

学 位 論 文 題 名

Geometric effect of matrix upon cell differentiation:
BMP-induced osteogenesis using a new bioglass
with a feasible structure

(人工細胞外マトリックスの幾何学的要素について：
新規生体ガラス線維を利用した2種類のBMP担体の比較研究)

学位論文内容の要旨

緒 言

骨と歯周組織形成の生化学的メカニズムを明らかにし、その健全維持と、損傷あるいは障害時の再建をはかるためには、関連因子を①細胞、②細胞が産生するマトリックス、③体液、④制御因子、そして⑤メカニカル・ストレスに分類し、この5大要素を統合して考えていくことが必要である。これらの5つの要素を個々に詳細に分析し、その後それらの相互関係を明らかにし統合することによりはじめて骨形成メカニズムの全体像を解明することができる。以上の作業仮説を生化学的に証明するための実験系として、BMP(bone morphogenetic protein) が誘導する異所性骨形成を採用した。BMPは、皮膚や筋肉のような骨以外の組織においても適切な担体と共に埋植すると骨を誘導する。この実験系では細胞、体液、メカニカル・ストレスは局所にすでに備わっているので、通常、「制御因子」と「マトリックス」を投与する事で実施可能であり、制御因子はBMPにマトリックスはBMPの担体に対応する。

BMPは、単なる薬剤徐放系であるのみならず、その上で細胞が分化し増殖する細胞支持体であることが既に明らかにされている。現在、人工の細胞支持体として用いられている物質の諸性質は一般に、①物理的性質、②化学的性質、③生化学的性質に分けられるが、さらに最近、第4の性質として、④幾何学的性質の重要性が指摘され、その組織工学における決定的役割が注目され始めている。したがってBMPによる異所性骨誘導実験系においても、BMPの機能発現には担体が不可欠であり、これまでに10種類以上のBMP担体を開発試験する中で、ある担体は骨を直接誘導し、他の担体は軟骨を経て骨を誘導するという事実が発見された。このような担体依存性の原因が追究された結果、担体の幾何学的構造の違いが、主な要因であることが明らかにされてきた。すなわち、担体の幾何学的要素による血管確保構造(vasculature-inducing geometry)の違

いと、BMP によって動員され、分化、増殖する細胞に対する担体の足場機能(cell anchoring capacity)の違いであることが示唆された。

本研究ではこれらの作業仮説をさらに実証するために、新規の生体親和性ガラス (CPSA ガラス) を用いて、同一素材で全く異なる幾何学的構造をもつ BMP 担体を作製し、その骨形成能を比較検討した。この新素材は、線維成形に耐える機械的強度をもつ一方で、生体親和性を持つ現在唯一のバイオガラスである。

材料及び方法

BMP 担体として CaO、P₂O₅、SiO₂、Al₂O₃ から成る CPSA ガラスの線維 (直径 9 μm) を用い、これを 3mm および 7mm に切断し、前者はランダム方向に纏めてボール状とし、後者は一定方向に束ねてバンドル状 (それぞれ 20 mg) とした。前者の気孔率は約 90% であり、後者の気孔率は約 35% であった。これら 2 種類の幾何学的構造の異なる担体にそれぞれ rhBMP-2 (山之内製薬恵与) 2.2 μg を含浸し凍結乾燥した。4 週齢の Wistar-King AH 系ラット (体重: 約 70 g) の背部皮下に各担体を埋植した。埋植後、ボール状 CPSA は 1、2、3、4、8、20 週後に、またバンドル状 CPSA は 2、4 週後にラットを屠殺した後、摘出された。

摘出された試料は組織学観察に用いるものはホルマリン固定し、生化学的分析を行うものは凍結乾燥した。組織学的分析は固定後、40%ギ酸にて脱灰、パラフィン包埋し、5 μm に薄切しヘマトキシリン-エオジンならびにトルイジンブルー染色を行い光学顕微鏡にて観察した。生化学的分析としてはアルカリホスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン含有量ならびに RT-PCR 法にて血管新生マーカーである VEGF 受容体 Flt-1 と KDR の mRNA 発現を測定した。

結果

組織学的観察: 埋植後、1 週でボール状 CPSA の周囲に軟骨様組織が形成され、2 週では CPSA 線維に密着して旺盛な骨様組織が認められた。また骨髄組織も観察された。4 週では血管系を除いてほぼ骨で満たされ骨髄組織の増加が観察された。20 週では層状の骨が認められ、骨髄組織のさらなる増加と骨のリモデリングが観察された。一方、バンドル状 CPSA では 2 週において線維組織が形成され、骨はごく僅かに観察されたのみで、軟骨は認められなかった。

