

論文内容の要旨

Healing mechanism surrounding transplanted bone using transgenic mice expressing red fluorescent protein *in vivo*

赤色蛍光強発現遺伝子導入マウスを用いた骨欠損部における移植骨周囲組織の治癒機構の解析

(Journal of Oral Tissue Engineering 平成 29 年 掲載予定)

井上^{いのうえ} 学^{まなぶ}

I. 研究目的

歯を喪失した場合の機能回復のためデンタルインプラントが適用となる症例が増加しているが、歯槽骨が失われ、骨造成が必要な症例も少なくない。骨造成または骨移植手術のゴールドスタンダードは自家骨移植であり、水平的、垂直的な骨量の回復が必要となる骨欠損症例に対しては、自家骨を一塊として用いる。一方、移植骨と既存骨の界面における細胞動態と治癒機構の詳細は現在も明らかとされていない。本研究においては、赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス(以下 td Tomato マウス)の蛍光反応を利用することで、生体内に移植した組織の細胞動態を体表から観察することを可能とした。さらに、ヌードマウスの骨欠損部に td Tomato マウスの骨片を移植して、蛍光反応を追跡し、骨移植後の治癒機構と細胞動態の解明、さらには低侵襲で効率的な骨造成法の検討を目的として以下の実験を行った。

II. 研究方法

(1) 8 週齢ヌードマウス頭蓋骨正中に直径 4 mm の骨欠損を形成し、8 週齢 td Tomato マウスより採取した同径の頭蓋骨を、骨欠損部に移植した。移植部位の形態学的評価は、2、4、8、20、24 週で、マイクロ CT の撮影、さらに IVIS® Lumina Imaging System(以下 IVIS)を用いて蛍光イメージングを行った。IVIS における評価は Image J にて、蛍光強度および蛍光発現部位の面積を測定、評価した。

(2) 垂直的骨量回復を想定し、8 週齢ヌードマウスの頭蓋骨上へ td Tomato マウスより採取した直径 4 mm の頭蓋骨を移植し、既存骨と移植骨界面における骨再生能をマイクロ CT および IVIS にて評価した。8 週、16 週でマウスを屠殺し、組織切片を作成した。

III. 研究成績

ヌードマウス頭蓋骨欠損部と移植骨接触面においては新生骨様組織が一部確認された。移植した td Tomato マウス頭蓋骨は 24 週経過後においても、蛍光反応を示していた。頭蓋骨欠損部では、移植骨からの新生骨形成を示す赤色蛍光反応は観察されなかった。蛍光発現部位の面積は、対照群と比較し優位に減少したが、術後 2 週から 16 週において蛍光発現部位の面積に有意差はなかった。

IV. 考察及び結論

骨欠損部に移植した td Tomato 頭蓋骨は IVIS にてその存在を確認できたことから、移植された組織は壊死することなく、生着しその骨片自らが代謝していることが明らかとなった。また新生骨の形成は、移植骨側の細胞ではなく、既存骨側の骨系細胞が担当していることが示唆された。また、移植骨片からの明らかな拡散・増殖的な骨形成は認められなかった。すなわち、移植骨片は、主に新生骨形成のためのスキャホールドとしての役割を担っており、いわゆる骨形成能は必ずしも高くないものと考えられ、今後はより骨形成能の高い骨移植材料の開発が必要であることが示唆された。一方、局所の炎症が破骨細胞を誘導し、骨吸収を亢

進するという報告もあるため、将来的には、術後の炎症下においても骨誘導・骨伝導を可能とする骨移植材の開発についても検討していきたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 八重柏 隆 (歯科保存学講座 歯周療法学分野)
副査 教授 近藤 尚知 (補綴・インプラント学講座 補綴・インプラント学分野)
副査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)

