1555-1841 | 287 |
| Runt related transcription factor 2/Core binding factor 1 | Runx2 | NM_009820 | 583-1349 | 767 |
| Alkaline phosphatase 2 | Alkaline phosphatase (ALP) | NM_007431 | 1151-2087 | 947 |
| Secreted phosphoprotein 1 | Osteopontin (OP) | NM_009263 | 165-968 | 803 |
| Bone gamma carboxyglutamate protein 1 | Osteocalcin (OC) | NM_007541 | 26-414 | 388 |

定量的 RT-PCR

骨形成過程の骨膜における FGF 受容体、FGF-2、Runx2 および骨基質蛋白をコードする mRNA の発現量を検証するために、ゼラチンハイドロゲル埋入後 7 日目における骨膜のリアルタイム RT-PCR を行った。RNA はレーザー顕微解剖により骨膜組織のみを選択的に回収し、抽出した。

Total RNA の抽出: OCT コンパウンドで包埋した新鮮凍結標本から作製した 9µm 厚の新鮮凍結切片をフォイル付きスライドガラスへ貼り付けて乾燥させた。次に、99.5%メタノールで 5 分間固定した後、1.0%トルイジンブルーを用いて染色し、100%エタノールへ 15 秒間ずつ 2 回浸漬し再び乾燥させた。その後、レーザー顕微解剖システム (Leica Microsystems) を用いて骨膜構成細胞を 1 検体につき 5×10^3 個以上回収した。以上の操作は全て 16 °C に調整した室温下で行い、1 標本ずつ速やかに遂行した。回収した組織からの total RNA 抽出には RNeasy Micro KIT (QIAGEN) を用い、DNase 処理を含む RNA 抽出手順は QIAGEN のプロトコルに従った。標本は FGF-2 徐放群の骨膜、対照として PBS を含浸したゼラチンハイドロゲルを埋入した部位の骨膜および正常な骨膜組織をそれぞれ 5 検体ずつ用いた。

cDNA の合成: 抽出した total RNA を逆転写し、cDNA を合成した。逆転写には SuperScript

System for RT-PCR (INVITROGEN) を使用し、その手順は INVITROGEN のプロトコルに従った。定量的 RT-PCR : 標的遺伝子に特異的な PCR プライマー対を設定した [表 2]。PCR 増幅産物の長さは 82 ~ 245bp の範囲とし、アンチセンスプライマーとセンスプライマーはゲノム DNA 上で 500bp 以上の intron を介在する異なる exon 上に設定するか、もしくはプライマー対の少なくとも一方を exon junction に設定した。

mRNA の定量に先立ち、PCR で増幅する領域を含んだ DNA 断片をクローニングし、既知コピー数の DNA 鋳型をそれぞれのプライマーごとに準備した。DNA 鋳型の作製には TOPO Cloning KIT (INVITROGEN) を用い、その手順は INVITROGEN のプロトコルに従った。PCR とその増幅産物のリアルタイム検出は ExTaq と SYBRGreen を用いたインターカレーター法で行った。PCR 反応液の組成は 5.0mM の塩化マグネシウム、それぞれ 0.3mM の dNTP、1/25000 希釈 SYBRGreen , 160nM のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを含む PCR バッファーとした。サーマルサイクラーは SmartCycler System (Cepheid) を使用し、PCR 反応中に増幅される 2 本鎖 DNA の量を SYBRGreen の蛍光強度を測定することでリアルタイムに計測した。PCR サイクルは 95 10 秒の初期熱変性を行った後、56, 58 もしくは 60 で 20 秒のアニーリング、72 で 15 秒の伸長反応と蛍光検出、95 で 5 秒の変性サイクルを蛍光強度が閾値に達してから 6 サイクル行った。蛍光検出の閾値は PCR 産物の指数関数増殖期に設定した。PCR サイクルは 40 サイクル以内とした。PCR 終了後、60 から 95 へ 0.2 /秒の速度で標本温度を上昇させ、連続的に蛍光を検出することで熱融解曲線を作製した。それぞれのプライマーごとに、 10^7 から 10 コピーまでの DNA 対数希釈系列を鋳型とした PCR 反応を行うことで検量曲線を作製した。次に、合成した cDNA を用いて PCR 反応を行い、蛍光強度が閾値に達したサイクル数と検量曲線を用いて標本に含まれていた各 mRNA 分子のコピー数を算出した。mRNA 分子のコピー数は GAPDH をコードする mRNA 分子のコピー数で標準化した。