4 週においては、バンドル状 CPSA のバンドルの周辺部にごく少量の骨が確認されたのみであった。埋植後 4 週の BMP を含浸していないボール状 CPSA では骨および軟骨形成は全く認められず、線維形成が観察された。全試料において炎症反応を示す所見は認められなかった。生化学的分析: ボール状 CPSA において ALP 活性は 1 週で最大とな

りその後、徐々に減少した。2週においてボール状 CPSA とバンドル状 CPSA との ALP 値を比較すると、ボール状の方が10倍の高値を示した。4週目においてボール状 CPSA は、バンドル状 CPSA と比較してオステオカルシンの含有量では5倍量に達した。さらに、これらの担体における骨形成と血管形成の関わりを明らかにするため、埋植物中への血管新生を Flt-1 と KDR (いずれも血管内皮細胞成長因子 (VEGF) のレセプター) の mRNA 発現にて評価した。両レセプター共にボール状 CPSA では発現が高く、それに対してバンドル状 CPSA では、同一条件下で検出されなかった。

考察

以上の結果からボール状 CPSA が、バンドル状 CPSA よりもはるかに骨誘導能が高く、それが血管新生と強く関連していることは明らかである。この結果のメカニズムを考えてみると、ボール状 CPSA は計算の結果、バンドル状 CPSA の約3倍の内部空間を含む幾何学的特徴をもつことがわかった。このため、ボール状 CPSA は急速な血管新生と進入に必要な空間と、間葉細胞の足場が確保されていると考えられる。それに対しバンドル状 CPSA には、これらの幾何学的要素が欠如しているため、その結果、同一素材の担体にも関わらず骨形成能に大きな差をもたらしたと解釈される。

この解釈は血管新生を実証することによって支持された。本論文は、線維状人工細胞支持体の幾何学的要素の違いによって、その骨誘導効率が決定される事実を明確に示した数少ない例証であり、今後骨芽細胞のみならず肝細胞などの大量培養や、人工臓器の設計、組織工学において重要な根拠を与えるものと考えられる。さらに本論文は血管新生に関連するタンパク質である Flt-1 と KDR の mRNA と活発な骨形成との関係を示した最初の報告である。これらの血管新生に関わる mRNA やタンパク質の発現は今後、骨形成の新しいマーカーとして有用であると考えられる。

結 論

(1) CPSA ガラス線維を、幾何学的構造の違うボール状型およびバンドル状型に成形し、BMP 担体として骨形成能を比較した結果、ボール状 CPSA はバンドル状 CPSA に比較してはるかに骨形成の効率が高いことが分かった。

(2) ボール状 CPSA が高い骨誘導を示した理由は、その幾何学的構造が、急速な血管新生と進入に必要な空間と、骨芽細胞の足場が確保されたためと考えられる。

(3) ボール状 CPSA 埋植物において血管新生マーカーである VEGF 受容体 Flt-1 と KDR の mRNA が発現していたが、バンドル状 CPSA ではこれらのマーカーの発現は認められなかった。この事実は、上記の結論を支持すると共に、血管新生のマーカーが、骨形成のマーカーにもなり得ることを示している。

(4) CPSA ガラス線維、又は類似の性質を持つ線維性素材は、血管進入を確保できる幾何学的構造 (vasculature-inducing geometry) を与えることで有効な BMP 担体となり得ることが示されたので、今後、骨再建のための組織工学や、大量細胞培養の支持体としての応用が期待される。

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 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Geometric effect of matrix upon cell differentiation: BMP-induced osteogenesis using a new bioglass with a feasible structure

(人工細胞外マトリックスの幾何学的要素について)

新規生体ガラス線維を利用した2種類のBMP担体の比較研究)

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】骨と歯周組織形成の生化学的メカニズムを明らかにし、その健全維持と、損傷あるいは障害時の再建をはかるためには、関連因子を①細胞、②マトリックス、③体液、④制御因子、そして⑤メカニカル・ストレスに分類し、この5大要素を個々に分析すると同時に、それらを統合することが必要である。以上の作業仮説を生化学的に証明するための実験系として、BMP(bone morphogenetic protein)が誘導する異所性骨形成を採用した。この実験系では細胞、体液、メカニカル・ストレスは局所にすでに備わっているため、通常、「制御因子」と「マトリックス」を投与する事で実施可能であり、制御因子はBMPにマトリックスはBMPの担体に対応する。

