

学 位 論 文 題 名

人工細胞外マトリックスの幾何学

－ 3 種の幾何構造の異なるチタン細繊維不織布を担体とした
異所性 BMP 骨誘導 －

学位論文内容の要旨

【目的】 高齢化社会の進行にともない骨、関節の機能障害、歯の喪失による咀嚼機能障害により日常生活に支障をきたす人の数が増加し、適切な硬組織の再建が求められている。一般に局所的に骨を再建するには、細胞、マトリックス、制御因子、体液ならびにメカニカルストレスの 5 大要素を適切に組み合わせる必要がある。とくに bone morphogenetic protein (BMP) を用いて骨を再建するには、担体が不可欠である。BMP による骨誘導における担体の役割は単に BMP を保持するだけではなく、そこで細胞が分化増殖する場も提供すると考えられている。生体マトリックスに似た役割を果たす担体は、人工マトリックスとみなされ、その諸性質によって膜性骨化または内軟骨性骨化が発現される。これまで多種類の材料が BMP 担体として試験されてきたが、汎用性ある物理的強度を兼ね備えた担体は、いまだに開発されていない。そこで、本研究では BMP によるラット異所性骨誘導モデルを用いて、直径 100 μm 以下のチタン細繊維からなる不織布 (Titanium-web, TW, チタンウェブ) を BMP 担体として検討した。

【方法】 チタン担体における幾何学構造の違いが BMP による骨誘導に対してどのような影響を与えるかを調べるため、TW-50 を基本としてそれよりも細かい繊維径、あるいは太い繊維径から作られているチタン不織布を用いた。直径 8, 50 ならびに 80 μm のチタン繊維からなる TW (TW-8, TW-50 ならびに TW-80 と略) にヒト組み換え BMP-2 10 μg を含浸しペレット体として凍結乾燥後、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 2 および 4 週後にペレット体を摘出し、Cole のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、カルシウム含有量、オステオカルシン含有量、アルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシンならびに KDR/flk-1 の mRNA 発現について調べた。

【結果】 埋植 2 週後の TW-8 において、骨様組織がチタン繊維をとり囲むように形成され、繊維間の空隙は骨様組織で満たされていた。4 週後には骨様組織層の厚みが増し、骨量の増加が観察された。TW-50 においては、埋植 2 週目にチタン繊維の表面に沿って骨様組織が形成されたが 4 週目において、骨様組織は増加しなかった。TW-80 を用いた場合、埋植 2 週目に繊維の表面に沿って骨様組織が形成されたが、TW-50 に比較し

て骨量は少なく、4週目においても骨様組織の増加は認められなかった。

埋植後、2週および4週後にペレット体を摘出し、カルシウム含有量を測定した。埋植2週後においてTW-8のカルシウム含有量が最も高く、TW-80が最も低かった。埋植後4週においても同様の傾向を示した。埋植2週および4週後のオステオカルシン含有量はTW-8が他のTWと比べて最も多かった。TW-8のアルカリフォスファターゼ活性は2週においてTW-50およびTW-80のそれより約2.5倍高く、4週においてもTW-50およびTW-80よりも高い値を示した。埋植4週後に摘出したTWよりmRNAを抽出し、骨芽細胞が特異的に産生しているオステオカルシンならびに血管内皮細胞が特異的に発現している血管内皮増殖因子の受容体であるKDR/flk-1のmRNA発現についてRT-PCR法を用いて調べた。TW-8ならびにTW-50においてオステオカルシンおよびKDR/flk-1のmRNAが検出された。これらのmRNAの発現量はTW-8がTW-50に比べて多かった。

【考察】TW-8において骨形成量が最大になったメカニズムとしていくつかの可能性が考えられる。まず第1に不織布の表面積を比較するとTW-8はTW-50の6.5倍であり、TW-80の10倍である。この総表面積の差により、TW-8におけるBMP保持量の増大をもたらすことは十分考えられる。このため、TW-50およびTW-80に比べてTW-8の骨形成量が高まっている可能性は大きいと考えられた。また総表面積の増大は、BMPにより遊走する未分化間葉系細胞が付着する足場の総面積を増やすことでもあり、このため、TW-8ではTW-50およびTW-80に比べて細胞の足場が広くなり、その後の骨形成の促進に結びついたのかもしれない。第2に考えられることは、骨芽細胞と人工ECMとの間の、幾何構造の相対的大きさである。すでに、溝付チタン平板上での線維芽細胞培養の実験などにより、ある幅（約5 μm ）以上の溝は細胞成長を方向付けるが、より狭い溝は、細胞の成長方向を規制できないことが報告されている。今回、用いたTW-8の繊維径は明らかに骨芽細胞の大きさよりも小さいので、細胞はその上での安定した定着は難しいか、出来るにしても、TW-50やTW-80とは同じとは考え難い。このような臨界的大きさが、TW-8と、TW-50（およびTW-80）との間に存在するため、今回の差をもたらした可能性があると考えられた。本実験において、KDR/flk-1のmRNA発現量はTW-8の方がTW-50に比べて大きかったことから、TW-8における血管の侵入が示唆された。誘導された組織への血管侵入という点では、空隙の最大孔径が200 μm であるTW-50の方が、最大孔径が30 μm であるTW-8よりも有利であると考えられるが、これを上回る血管侵入機構がTW-8不織布には備わっているのかもしれない。以上より、人工マトリックスの幾何学的性質の一つであるTWの繊維径が、骨芽細胞の定着と分化・増殖、さらに血管の侵入を制御している可能性が示唆された。

