

学位論文題名

Laser perforated collagen membrane:pore size-dependent bone induction as a new BMP carrier

(レーザー穿孔コラーゲン膜の開発：BMP 骨誘導における穿孔直径依存性)

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨形成蛋白質 (BMP) を用いて生体内に骨、軟骨ならびに歯周組織を誘導し、あるいは再建するためには、BMP を一定の担体に結合させてから埋植することが必要である。本研究ではこの担体がいかなる性質を必要とするかを追究すると同時に、新しい膜状の BMP 担体を開発することを目的とする。

一般に硬組織形成に必要な要素には、①細胞、②基質、③体液および④制御因子という 4 大要素と⑤メカニカル・ストレスという力学的要素があげられる。このうち細胞、体液、メカニカル・ストレスは生体内に既に備わっていると考えられるので、本研究の実験系では、基質としての担体と制御因子としての BMP の 2 点を組み合わせて投与することとした。担体は BMP の機能発現にきわめて重要であり、その諸性質によって骨又は軟骨が優先的に誘導される事実、すなわち「BMP の担体依存性」が明らかにされてきた。したがって BMP を臨床的に応用するためには、各種の症例に適した最適の担体を用いることが望ましい。BMP 担体としての主な必要条件には、①細胞支持体としての機能、②BMP 及びその他の生体分子との親和性、③機械的性質と操作性、④再建しようとする組織に適した力学的・幾何学的要素が考えられる。これまでに 10 種類以上の BMP 担体が開発、報告されてきたが、局所の骨再建に適する膜状でしかも生体吸収性の担体は少なく、主にコラーゲン線維膜 (FCM) が利用されてきた。しかし FCM は製法によって再現性が乏しく、最適の BMP 担体とは言えなかった。

本研究では、一定の細胞通過性と支持力をもち、再現性を持って製作できる吸収性 BMP 担体を得る目的で、レーザー光線によりコラーゲン膜にそれぞれ異なった直径の穿孔を行い、BMP 誘導異所性骨形成の担体としての有効性を比較検討した。

【材料と方法】

未変性ペプシン消化処理 I 型コラーゲンから成る膜 (厚さ 35  $\mu\text{m}$ 、高研製) に、エキシマレーザー発生装置 (穿孔直径 0.1 mm) 及び炭酸ガスレーザー発生装置 (穿孔直径 0.2 mm 以上) によって直径 0.1、0.2、0.3、0.5、0.75 及び 1.0 mm の正円形の穿孔を行った。穿

孔はコンピュータ制御により自動化した。穿孔面積は一定にし、全体の 20%とした。

各サイズの孔径をもつレーザー穿孔コラーゲン (LP) 膜を、幅 10×5 mm にカットし、BMP 及び細胞保持能力を増加させる目的で、膜を 2 枚重ねにして 4 隅のみ 100%シアノアクリレートで接着し、膜と膜との間に空間をもたせた。

これらの LP 膜に、rhBMP-2 (5 µg) (山之内製薬より供与)を含浸し、凍結乾燥後、4 週齢のウイスター系雄ラットの背部皮下に埋植した。コントロールとして非穿孔膜を同様に埋植した。1~4 週目にサンプルを取り出し、組織学的観察、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、カルシウム (Ca) 含有量ならびに RT-PCR 法によるオステオカルシン mRNA の発現を測定した。

### 【結果】

組織学的観察：埋植後 2 週の孔径 0.1 mm LP 膜では、膜表面に対し垂直方向の組織切片で、すでに孔内に骨ができ、場所によっては LP 膜の外側においても骨が連続的に形成されていた。3 週には膜自体の吸収も見られ、膜と骨とが融合している様子も観察された。膜表面に対し水平方向の組織切片では、穿孔パターンどおりに、周囲から孔を埋めるような形で同心円状に、孔の周囲から中心に向かって層状に骨形成が観察された。場所によっては膜は分解・吸収され、骨が連続している部分も観察された。

孔径 0.5 mm LP 膜の 2 週目の垂直方向の組織切片において骨は、孔径 0.1 mm LP 膜とは違い、孔の内部からではなく、2 重になった膜と膜の間や、膜の外側表面上に不規則に形成されていた。4 週目になると、膜の吸収も進み、中心部では、すでにリモデリングがおきている像が観察され、骨内は脂肪細胞も増加し、骨髓様の組織で満たされていた。

非穿孔膜においては、2 重膜間にごく一部ではあるが、骨形成がみられた。また、アルシアンブルー染色では、LP 膜および非穿孔膜で軟骨の存在は確認出来なかった。

生化学的観察：孔径 0.3 mm LP 膜における ALP 活性と Ca 含有量の経時的変化をみると、ALP 活性は 2 週目でピークが見られ、Ca 含有量では 3 週目にピークが見られた。

