

論文内容の要旨

Combined administration of BMP-2 and HGF facilitate bone regeneration through angiogenic mechanisms

—BMP-2 と HGF の同時投与は、血管新生により骨再生を促進する—
(Journal of Hard Tissue Biology 第 24 巻 1 号、平成 27 年 1 月)

ますだ ともゆき
増田 智幸

I. 研究目的

骨再生を促進することは、治療期間の短縮や治療効果の向上、患者の経済的・心理的負担の軽減が期待できる。そのために骨移植、人工骨移植、幹細胞移植、成長因子投与等の効果について数多くの研究が行われている。中でも成長因子は、他の組織に侵襲を加えることなく使用でき、またすでにヒトに使用されているものもあることから、最も臨床応用において効果の高い方法であると思われる。従来の成長因子についての検討方法は、主に培養細胞を用いた骨芽細胞への分化誘導効果や実験動物を用いた骨量の変化を組織変化で検証する実験が主体であった。本研究では、骨組織修復モデルを用いて、ヒトで応用可能だと考えられる成長因子の組み合わせとその効果のメカニズム、さらにその過程での血管内皮細胞やその前駆細胞の増殖と血管形成に着目して解析を行った。

II. 研究方法

1. 実験には、マウス頭蓋骨骨欠損モデルを用いた。左右頭頂骨に 2.4mm の骨欠損をトレパンバーにて形成した。骨欠損部に種々の成長因子を徐放性ゼラチンに含浸後に埋入し、骨膜を復位して縫合した。経時的にマイクロ CT 撮影を行い、画像解析ソフトにて骨再生面積の測定を行った。
2. 組織学的解析には H-E 染色および免疫染色を行った。採取した組織は、4%パラホルムアルデヒドにて固定を行い、2.5%EDTA にて脱灰後、通法にて 6 μmパラフィン切片または 10 μm凍結切片を作成した。その後、H-E 染色および免疫染色を行った。
3. 血管内皮前駆細胞に発現する遺伝子 Flk1 に緑色蛍光タンパク質 GFP を結合した Flk1-GFP マウスを使用し、同様の骨再生実験を行った。蛍光実体顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて骨欠損部の撮影をした。その後、組織学的解析を行った。

III. 研究成績

1. マイクロ CT 解析から、HGF と BMP-2 の同時投与群(BMP-2+HGF 群)が他の投与群 (FGF-2, HGF, BMP-2, BMP-2+FGF-2 群) よりも骨再生を促進することが判明した。
2. 組織学的解析では、BMP-2 群を対照群とした。実験群とした BMP-2+HGF 群で、術後 1 週からゼラチンの分解吸収、細胞の侵入、新生骨の形成の進行を認めた。また、術後 4 週では、BMP-2+HGF 群で骨断端部の癒合が見られた。実験期間全体を通じて、BMP-2 群と比較して、BMP-2+HGF 群で結合組織置換と新生骨形成の促進が認められた。
3. 術後 3 日に観察すると、BMP-2+HGF 群では、BMP-2 群と比較して骨欠損部周囲に Flk1 陽性細胞が多く認められた。術後 7 日では、Flk1-GFP 陽性細胞の面積、Ki67 陽性細胞の数が、BMP-2 群よりも有意に高い値を示した。

IV. 考察及び結論

骨再生に関わる成長因子の組み合わせを検討した結果、BMP-2にHGFを同時に加えることによって著明な骨再生を認めた。BMP-2とHGFの同時投与群は、BMP-2の単独投与群と比較して、数多くの血管様管腔構造の形成とゼラチンスポンジの早期の吸収が観察された。HGFの受容体であるc-Metが血管内皮細胞や線維芽細胞に発現していることから、HGFは血管内皮細胞に対して直接あるいは周囲の線維芽細胞を介して作用することで骨欠損部における血管新生を活発にさせたと考えられた。その結果、血管を介して骨髄由来の間葉系幹細胞を骨欠損部へと遊走させ、これらの細胞が骨芽細胞へと分化することにより骨形成を活発に行ったと推測した。さらにHGFによる線維芽細胞の活性化は、足場材のゼラチンスポンジの分解・吸収も促進すると同時にコラーゲン等の基質形成も誘導することから、骨再生に必要な仮骨形成の足場を構築することにも貢献したと考えられた。またHGFは血管内皮細胞によるBMPの分泌を促進するという報告もあり、HGFは多様にかつ相乗的に骨形成促進に作用した。このように骨芽細胞分化誘導因子であるBMP-2にHGFを加えることによって、骨再生に必要な組織環境が早期に構築されたために骨再生のスピードが加速したと考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 教授 原田 英光 (解剖学講座 発生生物・再生医学分野)
副査 教授 杉山 芳樹 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)

臨床において骨再生を促進することは、治療期間の短縮や治療効果の向上、患者の経済的・心理的負担の軽減が期待できる。そこで著者らは、骨組織修復モデルを用いて、ヒトで応用可能だと考えられる成長因子の組み合わせとその効果のメカニズム、さらにその過程での血管内皮細胞やその前駆細胞の増殖と血管形成に着目して解析を行った。

研究方法：実験にはマウス頭蓋骨骨欠損モデルを用いた。左右頭頂骨に2.4mmの骨欠損をトレパンバーにて形成した。骨欠損部に種々の成長因子を徐放性ゼラチンに含浸後に埋入し、骨膜を復位して縫合した。経時的にマイクロCT撮影を行い、画像解析ソフトにて骨再生面積の測定を行った。また、組織学的解析にはH-E染色および免疫染色を行った。さらに、血管内皮前駆細胞に発現する遺伝子Flk1に緑色蛍光タンパク質GFPを結合したFlk1-GFPマウスを使用し、同様の骨再生実験を行った。そして、蛍光実体顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて骨欠損部の撮影を行った後、組織学的解析を行った。

結果：マイクロCT解析から、HGFとBMP-2の同時投与群が他の投与群

(FGF-2, HGF, BMP-2, BMP-2+FGF-2群)よりも骨再生を促進することが判明した。また組織学的解析では、同時投与群において、術後1週で骨断端部周囲に仮骨形成と血管様管腔構造を認めた。さらに骨断端部のFlk1-GFP陽性細胞の面積、骨断端部と軟組織表層の細胞増殖マーカーKi67陽性細胞数が有意に高い値を示した。これらの結果より、BMP-2とHGFの同時投与はHGFの血管新生促進作用により骨再生を促進させることが示唆された。

本研究で特筆すべき点は、ヒトで応用可能な成長因子の中で自然治癒しない骨欠損量に対して極めて短時間で修復を誘導する組み合わせを見出したことである。さらに、骨再生の促進には血管内皮細胞の増殖と分化による血管新生が重要であることをFlk1-GFPマウスを用いることで、生体内の現象として

明確に捉えたことである。このように、より効果的でかつ実践的な骨再医療を意識しながら研究に取り組んだ姿勢や考え方、また研究手法の選択方法などは高く評価でき、学位に値するものと評価した。

試験・試問結果の要旨

最初に本論文の要旨について説明が行われた。続いて主査、副査から、より具体的な研究方法や結果の解釈・意義などの質問があった。いずれの質問についても明快かつ的確な回答が得られたことから、学位に値する学識と研究能力を有するものと認めた。

参考論文 なし