

学位論文題名

BMP 誘導異所骨形成における  
ヒドロキシアパタイト細胞支持体の幾何学的要素

学位論文内容の要旨

I 緒言

骨形成の生化学的メカニズムを理解するために、我々はこの複雑な過程を 5 つの要素に分けて考察する事が得策であると提唱してきた。それらは、(1) 骨形成に直接関わる細胞、(2) 細胞が産生するマトリックス、(3) 体液、(4) 石灰化の物理化学過程ならびに、細胞活動一般に対する制御因子、そして(5) メカニカル・ストレスである。この作業仮説を証明するために、我々は実験系として BMP(bone morphogenetic protein)が誘導する異所性の骨形成を選択した。BMPは、骨以外の組織においても、適切なキャリアーと共に埋植すると骨を誘導する性質があることが知られているサイトカインである。

我々は、これまでに 10 種類以上の異なる形態を持つキャリアーを開発、試験し、BMP が誘発する骨、及び軟骨形成はキャリアーの形態の幾何学性質に高度に依存するという結論に達した。キャリアーの形態の違いにより、骨形成の過程及び骨形成の量が異なる。

本研究では、以上の過去の知見をさらに確認し、BMP が誘発する細胞分化におけるキャリアーの幾何学的特性の効果をより深く理解する目的で、ハニカム状ヒドロキシアパタイト (honeycomb shaped hydroxyapatite, HCHAP)を開発し、2種類の異なる形態のアパタイト、多孔性顆粒状ヒドロキシアパタイト (porous particles of hydroxyapatite, PPHAP)、多孔性ブロック状ヒドロキシアパタイト (porous blocks of hydroxyapatite, PBHAP) と比較した。

II 実験材料及び方法

①キャリアーの形態の幾何学的性質

HCHAP は円柱状で長さ 1~1.5mm、直径 700  $\mu$ m の顆粒である。粒子には縦方向に 7 つの直径 110  $\mu$ m のトンネルがある。

PPHAP の粒径は 300~500 $\mu$ m で、気孔径は 150 $\mu$ m、気孔率 70%で、気孔は貫通している。

PBHAP は 5x5x1mm (40mg) の小ブロックで、気孔径は 106~212 $\mu$ m である。

## ② BMP 含浸と埋植

HCHAP、PPHAP、および PBHAP（いずれも 40mg）に、リコンビナント・ヒト BMP-2（5 $\mu$ g）を含浸し 4 週齢の Wistar-King AH 系雄ラットの背部皮下に埋植した。埋植後、1、2、3、4 週目に、埋植物を摘出した。

## ③ 組織学的観察及び生化学的分析

摘出された埋植物を固定、脱灰してから、パラフィン包埋し、4~5 $\mu$ m に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン及び toluidine blue 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

## ④ 生化学的分析

1. アルカリホスファターゼ活性（ALP）：Kind-King 法により測定した。
2. オステオカルシン（Oc）測定：既報に従い測定した。
3. RT-PCR によるオステオカルシン mRNA の検出：摘出物より抽出された RNA をテンプレートとして、RT-PCR による分析をオステオカルシンと GAPDH について行った。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動により分析した。

# Ⅲ 結果

## 組織学的観察

PPHAP/BMP 埋植体においては、1 週では骨も軟骨も見られず、毛細血管と共に結合組織細胞が PPHAP 埋植体の外表面に集まっていた。2 週目になると、ほとんどの孔の内表面に骨形成が観察された。軟骨はどの観察期間においても観察されなかった。3~4 週で孔の内面に沿った骨の層は厚みを増し、孔は段階的に骨で満たされていった。しかしそれぞれの孔の中心部では血管あるいは骨髄様組織の空隙が残っている。

