

神保 良 論文内容の要旨

主 論 文

Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells

血清ファイブロネクチンの細胞内ファイブロネクチン陽性細胞遊走能向上作用によるオッセオインテグレーション促進効果

神保 良, 澤瀬 隆, 柴田恭明, 平田一成, 菱川善隆, 田中 康弘, 別所和久, 池田 通, 熱田 充

Biomaterials • 28 卷 24 号 3469—3477 2007 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：熱田 充教授)

緒 言

早期のそして確実なインプラント骨結合、すなわちオッセオインテグレーションの獲得は治療期間の短縮とインプラント成功率の向上に大きく寄与する。今日に至るまで様々な表面改質が行われ、早期のオッセオインテグレーション獲得の試みがなされている。これらの表面改質により、血清タンパクの吸着が促進され、骨芽細胞の接着を亢進させることが期待されており、特に血清ファイブロネクチン (pFN) は、細胞の増殖、分化、生存をシグナル伝達系によって制御することから、オッセオインテグレーション獲得における主要因であることが報告されている。しかしオッセオインテグレーションに対する pFN の作用機序解明には分子生物学的手法の応用が必須であるものの、純チタンであるインプラント体を含めた薄切切片の作製は困難であり、新たな手法の開発が求められていた。そこで本研究ではイオンプレティング法により、アクリルにチタンを薄膜コーティングした実験用インプラントを用い、チタン・組織界面を良好に保存したまま、パラフィン包埋、薄切可能なモデルを作製し、初期のオ

ッセオインテグレーションにおける pFN の影響を検討した。

対象と方法

アクリルロッド (ϕ 1.0 mm、長さ 2.0 mm) に 20 nm のチタン薄膜イオンプレティングを行いインプラント試料とした (Ti-acryl)。実験群試料にはさらに pFN (100 μ l/mg) を吸着させ (FN-Ti-acryl)、両試料を雄性 ddy マウス大腿骨正中部に埋入した (n=3)。埋入 1-7、および 14 日目に検体を採取し、通法に従い固定、パラフィン包埋後、厚さ 3 μ m の薄切切片を作製した。組織学的にインプラント周囲骨形成過程を観察するとともに、pFN の局在ならびに骨分化初期に特徴的に浸潤する線維芽細胞様細胞のマーカである細胞内ファイブロネクチン (cFN) の局在を各々の抗体を用い蛍光免疫染色法により観察した。

さらに細胞レベルにおいて、pFN がマウス由来骨髄間質細胞の遊走、増殖、分化に与える影響を検索した。遊走能は改変型ボイデンチャンバーを用い、pFN コーティングの有無による 24 時間後の遊走細胞数をカウントし評価した。また、pFN でコーティングされたプレート上における 24 時間後の細胞増殖率及び 4 日後の ALP 活性により、増殖、分化への関与を評価した。

結 果

組織学的観察の結果、Ti-acryl では 4 日目、5 日目において線維芽細胞様細胞の浸潤は確認されたものの、直接的な骨形成は 7 日目まで観察されなかった。一方 FN-Ti-acryl では 4 日目においてインプラント界面に骨基質の沈着が観察され、さらに 5 日目ではインプラント長軸方向に沿った骨形成が観察された。

免疫組織学的解析の結果、Ti-acryl では埋入 1 日目にインプラントの上方に限局した pFN のシグナルが観察されたものの、2 日目にはシグナルはインプラント界面から消失した。また 2 日目に cFN 陽性線維芽細胞様細胞浸潤が pFN の局在領域と一致して認められた。一方、FN-Ti-acryl では埋入直後から骨形成直前の 4 日目までインプラント全周に pFN が集積していた。また cFN 陽性線維芽細胞様細胞も pFN 陽性領域に近似してインプラント全周に浸潤していた。さらに pFN の局在および cFN 陽性線維芽細胞様細胞の浸潤領域はその後の骨形成領域と一致しており、3 者の相関が示唆された。

培養細胞における検証の結果、採取した骨髄間質細胞は pFN への遊走能が確認された。一方 pFN の存在下において増殖、および分化への影響は認められなかった。

考 察

本研究で用いた実験試料により、インプラント周囲骨形成における微細構造解析が可能となった。pFN は骨髄間質細胞の遊走能を制御しているものの、増殖および分化に影響をおよぼさなかった。このことから、実験群で観察された早期のッセオインテグレーション獲得はインプラント表面に吸着した pFN が多数の cFN 陽性骨芽前駆細胞をインプラント表面へ遊走させることでその後の骨形成を促進することが示唆された。