

論 文 要 旨

Injectable Growth/Differentiation Factor-5/ Recombinant Human Collagen Composite induces endochondral ossification via Sox9 Expression and angiogenesis in murine calvariae

マウス頭蓋骨における Growth/Differentiation Factor-5/ Recombinant Human Collagen 複合体移植による Sox9 発現を伴う軟骨骨化と血管新生

門松 秀司

【序論および目的】

現在、歯周組織再生療法として GTR 法や Emdogain gel®の塗布が行われている。近年、PDGF、b-FGF、TGF- β 等の細胞増殖因子を用いた新たな研究が報告されており、歯周組織の再生療法の進展が期待されている。

我々は以前 Recombinant human GDF-5(rhGDF-5)/アテロコラーゲンをマウス頭蓋皮下直近骨膜に移植し、硬組織形成について報告した。rhGDF-5 による硬組織形成は内軟骨性骨化に類似した骨化様式が観察され、硬組織における創傷の治癒や組織再生に有効であることを示唆した。

しかし、アテロコラーゲンは動物由来であり、感染をはじめ、安全性という立場から生体に対して感染リスクのない担体がいられるべきである。今回、再生医療における担体として関心の高まっている Recombinant human Collagen I (rhCI)を担体に用い、我々はこの rhGDF-5 による硬組織形成過程における変化を免疫組織化学的染色法を用い詳細に検討した。

【材料および方法】

1. 動物実験として 8 週齢 ddy マウス (n=30) に rhGDF-5/ rhCI および HCl/ rhCI を頭蓋骨骨膜周囲に移植、実験期間を 3,7,14 日とした。
安楽死後、通法に従い組織切片を作製し組織化学評価および免疫組織化学的評価にて軟骨骨化および血管新生を確認した。
2. マウス頭蓋骨から骨膜細胞、骨膜細胞、線維芽細胞を分離培養後、rhGDF-5 刺激による VEGF 産生を ELISA 法にて確認した。

なお、本実験は、鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター動物倫理委員会承認の方法 (受付番号 72) に基づいて行った。

【結果】

1. rhGDF-5/rhCI 移植後 14 日群において、マイクロ CT にて既存骨上に硬組織様の放射線不透過増を確認した。
2. ヘマトキシリン-エオジン染色にて rhGDF-5/ rhCI 移植後 14 日群に肥厚骨膜および既存骨と連続性をもつ骨様硬組織を確認、それらはアルシアンブルー陽性所見を示した。
3. 免疫組織化学的検討において、I 型コラーゲンは既存骨および新生骨ともに陽性を示したが、II 型コラーゲンに関して新生骨のみ陽性所見を示した。
新生骨および肥厚骨膜内に Sox9 陽性細胞の局在を確認し、新生骨内に Von Willebrand Factor 陽性細胞で構成された新生血管も確認した。
4. 培養骨膜、骨膜、線維芽細胞 rhGDF-5 刺激によって産生されたが、線維芽細胞のみ VEGF 有意に発現することが確認された。

【結論及び考察】

我々は rhGDF-5/rhCI 複合体にて、最もシンプルな技法でマウス頭蓋に軟骨内骨化による骨形成を示した。これらの結果は、rhCI が動物由来の担体の代用として役立つことを示唆し、rhCI からの徐放された rhGDF-5 がマウス頭蓋における軟骨内骨化のための Sox9 発現と血管新生を引き起こしたことを示した。

rhGDF-5 は以前に研究において、ヒト歯根膜細胞への rhGDF-5 刺激によりアルカリ・ホスファターゼ(ALP)活性、硫化グルコサミノグリカン(sGAG)の増強を示し、歯周組織の回復および再生に関与することを示唆した。また、我々は以前、ブタ由来アテロコラーゲン/rhGDF-5 複合体にて本研究と同様マウス頭蓋に軟骨内骨化を引き起こしたのを示したが、それらがどの様に起こるのか不明のままであった。

本研究は、多くの VWF-陽性細胞を含んだ血管腔構造が新生骨中で観測され、GDF-5 が新脈管形成の誘導にかかわるかどうか VEGF 生産について調べ、rhGDF-5 は結合組織線維芽細胞にて VEGF を生産し、新脈管形成に関与するかもしれないと示した。

本研究は、rhGDF-5/rhCI 移植後に肥厚骨膜と新生骨中に Sox9 表現を示し、これは皮下に注入された rhGDF-5 が骨膜で間葉細胞を刺激し、Sox9 発現の促進を示した。この結果より rhGDF-5 は未分化間葉細胞凝縮と軟骨芽細胞を増加させ、Sox9(32)を引き起し、軟骨内骨化での重要な役割を果たすことが示唆された。

rhCI はマウス頭蓋における新生骨内の血管新生、骨膜における Sox9 発現を伴う軟骨内骨化を引き起こす rhGDF-5 の徐放を制御する生体機能材料として適当であることを示した。rhGDF-5/rhCI 複合体移植は、軟骨内骨化における骨/軟骨様組織の誘導に効果的であるかもしれない。

