

学位論文題名

Bone augmentation by implantation of FGF2-loaded collagen gel-sponge composite scaffold

(FGF2含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体移植による骨増生効果)

学位論文内容の要旨

[緒言]

再生療法には細胞の分化や増殖を促進する成長因子の応用が必要であると考えられている。線維芽細胞増殖因子 2 (Fibroblast growth factor-2; FGF2) は線維芽細胞や血管内皮細胞の増殖を高め、創傷治癒を促進することが知られ、骨芽細胞や骨髄間質細胞などの増殖を促進することも報告されている。一方、組織工学的手法を用いた骨再生研究において、細胞の定着や組織の三次元的骨格を構成するスキャフォールドの重要性が明らかであり、中でも天然高分子であるコラーゲンは生体親和性に優れ、架橋方法を変えることで機械的強度を調整することが可能である。近年開発されたコラーゲンゲル-スポンジ複合体は、高い細胞誘導性と生体吸収性を示すコラーゲンハイドロゲルと生体親和性の高い線維化アテロコラーゲン (FC) -熱変性アテロコラーゲン (HAC) 複合体スポンジで構成されており、組織置換性、細胞侵入性が良いためスキャフォールドとして有効であることが報告されている。

本研究では、ラット頭蓋骨に骨窩洞を作製して FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を移植し、骨形成に対する効果を病理組織学的に評価した。

[材料・方法]

1. FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体の作製

ウシ真皮由来アテロコラーゲン粉末に滅菌蒸留水、塩酸を加えてアテロコラーゲン溶液とし、アスコルビン酸と塩化第二銅を加え、1.5%コラーゲンハイドロゲルとした。FGF2 (フィブラスト®スプレー500) をコラーゲンハイドロゲルに混和、攪拌して FGF2 含有コラーゲンハイドロゲル溶液を作製した。FC-HAC スポンジは以下の方法で作製したものをオリンパステルモバイオマテリアルより提供を受けた。ウシ真皮より得られたタイプ I アテロコラーゲンを酸性溶液で溶解させ、中和処理を行って作製された線維化アテロコラーゲン (FC) と、60°C で 30 分間熱処理して作製された熱変性アテロコラーゲン (HAC) を 9:1 の割合で混合し、凍結乾燥処理によりスポンジ状に成形、熱脱水架橋処理を行って作製された。FC-HAC スポンジを 6×6×3mm のサイズに成形し、FGF2 含有コラーゲンハイドロゲルに 6°C で 1 週間浸透させ、FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を作製した。スポンジあたりの FGF2 含有量は 0, 3, 15µg となるように調整した。

2. 手術方法

実験動物は、Wistar 系雄性ラット (10 週齢) を用いた。ペントバルビタールナトリウム 0.6ml/kg を用いた全身麻酔、及びエピネフリン (1/80000) 含有 2%塩酸リドカインによる局所麻酔を施した後、頭蓋皮膚切開を行い頭蓋骨中央を露出、骨膜を剥離した。ラウンドバーを用いて矢状縫合部より前方に縦 4mm、横 4mm、深さ 0.2mm の骨窩洞を形成し、骨髄腔に穿孔させた。ラットを 3 群に分け、0, 3, 15µg FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を骨窩洞を被覆するように移

植し、それぞれ F0, F3, F15 群とした。その後、皮膚弁を縫合して閉鎖創とした。観察期間を 1, 2, 5 週とし、新生骨面積、新生骨高さ、残存スポンジ面積、残存スポンジ高さを求めた。Two-way ANOVA 検定および多重比較に Bonferroni 検定を行い、有意水準を 5%とした。

[結果]

1 週の F3 群および F15 群では、骨窩洞に近接した結合組織内やコラーゲンゲルスポンジ複体内に大量の線維芽細胞様細胞が観察され、骨窩洞に新生骨が観察された。新生骨やその周囲の結合組織には多数の血管が認められた。F0 群では、骨窩洞上に複合体が認められたが、内部に細胞はほとんど見られなかった。新生骨はわずかであった。2 週の F3 群では、多くの新生骨が認められた。新生骨は細い骨梁を有しており、新生骨によって骨窩洞が完全に満たされているものや、骨窩洞領域を超えて著しく骨増生している標本も観察された。複合体の大部分は消失し、残存する複合体の内部には多くの線維芽細胞様細胞が認められた。F15 群では、F3 群よりもさらに骨窩洞領域を大きく超える新生骨が観察された。F0 群では、複合体の残存が多く認められた。新生骨が観察されたが、骨窩洞領域の 8 割程度に止まった。5 週の F3 群および F15 群では、2 週と同様に骨窩洞領域を大きく超える新生骨が認められ、骨梁幅は増加し、層板構造が明瞭化し、骨髓腔がみられた。複合体はほとんど残存していなかった。F0 群でも、骨窩洞部に骨増生し、骨梁幅は 2 週に比較して増加していたが、層板構造が不明瞭な部位が認められた。複合体の残存はわずかであった。