そこで、孔径の異なる LP 膜において、2 週の ALP 活性を比較検討した結果、孔径の大きなものほど高値を示した。3 週の Ca 含有量では、膜の孔径が増すごとに値も増加したが、孔径 0.5 mm 以上ではさらなる増加は見られなかった。非穿孔膜と比較して孔径 0.5、0.75 及び 1.0 mm の値は平均約 3 倍の高い値を示した。孔径 0.3 mm LP 膜で、オステオカルシン mRNA の発現の経時的変化を測定すると、1 週目は発現が見られず、2 週目以後で発現が見られた。各孔径の 3 週でのオステオカルシン mRNA の発現を比較すると、非穿孔膜を含め、全ての LP 膜において、オステオカルシン mRNA の発現が見られた。

### 【考察】

コラーゲン膜に一定の大きさの穿孔をすることで BMP 担体としての効率が顕著に増大した理由は、担体に幾何学的要素を加えることで、①BMP の膜への定着性、ならびに、②細胞の支持性が顕著に増加したためであると考えられる。孔の大きさを変えて検討した結果、とくに孔径 0.5 mm 以上の LP 膜は、骨形成用の担体として有効であると考えられる。

孔径 0.1mm LP 膜で観察された特異な同心円層状の骨形成像は、この部分の骨形成が、孔の周囲縁から開始され次第に、孔の中心部に向かって進んだことを明瞭に物語っている。この特異な骨形成像は、過去において報告された長さ 1.0-1.5 mm の円筒形スペースをもつ BMP 担体におけるハバース系様の骨形成パターンと酷似している。今回のような孔内の骨形成の連続性が 0.1 mm の孔においても同様に観察されたことは、人工細胞支持体の幾何学的要素によって組織形成が影響を受ける現象の例証と考えられる。

今回、開発した LP 膜は BMP 担体として、今後その孔径、厚さ、吸収性などを調節していくことにより、骨および歯周組織の再建など、歯科領域における組織工学への応用が期待される。

### 【結論】

1. 異なる直径の孔をあけたLP膜をBMP担体とし、非穿孔膜と比較した結果、全ての LP膜 において、より効率よく骨が誘導された。
2. 孔径 0.1 mmから 0.5 mmまでのLP膜では孔径の増加と共にALP活性およびCa含有量が増加する傾向がみられ、0.5 mmから1.0 mmまでは、さらなる増加はみられなかった。
3. 非穿孔膜と比較した結果、0.5 mm 以上の孔径を持つLP膜は、3週のCa含有量において約3倍の値を示した。孔径には骨形成にとって最適径があると考えられる。
4. 本研究によって膜状の細胞支持体の幾何学的要素が、骨形成のパターンに顕著な影響を与えることが示されたが、この現象は今後の組織工学の細胞支持体（スカフォールド）の設計において重要な手がかりを与えると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 久保木 芳 徳

副 査 教 授 加 藤 熙

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

## Laser perforated collagen membrane: pore size-dependent bone induction as a new BMP carrier

(レーザー穿孔コラーゲン膜の開発：BMP 骨誘導における穿孔直径依存性)

本論文の審査方法は、各審査担当者からの口頭試問、ならびに主査による筆記試験の形で行われた。まず、審査担当者に対して、学位申請者から本論文の概要について、研究の背景、目的、実験方法、結果、考察、結論と今後の展望の順で、次のような口頭での説明が行われた。

【背景と目的】 歯科領域では、口腔疾患の予防が重要であると同時に、すでに失われた一部の硬組織と歯周組織、あるいはそれらの障害された機能を再建することが必要である。そのための科学的理論と体系的技術が求められている。現在、骨形成蛋白質 (BMP) は、骨形成を異所性、ならびに同所性に誘導する、最も有力なサイトカインであるが、これを用いて生体内に骨、軟骨ならびに歯周組織を誘導し、あるいは再建するためには、BMP を一定の「担体」に結合させてから埋植することが必須である。この場合、担体は人工の基質であり、BMP は典型的な制御因子に他ならない。これまで10種類以上のBMP 担体が開発、研究され、担体が BMP の機能発現にきわめて重要であり、その諸性質によって骨又は軟骨が優先的に誘導される事実、すなわち「BMP の担体依存性」はすでに明らかにされている。したがってBMP を臨床的に応用するためには、各種の症例に適した最適の担体を用いることが望ましい。歯周組織の再建には、膜状でしかも生体吸収性の担体が望ましくこれまで、主にコラーゲン線維膜 (FCM) が利用されてきた。しかし FCM は製法によって再現性が乏しく、最適のBMP 担体とは言えなかった。そこで本研究では、一定の細胞透過性と支持力をもち、しかもBMP 担体としての要件を備えた素材として、レーザー光線によりコラーゲン膜に穿孔するという、まったく新しいアイデアを導入し、歯周組織再建を目指した新しい膜状のBMP 担体を開発することを目的とした。