歯を喪失した場合の機能回復の方法として現在、デンタルインプラントの適用となる症例が増加している。しかし、抜歯後または抜歯にいたる過程で、すでに歯槽骨が失われ、骨量不足によりインプラントの埋入が困難となる症例も少なくない。したがって、抜歯後の骨量維持や回復は重要な課題となっている。骨量維持や失われた歯槽骨の回復手段として、自家骨移植、他家骨移植、異種骨移植、代用骨移植が行われている。自家骨は骨形成能、骨伝導能、骨誘導能を、他家骨は骨伝導能、骨誘導能を有し、異種骨は骨誘導能を、代用骨は骨伝導能のみを有している。従って現在も失われた歯槽骨の回復手段としては、骨形成能、骨伝導能、骨誘導能を有する自家骨移植がゴールドスタンダードとされている。しかし、自家骨移植の治癒機構は移植片からの拡散・増殖的再生なのか、吸収・置換的再生なのか明らかではない。

本研究では生体内に移植した細胞や臓器を体表から観察可能な赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス (以下 td Tomato マウス) に注目し、このマウスから採取した骨組織片をヌードマウスの骨欠損部に移植して、骨移植後の移植骨ならびにその周囲の既存骨の組織動態を解明した。ヌードマウス頭蓋骨正中にφ4 mmの骨欠損を作成し、td Tomato マウスより採取した同径の頭蓋骨を移植し、放射線学的検索および組織学的検索を行った。さらに IVIS® Lumina Imaging System (以下 IVIS) を用いて蛍光イメージングを行い、蛍光強度、蛍光発現面積を評価した。その結果、移植骨周囲に明らかな新生骨様組織は確認されなかったが、既存骨と接触している一部、また既存骨-移植片間距離の短い部位において新生骨様硬組織が確認された。蛍光イメージングの結果から、蛍光反応は24週経過後においても持続していた。蛍光発現面積に有意差はなかった。組織学的検索の結果、赤色蛍光反応を示す細胞が既存骨内に侵入している像は確認できなかったが、移植片に蛍光反応を示さない細胞は確認された。また既存骨側から移植片に向かい伸長している細胞像が確認されたが、これらは赤色蛍光反応を示さなかった。このことから、骨再生は拡散・増殖的再生ではなく吸収・置換的再生である可能性が示唆された。上記の実験結果から、骨再生は移植片と既存骨との接触面積の増大によって、顕著に確認できたことから、td Tomato マウスより採取した頭蓋骨をヌードマウス頭蓋骨直上に移植し、同様の実験を行った。その結果、移植片周囲の新生骨様硬組織は前回と比較し、より顕著に確認された。また蛍光イメージングは16週において優位に減少し、蛍光発現面積も16週において優位に減少した。組織学的検索の結果、Osteopontin (OPN) を示す緑色部位は骨接触面において、移植片を示す赤色部位と一致して、皮質骨に強い発現を示した。蛍光反応を示していない部位にも緑色の Osteopontin (OPN) および Osteocalcin (OC) が確認されたことから、これらは移植骨中の骨芽細胞が OPN や OC を分泌した後に、死細胞になったためと考えられる。

以上の結果から組織学的検索の結果、既存骨-移植骨間において、再生された新生骨様組織から赤色蛍光シグナルが観察できないことから、移植骨は骨形成能を有さない可能性が示唆される。頭蓋冠移植を

行わなかった対照群では骨再生は確認されなかったことから、骨組織再生促進のためには移植骨による誘導が必要であると考えられる。移植骨内において OPN および OC などの骨芽細胞マーカーの発現が確認されたが、移植骨由来の骨芽細胞が新生骨内に認められることはなかった。このことから、移植骨は、骨新生の適切な足場として働き、骨芽細胞などの骨再生性細胞を周囲既存骨から誘導し、その後、新生骨に置換されると考えられる。移植後 24 週の移植骨における OPN および OC の発現は、移植骨中の骨芽細胞が壊死せずに移植片が生着していることを意味するが、移植骨由来の骨芽細胞による新生骨の形成は認められない。また、放射線学的検索ならびに非脱灰凍結切片の免疫組織学的検索の結果から、移植骨に隣接して骨組織再生が誘導され、その移植骨自体は新生骨に置換される可能性が示唆される。以上のことから、自家骨移植等の骨移植では移植骨自体が働いて新生骨を形成することは期待できないが、移植骨が周囲既存骨由来の骨芽細胞の良い足場（スキヤホールド）となり、骨再生を促進することが示唆される。