表2 PCRプライマーの設定

| Target gene (mouse) | Primer name | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') | GenBank accession number and location | Product size (bp) | Exon boundary |
|---|-------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------|
| Glyceroldehydro-3-phosphate dehydrogenase | GAPDH | CCTGGAGAAACCTGCCAAGT ATG | AGAGTGGGAGTTGGTGTGAAGTC | NM_008084 794-906 916-893 | 133 | + |
| Procollagen, type 1, alpha 1 | ProColl1a1 | TGACCGATGGATTCCCGTTC | TCTTGAGGTTGCCAGTCTGCTG | NM_007742 4055-4074 4222-4201 | 168 | + |
| Alkaline phosphatase 2 | ALP | CAACTCCATCTTTGGTCTGGCTC | GACATTTTCCCGTTCACCGTC | NM_007431 1358-1380 1475-1455 | 118 | + |
| Secreted phosphoprotein 1 | OP | CACITTTCACTCCAAATGCTCCCTAC | TGTGGCATCAGGATACTGTTCAATC | NM_009263 608-632 732-709 | 124 | + |
| Bone gamma carboxylglutamate protein 1 | OC | CCATCTTTCTGCTCAGCTCTGCTG | CTTGAGGCCATCTGGTCTGATAGG | NM_007541 26-48 270-246 | 245 | + |
| Runt related transcription factor 2 | Runx2 | ATGATGACACTGGCACTCTGAC | AACTGCCCTGGGGTCTGAAAAGG | NM_008820 1247-1269 1352-1330 | 106 | + |
| Fibroblast growth factor receptor 1 | FGFR1 | ATCGGAGGCTGACATTCAGTG | ATACTCCCGGATCCTCAAG | NM01 0206 902-923 1074-1053 | 173 | + |
| Fibroblast growth factor receptor 2 | FGFR2 | AGAAGAGCCAGCAACCAATACC | AGATACTCCCGAATAAGCACTGTC | NM_01 0207 711-733 881-857 | 171 | + |
| Fibroblast growth factor 2 | FGF2 | ATCAAGGGAGTGTGTGCCAACCC | CCAACTGGAGTATTTCGGTGACC | NM_008006 217-238 366-344 | 150 | + |

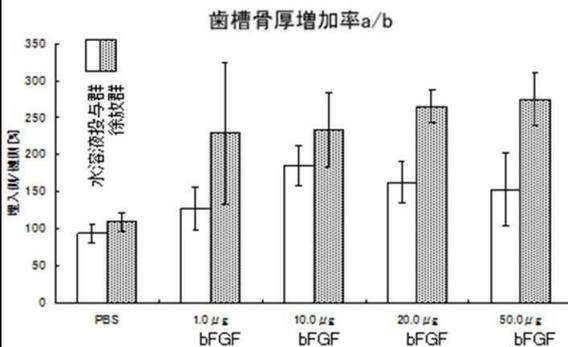
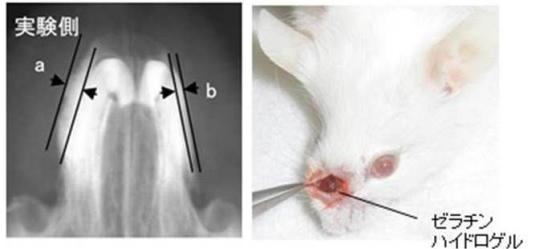
4. 研究成果

(1) FGF-2 徐放システムの反復応用による骨再生現象の実証

単回投与における骨形成の条件、水溶液と徐放

軟エックス線画像による骨形成の評価から、FGF-2 の量がおおむね 10 μ g 以上であるとき、骨形成が生じることが分かった。また、その厚みは健側と比較して 1.5 ~ 3.0 倍であった。FGF-2 の水溶液投与でも骨形成が生じたが、徐放により効果的な形成が得られた。 [図 1]