PBHAP/BMP 埋植体においては、結合組織細胞は 1 週で PBHAP 内の表層近くの層まで侵入し、孔の内表面に凝集するが、軟骨も骨形成も検出できなかった。2 週になると PBHAP の表層近くの孔では内表面に細胞が集まり、骨形成が見られる。しかし、PBHAP の中心部には細胞は侵入していないし、細胞の凝集もまばらである。どの期間においても、PPHAP 同様、PBHAP/BMP 埋植体でも軟骨は検出されなかった。3 および 4 週の埋植体において、骨形成は、埋植体の表面近くの層でのみ起こっており、埋植体の中心部においては、骨形成や細胞の凝集は見られない。

HCHAP/BMP 埋植体においては、1 週では軟骨形成がトンネル内部および、HCHAP 粒子間で見られた。2 週では軟骨はトンネルの内部にのみ見られた。トンネル長軸方向にみて中央部では軟骨が、トンネルの入り口近くでは骨が存在し、両者が隣接している像が観察される。さらに 3~4 週目では軟骨はすべて骨によって置換されて消失した。血管はトンネル内の中心部に常に存在した。

## 生化学的分析

抽出した埋植体のアルカリホスファターゼ活性を時間を追って調べた結果、どの種類のヒドロキシアパタイトにおいても、2週でピークを示し、3~4週で減少した。2週における PPHAP や HCHAP のアルカリホスファターゼ活性は PBHAP のアルカリホスファターゼの約 3 倍高く ( $p<0.01$ )、中でも平均値では HCHAP が最も高い値を示した。。

PPHAP 埋植体におけるオステオカルシンの含有量は2週間でゆっくり上昇し、3、4週まで上昇、4週で最高値に達する。4週で、PPHAP、HCHAP と PBHAP を比較すると、PPHAP と HCHAP が PBHAP より、1.5~2.5 倍高いことがわかった ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )。

3、4週での埋植体から抽出された mRNA の RT-PCR 産物を 2%アガロースゲルによる電気泳動において分析した結果、オステオカルシンのバンド (303bp 部位) がすべてのサンプルにおいて出現した。

## 考察

### 1. 細胞支持体の意義

本研究で、骨形成はどのタイプのヒドロキシアパタイトにおいても、その表面において観察された。ヒドロキシアパタイトが、BMP 誘導異所性骨形成において細胞の足場としての重要な役割を果たしていることを示している。

### 2. 細胞支持体の形態の幾何学要素に依存する組織誘導

この実験より、多孔性のアパタイトの中で、孔の大きさ、連続性、直線性、並びに粒子の大きさ等の違いによって、BMP 誘導異所性骨形成が異なることが示された。HCHAP では、軟骨から骨ができたが、PPHAP と PBHAP では、軟骨形成の段階を経ないで、直接に骨が形成された。また骨形成の分布を見ると、PPHAP と HCHAP では、骨形成が孔の内部にまで存在したが、PBHAP では、骨形成が、埋植体の表面近くの層でのみ起こっており、埋植体の内部においては、骨形成は見られない。ALP と Oc 量の生化学的分析の結果が、組織学的観察と一致し、PPHAP と HCHAP では ALP 値と Oc 量が PBHAP より高かった。従って、多孔性のアパタイトの孔の大きさ、連続性、直線性、並びに粒子の大きさ等は、血管新生と未分化結合組織細胞の埋植体への進入を支配し、結果的に、BMPによる骨芽細胞への分化の作用に影響することと考えられる。

## 結論

新しく導入したハニカム状ヒドロキシアパタイト(HCHAP)は、比較的長い連続直線状かつ複数の細孔を備えた特徴ある細胞支持体であり、血管侵入と骨・軟骨形成との関係を解明する目的に適うものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 久保木 芳 徳  
副 査 教 授 亘 理 文 夫  
副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

## BMP 誘導異所骨形成における

### ヒドロキシアパタイト細胞支持体の幾何学的要素

金啓明の学位論文審査は、上記3名の審査員によって行われた。まず、申請者によって論文内容の口頭による説明が行われ、それに対して審査担当者から詳細な質問がなされ、それに対する申請者の回答がなされるという形で審査が行われた。