新生骨面積は、F3 群、F15 群のすべての観察期間で F0 群と比較して有意に高かった。1 週および 2 週では F15 群は F3 群に比較して高い新生骨面積を示したが、統計学的有意差は認められなかった。新生骨高さは、F15 群はすべての観察期間で、また F3 群は 2 週において F0 群と比較して有意に高い値であった。1 週および 2 週の F15 群は F3 群より有意に高い新生骨形成を示した。残存スポンジ面積は、1 週において、F3 群、F15 群が F0 群と比較して有意に高かったが、2 週では F3 群、F15 群は F0 群と比較してスポンジ残存面積が減少しており、F3 群と F0 群との間に有意差が認められた。5 週では各群ともスポンジ残存はわずかで、有意差はみられなかった。残存スポンジ高さも同様に、1 週において F3 群、F15 群が F0 群に比較して有意に高かったが、2 週および 5 週では各群とも低い値を示し、群間に有意差は認められなかった。

[考察]

FGF2 含有コラーゲンゲルスポンジ複体を移植した結果、骨窩洞に近接した結合組織内や複体内に線維芽細胞様細胞が早期から顕著に認められ、さらに有意に骨増生することが明らかとなった。これは添加した FGF2 が骨髓や骨、骨膜由来の骨原性細胞に作用して増殖を促進し、骨形成が促進されたと考えられた。また、1 週および 2 週の F3, F15 群は、F0 群と比較して複合体周囲の結合組織内に多数の血管が認められたことから、活発な血管新生が誘導されたと推察された。1, 2 週 F15 群の新生骨面積は F3 群よりも多く、また新生骨高さにおいては F3 群と比較して有意に高い値であったことから、FGF2 は濃度依存性に骨形成を増加する可能性があると考えられた。

1 週の残存スポンジ面積及び残存スポンジ高さにおいて F3 群、F15 群は F0 群と比較して有意に高い値を示した。F3 群、F15 群では複合体内部への細胞侵入が著明で、早期に肉芽組織が形成されていた。肉芽組織の存在は組織収縮を緩和すると考えられ、複合体に対する圧迫の差が初期の残存スポンジ面積および高さに関連している可能性がある。また、スキャホールドとしてコラーゲンハイドロゲルと FC-HAC を組み合わせたコラーゲンマテリアルを移植に用いているが、コラーゲンハイドロゲルは高い細胞誘導性と生体吸収性を示し、FC-HAC 複合体は再生の場のスペースメイキング効果が良好であることが明らかになっている。コラーゲンゲルスポンジ複体内への細胞侵入が確認され、炎症性細胞浸潤は少なかったことから、複合体は良好な生体親和性を有し、再生の場への細胞集積と組織への置換が円滑に進行したことが示唆された。

[結論]

FGF2 含有コラーゲンゲルスポンジ複体を作製し、ラット頭蓋骨窩洞へ移植して組織学的観察および計測を行った結

果，FGF2 含有コラーゲンゲル - スポンジ複合体は，早期から骨形成を促進し，新生骨量を有意に増加させた．また良好な生体親和性，生体吸収性を示したことから骨再生療法に有用であることが示された．

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 土 門 卓 文
副 査 教 授 網 塚 憲 生

学 位 論 文 題 名

Bone augmentation by implantation of FGF2-loaded collagen gel-sponge composite scaffold

(FGF2含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体移植による骨増生効果)

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対して本論文の概要の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

再生療法には細胞の分化や増殖を促進する成長因子の応用が必要であると考えられている。線維芽細胞増殖因子 2 (Fibroblast growth factor-2; FGF2) は線維芽細胞や血管内皮細胞の増殖を高め、創傷治癒を促進することが知られ、骨髄間質細胞や骨芽細胞への増殖を促進することが報告されている。一方、近年開発されたコラーゲンゲル-スポンジ複合体は、コラーゲンハイドロゲルと、線維化アテロコラーゲン (fibrillar collagen; FC)-熱変性アテロコラーゲン (heat-denatured collagen; HAC) 複合体スポンジで構成されており、組織置換性、細胞侵襲性が良いためスキャフォールドとして有効であることが報告されている。本研究では、ラット頭蓋骨に骨窩洞を作製して FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を移植し、骨形成に対する効果を病理組織学的に評価した。