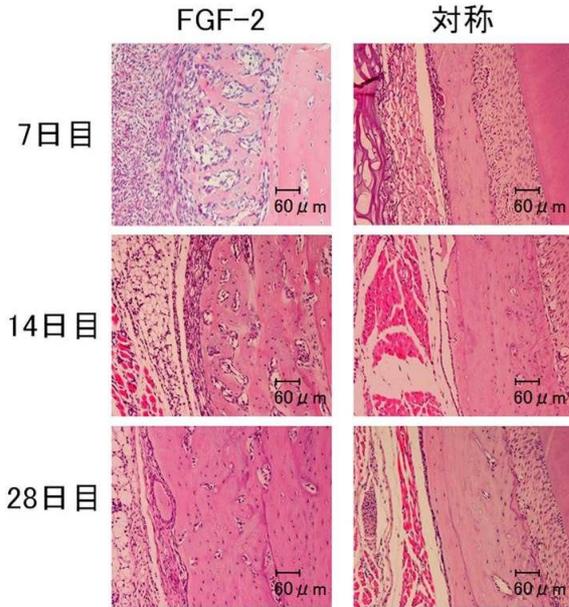
図1 FGF-2単回投与による歯槽骨再生量の評価



単回投与における組織学的な評価

H-E 染色においては、その不透透像に相当する歯槽骨が比較的成熟した皮質骨様の組織である事が分かった。ゼラチンハイドロゲルは骨膜と骨の間に留置したが、ゼラチンハイドロゲル上に位置する骨膜は 7 日目より骨上へ新たな骨膜組織が形成され、骨の形成はこの骨膜下で認められた [図 2]。これらの事からゼラチンハイドロゲルが骨膜上で FGF-2 の徐放担体として機能し、骨膜の骨形成活性を高めた結果、歯槽骨が再生することが示唆され、複数回投与により、相加的な再生が得られる可能性がある。

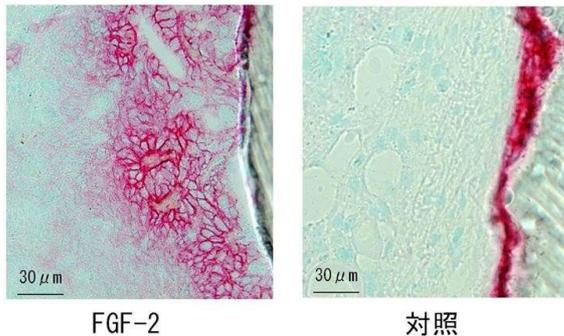
図2 組織学的な評価(H-E染色)



ALP 染色

埋入7日目における骨膜のアルカリホスファターゼ化学染色像を示す[図3]。FGF-2徐放群の骨膜の内層に位置する球状の細胞に強い陽性シグナルをみとめ、これらの細胞が骨芽細胞系細胞の発現型を持つことが示された。一方、対照群においても骨表層の細胞に強い陽性シグナルをみとめたが、その厚みはFGF-2徐放群と比べて僅かであった。

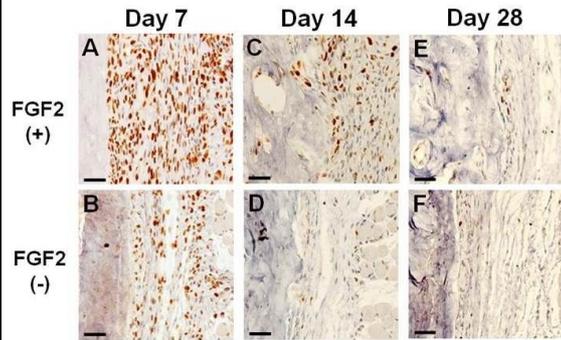
図3 ALP酵素活性の評価(Fast red)