(Journal of Periodontal Research; in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 20 号	学位申請者	門松 秀司
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	伴 清治	副査 於保 孝彦
	副査	田沼 順一	副査 町頭 三保

Injectable Growth/Differentiation Factor-5/ Recombinant Human Collagen Composite induces endochondral ossification via Sox9 expression and angiogenesis in murine calvariae

(Growth/Differentiation Factor-5/ Recombinant Human Collagen 複合体はマウス頭蓋に Sox9 発現を介した内軟骨性骨化と血管新生を誘導する)

申請者の所属分野では、Growth/Differentiation Factor-5 (GDF-5)の骨組織形成誘導能に着目し、研究を進めてきており、担体としてブタ真皮由来のアテロコラーゲンを用いてきた。しかし、ヒトへの応用を考えた場合、異種動物由来の物質を用いる事には種々の危険性が懸念される。本研究は、担体として Recombinant human collagen I (rhCI)を用いることの実用性を検討し、さらに GDF-5 による骨組織形成の機序を解明しようとしたものである。

8 週齢の ddy マウス頭蓋骨傍骨膜部位に Recombinant human GDF-5 (rhGDF-5)/rhCI 複合体を注入した。骨組織形成をマイクロCTによる頭蓋骨の撮影、さらにヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色、アルシアンブルー (A.B.) 染色による組織化学的評価、および I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、Sox9、Von Willebrand Factor (VWF) に対する抗体を用いた免疫組織学的な評価を行った。さらに、頭皮由来線維芽細胞、骨膜細胞、骨芽細胞における rhGDF-5 刺激による血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生を測定した。

結果、以下の知見を得た。

- 1) 実験 14 日群の CT 画像で、注入部の既存頭蓋骨上に不透過像を認めた。
- 2) 実験 14 日群の H.E. 染色で既存骨と連続性を示す骨組織の形成が認められ、それらは A.B. 濃染像を呈した。
- 3) 既存骨、新生骨組織はいずれも I 型コラーゲン陽性であったが、II 型コラーゲンは新生骨組織のみに認められた。
- 4) 肥厚骨膜から新生骨組織にかけて Sox9 陽性細胞が認められた。
- 5) 新生骨組織内には多数の血管腔様構造が認められ、それらは VWF 陽性の内皮細胞から構成されていた。
- 6) rhGDF-5 刺激による VEGF 産生は線維芽細胞において有意に増加したが、骨芽細胞および骨膜細胞では変化がなかった。

これらの結果より、rhCI はアテロコラーゲンに代わる rhGDF-5 の担体として有効であることが確認された。また、rhGDF-5 は Sox9 の発現を誘導することにより骨膜内の未分化間葉系細胞の前軟骨細胞への分化を誘導し、II 型コラーゲンの産生を促進することで注入部位に内軟骨性骨化を生じさせることが明らかになった。また、新生骨組織に多くみられる血管新生については、GDF-5 による骨膜周辺の線維芽細胞からの VEGF 産生促進が関与していると考えられた。

本研究により rhGDF-5/rhCI 複合体の骨組織形成誘導能が明らかとなった。rhGDF-5 はヒト歯根膜細胞の増殖も促進することから、今後、同複合体の歯周組織再生療法への応用が期待される。以上より本論文は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 20 号	学位申請者	門松 秀司
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	伴 清治	副査 於保 孝彦
	副査	田沼 順一	副査 町頭 三保

主査および副査の5名は、平成 19 年 7 月 3 日、学位申請者 門松 秀司 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答が行われ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) rhGDF-5 は大腸菌由来であるが、大腸菌の菌体外成分による毒性はないのか。

(回答) 現在、この大腸菌由来 rhGDF-5 の菌体外成分による毒性の報告はされていない。

質問 2) rhGDF-5/rhCI の複合体から rhGDF-5 はどのように作用するのか。

(回答) 本研究において rhGDF-5 の徐放試験は行っていない。rhCI と rhGDF-5 は静電気共有結合をしており、rhCI が生体内でコラゲナーゼ等のコラーゲン分解酵素で溶解されることによって、rhGDF-5 が徐放されるものと考えている。

質問 3) VEGF の定量に ELISA Kit を用いているが、その原理、手技はどのようなものであるのか。

(回答) ELISA 法は、抗体を用いた免疫学的測定法の一つである。今回用いた mouse VEGF Immunoassay System (TECHNE 社)はポリクローナル抗マウス VEGF 抗体が 96 穴プレートにコーティングしてあり、それらに検体である rhGDF-5 添加および非添加の細胞培養上清を加え抗体と反応させた。さらに、洗浄により未反応物を取り除き、HRP 標識された抗マウス VEGF 抗体を反応させた。さらに洗浄後、色素性基質として DAB を用いて発色させ、波長 570nm での吸光度を測定した。段階希釈した標準 VEGF を用いて作成した検量線から、検体に含まれる VEGF 濃度を算出した。