【結論】TWを担体として用いたラット皮下のBMP誘導骨形成における骨形成量は、人工マトリックスの幾何学的性質の一つであるTWの繊維径に依存し、用いた3種のTWでは繊維径8 μm のTWが最も効率良く骨を誘導することが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

人工細胞外マトリックスの幾何学

－ 3 種の幾何構造の異なるチタン細繊維不織布を担体とした
異所性 BMP 骨誘導－

審査は、全審査委員出席のもと、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

一般に局所的に骨を再建するには、細胞、マトリックス、制御因子、体液ならびにメカニカルストレスの5大要素を適切に組み合わせる必要がある。とくに bone morphogenetic protein (BMP) を用いて骨を再建するには、担体が不可欠である。BMP による骨誘導における担体の役割は単に BMP を保持するだけではなく、そこで細胞が分化増殖する場も提供すると考えられている。これまで多種類の材料が BMP 担体として試験されてきたが、汎用性ある物理的強度を兼ね備えた担体は、いまだに開発されていない。そこで、本研究では BMP によるラット異所性骨誘導モデルを用いて、直径 100 μm 以下のチタン細繊維からなる不織布 (Titanium-web, TW, チタンウェブ) を担体として用い、この担体の幾何学構造の違いが BMP による骨誘導に対してどのような影響を与えるかを調べることを目的とした。

直径 8, 50 ならびに 80 μm の TW (TW-8, TW-50 ならびに TW-80 と略) にヒト組み換え BMP-2 10 μg を含浸しペレット体として凍結乾燥後、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 2 および 4 週後にペレット体を摘出し、Cole のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、カルシウム含有量、オステオカルシン含有量、アルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシンならびに KDR/flk-1 の mRNA 発現について調べた。

埋植 2 週後の TW-8 において、骨様組織がチタン繊維をとり囲むように形成され、繊維間の空隙は骨様組織で満たされていた。4 週後には骨様組織層の厚みが増し、骨量の増加が観察された。TW-50 においては、埋植 2 週目にチタン繊維の表面に沿って骨様組織が形成された。TW-80 を用いた場合も同様に繊維の表面に沿って骨様組織が形成されたが、TW-50 に比較して形成された骨量は少なかった。

ペレット体中のカルシウム含有量は、2 週後において TW-8 の含有量が最も高く、

TW-80 が最も低かった。オステオカルシン含有量は TW-8 の場合が他の TW と比べて最も多かった。2 週後のアルカリフォスファターゼ活性は TW-8 の場合が、TW-50 および TW-80 のそれより約 2.5 倍高かった。RT-PCR 法を用い、TW-8 ならびに TW-50 のペレット体中でオステオカルシンおよび KDR/flk-1 の mRNA の発現が検出された。これらの mRNA の発現量は TW-8 が TW-50 に比べて多かった。

TW-8 において骨形成量が最大になったメカニズムとしていくつかの可能性が考えられた。まず第 1 に不織布の表面積の差により、BMP 保持量が TW-8 で増大したことが考えられた。第 2 に、骨芽細胞と人工 ECM との間の、幾何構造の相対的大きさの差である。溝付チタン平板上での線維芽細胞培養の実験などから、ある幅 (約 5 μm) 以上の溝は細胞成長を方向付けるが、より狭い溝は細胞の成長方向を規制できないことが報告されている。今回、用いた TW-8 の繊維径は明らかに骨芽細胞の大きさよりも小さいので、細胞は其上での安定した定着は難しいか、出来るにしても、TW-50 や TW-80 とは同じとは考え難い。TW-8 における血管の侵入が示唆されたことから、誘導された組織への血管侵入という点では、空隙の最大孔径が 200 μm である TW-50 の方が、最大孔径が 30 μm である TW-8 よりも有利であると考えられたが、これを上回る血管侵入機構が TW-8 不織布には備わっているかもしれない。以上より、人工マトリックスの幾何学的性質の一つである TW の繊維径が、骨芽細胞の定着と分化・増殖、さらに血管の侵入を制御している可能性が示唆された。

本研究から、TW を担体として用いたラット皮下の BMP 誘導骨形成における骨形成量は、人工マトリックスの幾何学的性質の一つである TW の繊維径に依存し、用いた 3 種の TW では繊維径 8 μm の TW が最も効率良く骨を誘導することが明らかになった。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容について口頭により質疑が行われた。主な質疑項目は、不織布について、担体の BMP の保持能について、組織像の骨以外の組織は何か、骨形成に機能する骨芽細胞の組織内の由来、チタン表面への細胞の付着について、足場としてのチタン細繊維の働きについて、血管侵入のしくみについて、骨形成と骨芽細胞の基質産生と石灰化の関係について等であった。また、本研究の背景となる骨形成や骨吸収の機構についてなど多岐にわたる関連事項の試問も行った。学位申請者からは、いずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られ、今後の研究の方向性についても明確な将来の展望が示された。

本論文は、人工マトリックスの幾何学的性質の一つである TW の繊維径の違いが BMP 誘導骨形成能を制御することを見出した点が評価され、この業績は、今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士 (歯学) の学位を授与されるにふさわしいと認められた。