これまでに10種類以上のBMP担体が比較検討された結果、ある担体は骨を直接誘導し、他の担体は軟骨を経て骨を誘導するという事実が発見され、その主な要因は、担体の幾何学的要素による血管確保構造(vasculature-inducing geometry)の違いであることが示唆された。本研究ではこれらの作業仮説をさらに実証するために、新規の生体親和性ガラス(CPSA ガラス)を用いて、同一素材で全く異なる幾何学的構造をもつBMP担体を作製し、その骨形成能を比較検討した。

【材料及び方法】本研究に用いられたCPSAガラスは線維成形に耐える機械的強度をもつ一方で、生体親和性を持つ現在唯一のバイオガラスである。CPSAガラスの線維(直径9 μ m)を用い、これを3mmおよび7mmに切断し、前者はランダム方向に纏めてボール状とし、後者は一定方向に束ねてバンドル状(それぞれ20mg)とした。これらの担体にそれぞれrhBMP-2(山之内製薬恵与)2.2 μ gを含浸し、4週齢のラットの背部皮下に埋植して、ボール状CPSAは1、2、3、4、8、20週後に、またバンドル状CPSAは2、4週後に摘出し、組織学観察、ならびに生化学的分析としてアルカリホスファターゼ(ALP)活性、オステオカルシン含有量ならびにRT-PCR法にて血管新生マーカーであるVEGF受容体Flt-1とKDRのmRNA発現を測定した。

【結果】組織学的観察では埋植後、1週でボール状CPSAの周囲に軟骨様組織が形成され、2週ではCPSA線維に密着して旺盛な骨様組織が認められた。4週では血管系を除いてほぼ骨で満たされた。20

週では層状の骨が認められ、骨髄組織のさらなる増加と骨のリモデリングが観察された。一方、バンドル状 CPSA では2週において線維組織が形成され、骨はごく僅かに観察されたのみで、軟骨は認められなかった。4週においてもバンドル状 CPSA にはごく少量の骨が確認されたのみであった。BMP を含浸していないボール状 CPSA では、骨および軟骨形成は全く認められない。全試料において炎症反応を示す所見は認められなかった。生化学的分析: ボール状 CPSA において ALP 活性は1週で最大となりその後、徐々に減少した。2週においてボール状 CPSA とバンドル状 CPSA との ALP 値を比較すると、ボール状の方が10倍の高値を示した。4週目においてボール状 CPSA は、バンドル状 CPSA と比較してオステオカルシンの含有量では5倍量に達した。これらの担体における骨形成と血管形成の関わりを明らかにするため、埋植物中への血管新生を Flt-1 と KDR (いずれも血管内皮細胞成長因子 (VEGF) のレセプター) の mRNA 発現にて評価した結果、両レセプター共にボール状 CPSA では発現が高く、それに対してバンドル状 CPSA では、同一条件下で検出されなかった。

【考察と結論】 以上の結果からボール状 CPSA が、バンドル状 CPSA よりもはるかに骨誘導能が高いことは明らかである。そのメカニズムを明らかにするため、先ずボール状 CPSA の持つ空隙を計算すると、バンドル状 CPSA の約3倍の内部空間を含む幾何学的特徴をもつことがわかった。したがってボール状 CPSA は急速な血管新生と未分化間葉細胞進入に必要な空間と、足場が確保されていると考えられる。それに対しバンドル状 CPSA には、これらの幾何学的要素が欠如しているためと解釈される。この解釈はさらに血管新生を実証することによって支持された。CPSA の BMP 担体としての有効性、その幾何学的効果を実証すると共に、本論文は血管新生に関連するタンパク質である Flt-1 と KDR の mRNA と活発な骨形成との関係を示した最初の報告である。これらの血管新生に関わる mRNA やタンパク質の発現は今後、骨形成の新しいマーカーとして有用であると考えられる。

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なされた。①ボール型 CPSA が、骨形成に有利であった理由、②ボールの直径をより大きくした場合どこまで大きな球体の骨を作り得るかの予想、③最適空隙はどの程度であるか、④BMP 担体の要件、⑤CPSA の生体内吸収性、⑥人工マトリックスの機能と性質、⑦血管と組織の酸素分圧、⑧歯周組織再建への応用等を中心に、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。