質問 4) Sox9 遺伝子はどのような機序で転写活性されるのか。

(回答) 四肢の間葉系細胞を用いた GDF-5 刺激は Sox9 の発現を増強する (Hatakeyama Y *et al.*, J Cell Biochem, 2004) ことから、GDF-5 のレセプターであるセリン/スレオニンキナーゼ型受容体を介して、Smad 分子が活性化され、Sox9 の転写活性が行われていると考えられる。

質問 5) マウスより大きな動物を使用しなかった理由はなぜか。

(回答) 本研究は、rhCI の担体としての有効性を評価することを目的とし、ブタ真皮由来アテロコラーゲンを用いた以前の報告と比較するために同条件の動物であるマウスを用いた。

質問 6) 以前の報告は 28 日で異所性の骨形成を評価したが、14 日で評価した理由はなぜか。

(回答) ブタ真皮由来アテロコラーゲンを用いた以前の報告で、軟骨様硬組織の形成は 14 日で起こり、28 日では、骨の成熟が進行していた。軟骨様硬組織の形成メカニズムを明らかにするためには 14 日が妥当と考えた。

質問 7) rhGDF-5 により産生された VEGF のサブクラスは何か。

(回答) 本研究に用いた mouse VEGF ELISA Kit は VEGF の 164 および 120 アミノ酸残基を検出する。

最終試験の結果の要旨

質問 8) マイクロ CT を用いて評価を行っているが、それらの撮影に規格性があるのか。

(回答) 頤椎-鼻尖がなす長軸に対し、コーンビームが垂直に当たるよう調整して規格性を持たせた。

質問 9) 臨床でのスペースメーカーの必要性には種々な考え方があがるが、本研究でスペースメーカーは行っているのか。

(回答) 移植材注入時、結合組織-骨膜間にツベルクリンシリンジを用いて空気を注入し、移植材が形成された隙に入り込むよう前処置を行うことでスペースメーカーを作製した。

質問 10) 本研究は骨のみに対して評価を行っているが 今後の展望についてどのように考えているのか。

(回答) 本研究は、rhGDF-5/rhCI 複合体移植による骨形成メカニズムを明らかにするため、骨に着目したが、以前、GDF-5 は腱・靭帯・関節等の形成および、ヒト歯根膜細胞の増殖を促進する因子と報告されていることから、歯周組織再生における歯根膜再生への応用を今後の検討課題としている。

質問 11) 成長因子などはロットの違いで、その活性に大きな差が見られることがあるが、本研究に使用した rhGDF-5 のロットは1つだけか。

(回答) 本研究は、BIOPHARM 社から供与された rhGDF-5 の中で1ロットから分注したものを使用した。

質問 12) 新生骨と既存骨の組成の違い、見分け方はどのように考えているのか

(回答) 通常、頭蓋骨は膜性骨化により形成され II 型コラーゲン陽性を示さないが、軟骨様である新生骨は II 型コラーゲン陽性を示すことより、免疫組織化学的に識別できるものと考えられる。

質問 13) rhGDF-5/rhCI 複合体移植による新生骨の形成に再現性はあるのか。

(回答) 本研究において、rhGDF-5/rhCI 処理した実験 14 日群すべて軟骨様硬組織を形成し、コブ状および既存骨に連続した形状の骨形成を示し、骨形成の再現性はあるものと考えられる。

質問 14) 細胞分離培養はどのような原理、手技を用いて行ったのか。

(回答) Suda ら (Endocrine Rev, 1999) の手法より、生後 2-3 日マウスの頭皮を採取、頭皮から分離培養した細胞を線維芽細胞とした。また、同マウスより採取した頭頂骨を細胞分離溶液(0.2%コラーゲナーゼ+0.1%ディスパーゼ)に入れ、37°C 10 分震盪、細胞画分 1 を骨膜細胞とし、以後、37°C 10 分震盪を繰り返す、細胞画分 2-5 を回収、遠心することにより骨芽細胞を分離した。

質問 15) Sox9 陽性細胞とあるが どのような細胞であると考えているのか。

(回答) Sox9 は間葉系細胞から前軟骨細胞への分化において発現が増大することが知られている。また、頭蓋骨骨膜内に間葉系細胞が含まれていることが知られている。本研究において肥厚骨膜内および新生骨内に多く認められた Sox9 陽性細胞は、rhGDF-5 の刺激により、骨膜内の間葉系細胞が既存骨に向かって、あるいは骨膜内で前軟骨細胞へ分化したものと考えられる。

質問 16) rhGDF-5 の投与量はどのようにして決めたのか。

(回答) ブタ真皮由来アテロコラーゲンを用いた共同研究者らの以前の報告(Yoshimoto T *et al.*, J Periodont Res, 2006) に準じて、本研究では rhGDF-5 の投与量を 20 μ g とした。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。