PCNA 免疫染色

ゼラチンハイドロゲル埋入7日目において、大部分の骨膜細胞の核にPCNA陽性シグナルをみとめ、14日目、28日目にかけて経時的にシグナル陽性細胞が減少する傾向がみられた。FGF-2徐放群の7日目・14日目の骨膜および対照群の7日目の骨膜において、強いアルカリホスファターゼ活性を示し、骨芽細胞の発現型を持つことが示された細胞の多くがPCNA陽性所見を示し、骨芽細胞への分化が進んだ細胞の増殖活性が高いことが示唆された。対照群の骨膜では埋入7日目、14日目および28日目において正常骨膜と比べて高いPCNA陽性率を示し、骨膜組織の若干の多層化がみられた。[図4]

図4 PCNA免疫染色

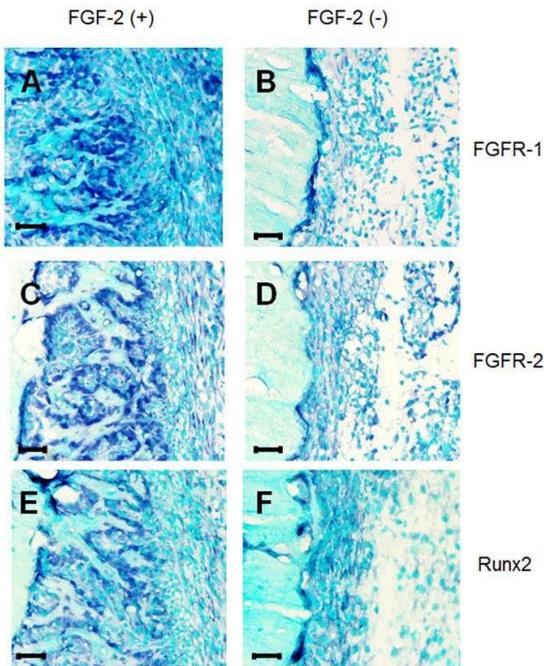


(2) 分子生物学的な根拠の裏付け

ゼラチンハイドロゲル埋入後7日目におけるFGFR-1およびFGFR-2のmRNAの発現分布を示す[図5]。FGF-2徐放群ではFGFR-1およびFGFR-2の何れにおいても仮骨を取り囲む球状の骨芽細胞に強い陽性シグナルをみとめた。また、弱いシグナルは骨膜の線維性配列をしている細胞に点在していた。対照群においてはFGFR-1およびFGFR-2の何れも骨表層に強陽性細胞をみとめ、骨膜から離れた結合組織においてもシグナル陽性細胞の点をみとめた。それぞれの実験群においてFGFR-1およびFGFR-2の発現パターンに大きな違いはみられなかった。FGFRおよびRunx2、FGF-2の遺伝子発現量を示す[図6]。定量的なRT-PCRでは、FGF-2徐放群の骨膜においてFGFR-1およびFGFR-2の転写量が対照群の骨膜と比べて約2.5倍高値を示し、その何れもが対照群、正常骨膜それぞれに対して有意に高値であった。FGFRの転写量は対照群、FGF-2徐放群ともにFGFR-1が多く、転写量の比は正常骨膜のそれに類似するものであった。また内因性のFGF2転写量は対照群の骨膜およびFGF2徐放群の骨膜とも正常骨膜と同水準であり、統計学的な違いを認めなかった。

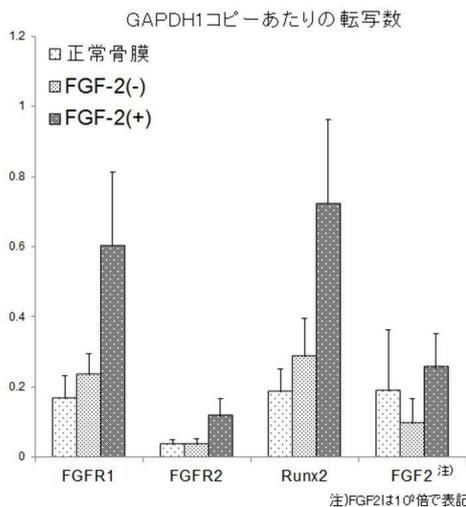
転写因子Runx2はFGF-2徐放群において仮骨表層を取り囲んでいる球状の骨芽細胞に発現を認めたほか、線維性の骨膜組織中にも発現している細胞をみとめた。対照群において発現細胞は既存骨表層の骨膜に局限していた。定量的なRT-PCRからはFGF-2徐放群骨膜のRunx2転写量が対照群に比べて約2.5倍高値を示すことが分かった。