本論文は、骨形成の生化学的メカニズムとその再建法を理解することを目的とし、そのため申請者らはこの複雑なメカニズムを5つの要素に分けて考察する事にした。それらは、(1)骨形成に直接関わる細胞、(2)細胞が産生するマトリックス、(3)体液、(4)石灰化の物理化学過程ならびに、細胞活動一般に対する制御因子、そして(5)メカニカル・ストレスである。これらの諸因子の中で、(1)細胞、(3)体液ならびに(5)メカニカルストレスは、その組織が本来機能している部位では、条件が満たされており、再建のためには(2)マトリックスと(4)制御因子を適切に投与すれば、骨を作ることが出来ると考えられる。この作業仮説を証明するために、実験系としてBMP(bone morphogenetic protein)が誘導する異所性の骨形成を選択した。BMPは、骨以外の組織においても、適切なキャリアーと共に埋植すると骨を誘導する性質があることが知られているサイトカインである。これまでに10種類以上の異なる形態を持つキャリアーを開発、試験し、BMPが誘発する骨、及び軟骨形成はキャリアーの形態の幾何学性質に高度に依存することが明らかにされている。

そこで、ハニカム状ヒドロキシアパタイト (honeycomb shaped hydroxyapatite, HCHAP)を開発して直線的トンネル型の孔の中、骨がどのように形成されるが検討することにした。同時に、既に開発した2種類の異なる形態のアパタイト、多孔性顆粒状ヒドロキシアパタイト (porous particles of hydroxyapatite, PPHAP) と、多孔性ブロック状ヒドロキシアパタイト (porous blocks of hydroxyapatite, PBHAP) と比較した。

今回、申請者らが新しく開発したHCHAPは、円柱状で長さ1~1.5mm、直径700 $\mu$ mの顆粒であるが、粒子内に縦方向に7つの直径110 $\mu$ mのトンネルを有する特異な幾何学的構造体である。一方、PPHAPの粒径は300~500 $\mu$ mで、気孔径は150 $\mu$ m、気孔率70%で、気孔は貫通している。そして、PBHAPは5x5x1mm (40mg)の小ブロックで、気孔径は106~212 $\mu$ mである。

HCHAP、PPHAP、およびPBHAP (いずれも40mg)に、リコンビナント・ヒトBMP-2

(5 $\mu$ g) を含浸し 4 週齢の Wistar-King AH 系雄ラットの背部皮下に埋植した。

その結果、トンネル構造をもつ HCHAP のみに軟骨形成が生じ、続いて観察された骨形成のパターンがきわめて特徴的であった。すなわち、HCHAP における骨形成は、トンネルの両側の入り口から始まり、しだいにトンネル深部へと進行し、しかもトンネルの内壁に沿って同心円状に骨が付加されていくことが、明らかにされた。さらに、比較された 3 種のヒドロキシアパタイトの中で、もっとも効率よく骨を作ることが明らかにされた。

観察された現象は、骨の改造の単位であるハバース・システムの形成に酷似しており、この点でハバース・システム形成のモデルと見なすことが出来、骨形成のメカニズム解明に多くの点を示唆する結果である。また、本論文は、直線性のトンネル構造体内を用いて、世界ではじめて、軟骨・骨形成を起こさせることに成功した報告であり、これによって骨形成を目指す生体材料が、なぜ多孔性である必要があるのか、の説明が容易になったと見なされる。

審査担当者からは、石灰化に関するサイトカインについて、石灰化現象を幾つかの要素に分けて把握すべきであるという前提はどこまで立証されたか、物理的要素とは何か、骨と軟骨の形態学的差、軟骨性骨化について、Plank-Ryclo 脱灰液を選んだ理由、血管形成の確認方法、より長期の実験において予想される結果等について質問されたが、申請者は、いずれに対しても明快に回答でき、3名の審査担当者いずれも、申請者は、その論文内容、学識共に学位授与に値すると結論した。

しかし、申請者は協田教授から、軟骨性化骨、ハバース系についての用語の誤解ならびに記載不十分の点が認められるとの指摘を受け、これについては、早急に訂正する旨の約束をした。