まず、ウシ真皮由来アテロコラーゲン粉末に塩酸を加えてアテロコラーゲン溶液とし、アスコルビン酸と塩化第二銅を加え、1.5%コラーゲンハイドロゲルとした。FGF2 (フィブラスト[®]スプレー500) をコラーゲンハイドロゲルに混和、攪拌して FGF2 含有コラーゲンハイドロゲル溶液を作製した。FC-HAC スポンジは、ウシ真皮由来タイプ I アテロコラーゲンより作製された FC と HAC を 9:1 の割合で混合し、凍結乾燥処理と熱脱水架橋処理を行って作製されたものをオリンパステルモバイオマテリアルより提供を受けた。FC-HAC スポンジを 6×6×3mm のサイズに成形し、FGF2 含有コラーゲンハイドロゲルに浸透させ、FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を作製した。スポンジあたりの FGF2 含有量は 0, 3, 15 μ g となるように調整した。

実験動物は、Wistar 系雄性ラット (10 週齢) を用いた。頭蓋皮膚切開を行い頭蓋骨を露出、骨膜を剥離した。縦 4mm、横 4mm、深さ 0.2mm の骨窩洞を形成し、骨髄腔に穿孔させた。ラットを 3 群に分け、0, 3, 15 μ g FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を骨窩洞を被覆するように移植し、それぞれ F0, F3, F15 群とした。観察期間を 1, 2, 5 週とし、新生骨面積、新生骨高さ、残存スポンジ面積、残存スポンジ高さを求めた。

1 週の F3 群および F15 群では、骨窩洞に近接した結合組織内やコラーゲンゲル-スポンジ複体内に多数の線維芽細胞様細胞が観察され、骨窩洞に新生骨が観察された。新生骨やその周囲の結合組織には多数の血管が認められた。F0 群では、骨窩洞上に複合体が認められたが、内部に細胞はほとんど見られず、新生骨はわ

ずかであった。2 週の F3 群では、多くの新生骨が認められ、細い骨梁を有しており、新生骨によって骨窩洞が完全に満たされているものや、骨窩洞領域を超えて著しく骨増生している標本も観察された。複合体の大部分は消失し、残存する複合体の内部には多くの線維芽細胞様細胞が認められた。F15 群では、F3 群よりもさらに骨窩洞領域を大きく超える新生骨が観察された。F0 群では、複合体の残存が多く認められた。新生骨が観察されたが、骨窩洞領域の 8 割程度に止まった。5 週の F3 群および F15 群では、2 週と同様に骨窩洞領域を大きく超える新生骨が認められ、骨梁幅は増加し、層板構造が明瞭化し、骨髓腔がみられた。複合体はほとんど残存していなかった。F0 群でも、骨窩洞部に骨増生し、骨梁幅は 2 週に比較して増加していたが、層板構造が不明瞭な部位が認められた。複合体の残存はわずかであった。

新生骨面積は、F3 群、F15 群のすべての観察期間で F0 群と比較して有意に高かった。新生骨高さは、F15 群はすべての観察期間で、また F3 群は 2 週において F0 群と比較して有意に高い値であった。1 週および 2 週の F15 群は F3 群より有意に高い新生骨形成を示した。残存スポンジ面積は、1 週において、F3 群、F15 群が F0 群と比較して有意に高かったが、2 週では F3 群、F15 群は F0 群と比較してスポンジ残存面積が減少しており、F3 群と F0 群との間に有意差が認められた。5 週では各群ともスポンジ残存はわずかで、有意差はみられなかった。残存スポンジ高さも同様に、1 週において F3 群、F15 群が F0 群に比較して有意に高かったが、2 週および 5 週では各群とも低い値を示し、群間に有意差は認められなかった。

FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を移植した結果、骨窩洞に近接した結合組織内や複合体内に線維芽細胞様細胞が早期から顕著に認められ、有意に骨増生することが明らかとなった。これは FGF2 が骨原性細胞に作用して増殖を促進し、骨形成が促進されたと考えられた。また、1 週および 2 週の F3、F15 群は、F0 群と比較して多数の血管が認められたことから、骨形成の促進に関与した可能性が考えられる。以上より、FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体は、早期から骨形成を促進し、新生骨量を有意に増加させた。また良好な生体親和性、生体吸収性を示したことから骨再生療法に有用であることが示された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項は、

- (1) コラーゲンハイドロゲルと FGF2 との結合様式について
- (2) FGF2 で増殖する骨芽細胞の分化段階について
- (3) FC-HAC スポンジとコラーゲンゲルスポンジの骨形成に対する有用性について
- (4) 線維芽細胞増殖と血管新生、骨形成の関係、経時的変化について

などであった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は、ラット頭蓋骨に骨窩洞を作製して FGF2 含有コラーゲンゲル-スポンジ複合体を移植し、骨形成に対する効果を病理組織学的に評価しており、臨床における骨再生療法への応用に対して重要な指針を与えたことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。