図5 in situ hybridization (FGFR, Runx2)



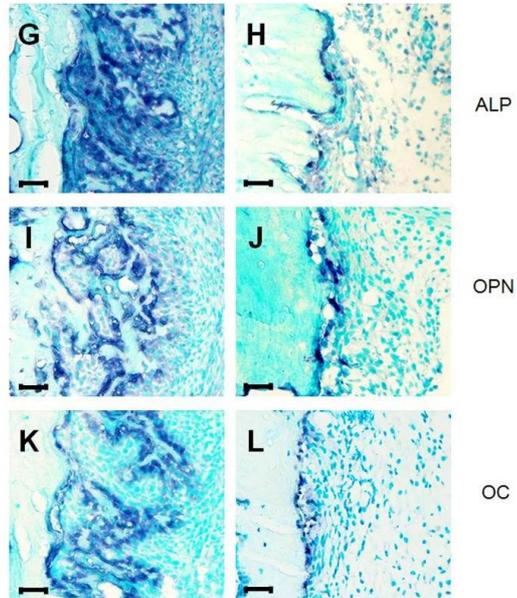
FGF-2徐放7日目の骨膜。FGFR-1 [A][B], FGFR-2 [C][D], Runx2[E][F]。シグナルはBCIP/NBTで検出している。

図6 定量的RT-PCR (FGFR, FGF-2, Runx2)



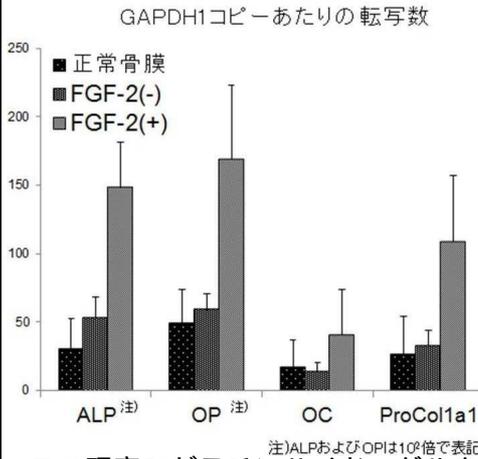
ゼラチンハイドロゲル埋入後7日目における骨基質 mRNA の発現分布を示す [図7]。FGF-2 徐放群において骨芽細胞の初期分化マーカーである ALP は仮骨表層を取り囲んでいる球状の骨芽細胞に認められたほか、仮骨間の細胞や線維性骨膜まで広く発現していた。骨芽細胞の中期分化マーカーである OPN は ALP と同様の発現パターンを示したが、球状の骨芽細胞により強く発現していた。骨芽細胞の後期分化マーカーである OC は球状の骨芽細胞に局限して発現していた。対照群において ALP、OPN および OC はすべて既存骨表層の細胞に発現していた。FGF-2 徐放群骨膜の Procol1、ALP、OPN および OC の転写量は対照群と比べて全て 2 倍以上の高値を示した。また、FGF-2 徐放群骨膜において Procol1、ALP および OPN の転写量は対照群、正常骨膜それぞれに対し有意に高値を示した [図8]。

図7 in situ hybridization (ALP, OPN, OC) FGF-2 (+) FGF-2 (-)



FGF-2徐放7日目の骨膜。ALP [G][H], OPN [I][J], OC[K][L]。シグナルはBCIP/NBTで検出している。指示線は30 μm。

図8 定量的RT-PCR (ALP, OP, OC, ProCol1a1)



この研究でゼラチンハイドロゲルを用いた FGF-2 の徐放がマウス上顎歯槽骨に一過性の添加性の骨再生をもたらすことを示した。一連の組織学的、分子生物学的な解析から骨再生は生理的な骨創傷治癒に類似した機転を辿ると推察され、反復投与で相加的な再生が期待できる。そのため今後も更なる解析が望まれる。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉 直樹 (KODAMA, Naoki)

新潟大学医歯学総合病院 特任助教

研究者番号: 9 0 5 7 2 3 5 5

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし