

## 学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	大杉 勇人
論文審査担当者	主査 柴田俊一 副査 池田 通、丸川恵理子
論文題目	Evaluation of bone healing following Er:YAG laser ablation in rat calvaria compared with bur drilling
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>&lt;要旨&gt;</p> <p>Er:YAG レーザーは歯科における骨切削で用いられている。しかしながら、Er:YAG レーザー照射後の骨組織への影響および骨切削後の治癒については、未だ詳細は明らかになっていない。本研究はレーザー照射による蒸散後の骨治癒を、バー切削と比較して評価することを目的とした。ラット頭頂骨の骨膜除去を行い、Er:YAG レーザー照射およびバー切削を行った。まず、切削した骨表面を SEM 分析にて観察し、次に組織学的に評価を行い、さらにマイクロ CT を用いて三次元的に骨修復率の解析を行った。また骨組織の遺伝子発現を評価するためにレーザー照射とバー切削で面切削を行い、骨膜除去のみの骨をコントロールとし、Total RNA を抽出して遺伝子発現を解析した。結果として、SEM 分析ではレーザー照射面に骨小腔や骨細管の開孔を伴う特徴的な微細構造が認められた。三次元的に計測した骨修復率はレーザー照射群で有意に高い結果を示した。レーザー照射骨では、Heat shock protein (HSP) 関連遺伝子、<i>Dmp1</i> の発現上昇および <i>Sost</i> の発現低下が認められ、バー切削骨では炎症関連遺伝子の上昇が認められた。処置 1 週後の骨欠損部の肉芽組織では、オステオカルシン (OC) とアルカリフォスファターゼの mRNA 発現がレーザー照射群において上昇していた。Er:YAG レーザーによる骨切削は、治癒に有利な骨処置面の性状変化および骨組織の反応により、新生骨の形成を促進する可能性があることが示唆された。</p> <p>&lt;緒言&gt;</p> <p>レーザーは、Biostimulation を含む生物学的効果ならびに、切除、蒸散、止血および微生物抑制や死滅のような様々な組織作用を示す。特に Er:YAG レーザーは軟組織、硬組織の両者の蒸散に有効である。近年、Er:YAG レーザーは歯周治療やインプラント治療における骨蒸散に応用されており、従来の機械的切削による治癒結果と比較すると、注水下においては同等、もしくはより良い治癒が起こるといった結果が報告されている。しかしながら、Er:YAG レーザー照射が骨組織の治癒にどのように影響するかについては、未だ明らかになっていないのが現状である。本研究ではレーザー照射の骨組織の治癒への影響を明らかにする事を目的とした。</p>	

## <方法>

10週齢雄性 Wistar 系ラット 66 匹を用いて、全身麻酔下にて頭頂部の皮膚を切開後、頭頂骨を剖出し、左右それぞれに 10 mm×3.5 mm の範囲で骨膜の除去を行った。一方にはスチールバー (10,000 rpm)、もう一方には Er:YAG レーザー (DELIGHT: HOYA 社) (135 mJ/pulse、20 Hz、30.1 J/cm<sup>2</sup>/pulse) を用いて、注水下で骨表面に直線状 (600 μm × 8 mm) のグループを形成した。形成されたグループから生じた出血は綿球にて圧迫止血を行った。皮膚弁を戻し、縫合後に 15 mg/kg セファレキシシン (CEFMETAZON<sup>®</sup>、第一三共株式会社) を筋肉内投与した。

処置後の頭頂骨の骨表面の性状について、形態および血餅形成の相違点を比較するために、安楽殺前後で SEM 分析を行った (n=1)。新生骨の形成や熱変化層を観察するため、骨切削の直後、2、4、6、8 週後に安楽殺し (各 n=6)、頭頂骨の脱灰後にパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。骨修復率の評価を行うため、処置後 0、2、4、6、8 週にマイクロ CT (Rm CT2; リガク株式会社) を撮影し (n = 15)、Osirix MD software (version 7.0.2、Pixmeo)を用いて三次元画像を構築し、骨欠損体積を測定した。処置後 1 週の肉芽組織を採取し (n = 12)、qRT-PCR 法によって遺伝子発現を評価した。さらに処置後 2 週の組織切片に抗 OC 抗体 (Bioss Antibodies)を用いて OC の免疫染色を行った。

また切削後の骨組織の遺伝子発現を評価するため、骨 (3 mm × 8 mm) をバー (10,000 rpm) と Er:YAG レーザー (220 mJ/pulse、20 Hz、20.2 J/cm<sup>2</sup>/pulse) にて面状に切削した。骨切削を行わず骨膜のみ除去した骨をコントロールとした。処置後 6 時間の骨組織より RNA を抽出し (n=7)、Agilent Low Input Quick Amp ラベリングキット (Agilent) を用いてラベル化後、Agilent SurePrint G3 Unrestricted Gene Expression 8 × 60 K Microarray (Agilent) と Agilent Microarray Scanner System (Agilent)を用いたマイクロアレイ解析および qRT-PCR を行い、遺伝子発現を評価した。

## <結果>

注水下でのバー切削と Er:YAG レーザー照射は、重篤な熱傷害なしに骨組織を効果的に切削することが可能で、同様のグループ状欠損を作製できた。所要時間はバー切削と比較して、レーザー照射では有意に短い時間であった。組織学的には、レーザー照射による骨蒸散面は、表層でヘマトキシリンに濃染した約 1-4 mm の変化層を認めた。治癒過程では、両群ともに新生骨と骨欠損表面の間で間隙が観察され、レーザー切削群ではこの間隙がより顕著に生じていた。また、処置骨表層で骨小腔内の骨細胞の消失が観察された。消失した範囲の深さは、バー切削群とレーザー照射群で、処置直後においてそれぞれ約 0-10 μm と 0-50 μm、2-8 週後は約 2-60 μm と 3-90 μm を示し、両群とも 2 週後に著しく増加した。

処置表面の SEM 画像では、安楽殺後 (出血がない場合) は、バー切削面はスミア層によって覆われ

ており、レーザー照射面では骨小腔や骨細管の開孔を伴う特徴的な微細構造を示した。生きているラット (処置表面が出血で曝露された場合) では、レーザー照射においてフィブリンの付着が顕著に多く観察された。

マイクロ CT で撮影した画像を基に残存する骨欠損の三次元像を構築し、骨修復率を計算した結果、レーザー照射群は 2、4、6、8 週後において有意に高い骨修復率を示した。

骨切削における遺伝子発現を網羅的に解析するために、マイクロアレイ解析を行った。絶対値変化量が 2 倍以上、かつ  $P$  値が 0.001 未満に該当する遺伝子は 21 個存在した。これらの遺伝子の中から、HSP、炎症、骨細胞関連遺伝子に焦点を当て、その後 qRT-PCR 法にてバー切削群、レーザー照射群、コントロール群の骨組織における mRNA 発現を検証した。HSP 関連遺伝子である *Hspa1a* と *Hsph1* は、レーザー照射群で有意に発現が上昇し、炎症関連遺伝子である *Cxcl6* と *Mmp3* は、バー切削群で有意に発現が上昇した。加えて骨細胞関連遺伝子については、*Dmp1* はコントロール群と比べてバー切削群とレーザー照射群で有意に発現が上昇し、さらにバー切削群よりもレーザー照射群の方が有意に高い発現であった。*Sost* はコントロール群と比較してバー切削群で有意に上昇したのに対して、レーザー照射群では有意に減少した。

Hallmark gene sets を用いた Gene Set Enrichment Analysis では、バー切削群においては IL6/JAK/STAT3 Signaling と Inflammatory Response に関連した遺伝子群が亢進し、レーザー照射群では E2F Targets 遺伝子群が亢進した。

1 週後のレーザー照射群の肉芽組織では、*Alpl* と *Bglap* の発現がバー切削群よりも有意に上昇した。2 週後の肉芽組織における OC の免疫組織学的分析では、OC 陽性部の面積は、バー切削群と比較してレーザー照射群で有意に上昇していた。

#### <考察>

本研究は、骨欠損の三次元計測により、バー切削に比べてレーザー照射による切削骨において早期の骨治癒が促進されることを明確に示した。術後 1 週での肉芽組織の遺伝子発現を評価した結果、骨芽細胞分化に関連する遺伝子である *Alpl* と *Bglap* の発現がレーザー照射群で有意に上昇した。免疫組織化学的に、OC 発現の上昇が 2 週後の肉芽組織で確認されたが、その結果は、バー切削骨と比較してレーザー照射骨の肉芽組織では OC の有意な上昇が認められたという過去の報告と一致していた。肉芽組織の骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現が増加したことは、レーザー照射された骨では新生骨形成が促進しているという結果を支持している。