【材料と方法】 未変性ペプシン消化処理I型コラーゲンから成る膜 (厚さ 35  $\mu\text{m}$ 、高研製) に、レーザー発生装置によって、直径0.1、0.2、0.3、0.5、0.75 及び1.0 mm の正円形の穿孔を行い rhBMP-2 (5  $\mu\text{g}$ ) と共に、ラットの背部皮下に埋植した。1 4 週目にサンプルを取り出し、組織学的観察、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、カルシウム (Ca) 含有量ならびにRT-PCR 法によるオステオカルシン mRNA の発現を測定し、穿孔径による骨形成の差を比較検討した。

【結果】 埋植後2週の孔径0.1 mm LP 膜では、組織学的にすでに孔内に骨ができ、場所によってはLP 膜の外側においても骨が連続的に形成されていた。膜表面に対し水平方向の組織切片では、穿孔パターンどおりに、周囲から孔を埋めるような形で同心円状に、孔の周囲

から中心に向かって層状に骨形成が観察された。一方、孔径 0.5 mm LP 膜 2 週目では、孔径 0.1 mm LP 膜とは異なって、孔の内部からではなく、2 重になった膜と膜の間や、膜の外側表面上に不規則に形成されていた。4 週目になると、膜の吸収も進み、中心部では、すでにリモデリング像が観察された。これらの LP 膜に対して、非穿孔膜においては、骨形成はほとんど観察されなかった。また、軟骨の存在はアルシアンブルー染色でも、LP 膜および非穿孔膜ともに確認出来なかった。

生化学的には、孔径 0.3 mm LP 膜の ALP 活性は 2 週目でピークが見られ、Ca 含有量では 3 週目にピークが見られた。そこで、孔径の異なる LP 膜において、2 週の ALP 活性を比較検討した結果、0.1-0.5mm まで孔径の大きなものほど高値を示した。3 週の Ca 含有量も、同様で孔径 0.5 mm 以上ではさらなる増加は見られなかった。非穿孔膜と比較して孔径 0.5、0.75 及び 1.0 mm の Ca 含有量は平均約 3 倍の高い値を示した。孔径 0.3 mm LP 膜で、オステオカルシン mRNA は、2 週目以後に発現した。3 週目には、オステオカルシン mRNA は非穿孔膜を含め、全ての LP 膜において発現が見られた。

【考察と結論】コラーゲン膜に一定の大きさの穿孔をすることで BMP 担体としての効率が顕著に増大した理由は、担体に幾何学的要素を加えることで、①BMP の膜への定着性、ならびに、②細胞の支持性が顕著に増加したためであると考えられる。孔の大きさを変えて検討した結果、とくに孔径 0.5 mm 以上の LP 膜は、骨形成用の担体として有効であると考えられる。孔径 0.1mm LP 膜で観察された特異な同心円層状の骨形成像は、この部分の骨形成が、孔の周囲縁から開始され次第に、孔の中心部に向かって進んだことを明瞭に物語っている。この特異な骨形成像は、過去において報告された多孔性ヒドロキシアパタイトに観察されたハバース系様の骨形成パターンと酷似している。今回のような孔内の骨形成の連続性が 0.1 mm 程度の孔においても同様に観察されたことは、人工細胞支持体の幾何学的要素によって組織形成が影響を受ける現象の例証と考えられる。

【将来展望】今回、開発した LP 膜は BMP 担体として、今後その孔径、厚さ、吸収性などを調節していくことにより、骨および歯周組織の再建など、歯科領域における組織工学への応用が期待される。

以上のような学位申請者による説明の途中、ならびに終了後、審査担当者による、詳細な質問が寄せられ、①穿孔が、骨形成に有利であった理由、②穿孔径を 1mm より大きくした場合の予想、③BMP 担体の要件、④人工マトリックスの機能と性質、⑤ 歯周組織再建への応用の展望、等を中心に、鋭い追及がなされたが、いずれも申請者によって直ちに明解なる回答がなされた。さらに、主査による筆記試験でも、申請者は合格点を取得できた。以上の所見から申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。