試験・試問結果の要旨

上記より、移植骨が周囲既存骨由来の骨芽細胞の良い足場（スキヤホールド）となり、骨再生を促進することが明らかとなり、今後の臨床の現場における骨再生療法確立の一助となるものと考えられる。本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士(歯学)の学位を授与することを適当と認める。

主査・副査から井上に対して、多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

八重柏 教授より

問：IVIS の結果について、2 週での赤色傾向が頭蓋以外の部位に見られるのはなぜか？

答：頭蓋に欠損を作成し骨移植を行っているため、侵襲が非常に大きい。術後の炎症による自家蛍光の可能性が考えられる。術中にマーキングのために行ったアルコールを含むマーカーでナンバリングした際に、皮膚に炎症が発生しており、該当部位には赤色蛍光反応が見られた。また、ヌードマウスの欠損部に td Tomato マウス頭蓋骨を移植しているため、ヌードマウスの術野から赤色蛍光タンパクが血流に乗って浸出していった可能性も考えられる。

問：CT 測定結果について、実験 1 では 2、6、24 週で実験 2 では 2、4、16 週なのはなぜか？

答：実験計画の関係上、撮影するタイミングを合わせることが困難となってしまう、このような形となった。可能な限り撮影タイミングは合わせるべきであるため、実験計画を確実に遂行可能なプランを検討すべきであった。

問：実験 1 と実験 2 の違いは？

答：実験 1 は過去の論文からクリティカルサイズディフェクト（直径 4 mm）の骨欠損を作成し、骨再生を検証した。実験 2 は実験 1 より得られた結果から、移植骨と既存骨とを接触させることが移植骨周囲の骨新生を観察するための良い条件であることが明らかとされ、また実際の臨床現場における骨移植により近い状況を再現し、骨再生を検証した。

問：本論文における新しい知見と臨床的意義はなにか？

答：自家骨移植は骨形成能、骨誘導能、骨伝導能を有するため、骨移植においてゴールドスタンダードとされているが、移植片の細胞動態は明らかとされていない。本研究によって、移植片からの拡散的骨

再生は観察されず、移植後の新生骨形成は、既存骨からの骨再生であることが示唆された。自家骨に骨形成能がない可能性も示唆されたことから、骨移植に最も重要な点は、骨再生のための良好な足場を提供することである。足場となる移植材の種類による骨再生の違いを今後、検討していく必要がある。また骨再生の起点となっている細胞は、既存骨側の骨再生性細胞であることが明らかとなり、骨リモデリングに関与する細胞は、OPN やフィブロネクチン等のタンパク質を標的にしているため、骨再生性細胞を最も誘導するタンパク質を同定し、移植材表面に添加することで骨再生促進が可能な骨移植材の開発が期待できる。

石崎教授より

問：組織学的検索の結果、既存骨由来の新生骨様組織と示すことができる根拠は何か？

答：非脱灰凍結切片の免疫染色の結果、移植片を示す赤色蛍光と細胞内の核位置を示す DAPI 染色の重ね合わせ像から、新生骨様組織部位に赤色蛍光を示さないが DAPI 染色陽性となる細胞が存在していた。これは既存骨由来細胞であると言える。また、OPN との重ね合わせの結果、DAPI、OPN 陽性でかつ赤色蛍光シグナル陰性の細胞が存在した。OPN は骨形成の初期文化マーカーであることから、既存骨由来の新生骨様組織と言える。

近藤教授より以下の補足があった。

補足：自家骨移植片は拡散的な骨形成能を有すると信じられてきており、これまでもゴールドスタンダードとされ、多くの臨床家が自家骨移植を行ってきている。しかしながら、本研究からはそのような事実は確認できなかった。この点から、骨形成能を期待しないのであれば、骨誘導能、骨伝導能を有し、骨再生促進を期待できる人工骨の改発・改良を推進すべきである。

参考論文

1. SCRG1 suppresses LPS-induced CCL22 Molecular Medicine 平成 29 年掲載予定
production through ERK1/2 activation in mouse Reports
macrophage Raw264. 7 cells.
(Manabu Inoue 他 6 名と共著)