レーザー照射群において新生骨形成が進行する現象の理由の一つとして、まずレーザー照射面での形態学的変化が関与していることが考えられた。SEM 分析では、レーザーで蒸散した骨面により多くのフィブリンの付着のみならず骨細管や骨小腔の開孔を伴った蒸散面の微小な凹凸が観察された。こ

の蒸散面の微細構造は、早期の治癒過程で血餅の保持と肉芽組織の形成を誘導する可能性があり、骨の治癒に効果的であると考えられる。このような構造的特徴は、Er:YAG レーザーによる骨切削後のより高い骨修復率の結果と関連すると推察された。

加えて、レーザー照射骨では E2F 転写因子の細胞増殖に関連する標的物質をコードする遺伝子を含む E2F targets 遺伝子群が亢進していた。qRT-PCR 分析の結果、HSP 関連遺伝子 (*hspla1a* と *hsph1*) の mRNA 発現の増加がレーザー照射骨では特徴的であり、さらに興味深いことに、レーザー照射骨ではバー切削骨と比較して *Dmp1* は著しく高い発現を示し、*Sost* は低い発現を示した。*Dmp1* は骨細胞が産生し骨の成熟に関与する遺伝子であり、スクロスチンもまた主に骨細胞が産生し骨形成の負のレギュレーターとして重要な役割をしている。これらの結果はレーザー照射骨の骨修復が良好であることに関連しているかもしれない。一方、バー切削骨では *Cxcl6* と *Mmp3* の上昇が特徴的であったが、レーザー照射骨では *Cxcl6* と *Mmp3* の発現上昇は示さなかった。さらにバー切削骨ではこれらの発現上昇と一致して、IL6/JAK/STAT3 Signaling と Inflammatory Response の遺伝子群が有意に亢進していた。骨組織でのこれらの反応は、レーザー照射による骨切削後の骨組織の治癒に影響すると考えられる。しかしながら、骨細胞の消失や熱変化層に関してはさらなる研究が必要である。

#### <結論>

本研究は、バー切削と Er:YAG レーザー照射による骨組織蒸散において網羅的な遺伝子発現を解析した初めての報告である。この研究結果は、バー切削と比較して、Er:YAG レーザー照射は、蒸散した骨表面上の特徴的な微細構造の生成のみならず、照射骨組織において治癒に有利な反応を促進することによって、早期の新生骨形成促進をもたらす可能性を示唆している。

論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲第 5777 号	大杉 勇人
論文審査担当者	主査 柴田俊一 副査 池田 通、丸川恵理子	
論文題目	Evaluation of bone healing following Er:YAG laser ablation in rat calvaria compared with bur drilling	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>Er:YAG レーザーは水への高い吸収特性により軟組織・硬組織両者の蒸散能力に優れている。レーザーは従来の機械的切削と比較して、いくつかの有利な効果を有しているため、近年、歯周治療やインプラント治療において骨切削に応用されている。しかし Er:YAG レーザー照射後の骨組織への影響および骨切削後の治癒については、未だ詳細は明らかになっていない。そこで大杉は、ラットの頭頂骨に対して Er:YAG レーザー照射による骨切削を行い、その後の骨組織治癒についてバー切削と比較し詳細に検討した。この大杉の実験計画に関する発想は極めて妥当なものであり評価できる。</p> <p>本研究ではラットの頭頂骨を剖出し、左右それぞれ骨膜の除去を行った後、骨表面に対して注水下にてバー切削と Er:YAG レーザー蒸散を行い、それぞれ直線状のグループを形成した。形成されたグループ内の骨治癒を評価するために、マイクロ CT を用いた三次元的解析、SEM 分析、およびヘマトキシリン・エオジン染色とオステオカルシンの免疫組織染色による組織学的観察を行った。またレーザー照射された骨組織の遺伝子発現変化を評価するために、レーザー照射とバー切削でそれぞれ面切削を行い、骨膜除去のみの骨をコントロールとし、Total RNA を抽出し、遺伝子発現を網羅的に解析するとともに qRT-PCR 法にて特定の遺伝子の発現状況を検索した。</p> <p>本研究において、大杉は Er:YAG レーザーの特性や臨床への応用を十分に理解し、レーザー照射による骨切削後の治癒について詳細に解析するために、骨組織の各種の高度な分析方法について事前に十分な検討を重ねており、適切な研究計画の下で用意周到に本実験を遂行したことは高く評価できる。なお、本研究は本学動物実験委員会の承認を得て行われている（承認番号：0170227）。</p> <p>本研究の主たる結果は以下の通りであった。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 処置骨表面の SEM 分析において、バー切削面はスミア層によって覆われており、レーザー照射面では骨小腔や骨細管の開孔を伴う特徴的な微細構造を示した。レーザー照射においてフィブリンの付着が顕著に観察された。</li> </ol>		

2. マイクロ CT を用いた骨欠損部の 3 次元的な骨修復率の分析では、バー切削群と比較してレーザー照射群は 2、4、6、8 週後において有意に高い骨修復率を示した。
3. 骨組織に対するマイクロアレイ解析においては、絶対値変化量が 2 倍以上、かつ *P* 値が 0.001 未満に該当する遺伝子は 21 個存在した。qRT-PCR 分析の結果、HSP 関連遺伝子 (*Hspa1a* と *Hsph1*) の mRNA 発現の増加がレーザー照射骨で特徴的であった。骨細胞関連遺伝子では、レーザー照射骨はバー切削骨と比較して *Dmp1* の顕著な高発現を示し、*Sost* の発現はコントロール骨と比較してレーザー照射骨では有意に減少し、バー切削骨では有意に上昇した。またバー切削骨でのみ炎症性関連遺伝子 (*Cxcl6* と *Mmp3*) の mRNA 発現の有意な増加が認められた。
4. Gene set enrichment analysis では、レーザー照射骨において E2F 転写因子の細胞増殖に関連する標的物質をコードする遺伝子を含む E2F targets 遺伝子群が有意に亢進していた。またバー切削骨では IL6/JAK/STAT Signaling と Inflammatory Response の遺伝子群が有意に亢進していた。
5. 切削後の骨欠損部に形成された肉芽組織の分析では、切削 1 週後において *Alpl* と *Bglap* の遺伝子発現がレーザー照射群においてバー切削群よりも有意に上昇した。また切削 2 週後のオステオカルシン免疫組織染色では、肉芽組織中のオステオカルシン陽性部の割合は、バー切削群と比較してレーザー照射群で有意に上昇していた。

以上の結果より、バー切削と比較して、Er:YAG レーザー照射は、蒸散した骨表面上の特徴的な微細構造の生成のみならず、照射骨組織において治癒に有利な細胞反応を誘導することによって、早期の新生骨形成促進をもたらす可能性が示唆された。

本研究において、大杉は、近年医学および歯学の分野において臨床応用が進んでいる Er:YAG レーザーについて、*in vivo* ラットモデルを用いてその生物学的効果を多角的に検討し、レーザー照射とバー切削で骨組織の遺伝子発現が異なることを報告した。

バー切削と比較し、骨欠損部における肉芽組織での骨芽細胞分化に関する遺伝子発現が上昇したことは、レーザーで蒸散した骨では新生骨形成が促進しているというマイクロ CT による三次元的解析結果を支持している。さらに、マイクロアレイ解析を行い、Er:YAG レーザー照射骨では、細胞増殖に関連する遺伝子を含む E2F targets 遺伝子群が亢進したこと、また *Dmp1* の上昇と *Sost* の減少を示すことなどの所見から骨形成促進の可能性を考察しており、総合的な解析を行なった点は大いに評価できる。

本研究は、Er:YAG レーザー照射が骨組織に分子生物学的効果を及ぼすことを初めて網羅的に解析した報告であり、今後のレーザーの歯科治療応用の研究を推進する重要な内容を含んでいる。さらに

本実験で得られた結果は、Er:YAG レーザーの歯科臨床応用を行う上で、有用なエビデンスを提供するものであり、レーザーの骨組織への応用のみならず、歯周治療を含む再生医療分野において、今後大きく貢献する可能性を有するものと考えられる。

よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行うにあたり、十分価値あるものと認められた。