

論 文 要 旨

Effectable application of vascular endothelial growth factor to critical sized rat calvaria defects

〔ラット頭蓋骨欠損モデルに対する血管内皮増殖因子の効果的な投与〕

與那嶺 豊

【序論および目的】

骨は、骨折している間、モデリングや修復するためのユニークな能力を有する血管に富んだ組織である。しかし、外傷や病変組織の切除によって生じた骨欠損領域が大きい場合、骨移植が必要となる。このようなケースでは、患者自身の骨を採取して移植する自家骨移植が治療法の一つとなる。しかし、自家骨採取は、骨供給側の侵襲と供給量に制限があるなどの欠点がある。これらの問題を解決する別の方法として他家骨や人工骨移植があるが、それぞれ免疫反応が起こる可能性や骨誘導能を有さない等の欠点がある。

近年、組織再生を目的として細胞増殖因子を用いた治療方法が注目されている。なかでも血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF)は血管内皮細胞の有糸分裂促進因子であり、血管新生に重要な役割を持っている。また、血管透過性を亢進させ、骨芽細胞の走化性亢進や分化を促進させることも報告されている。生体内で VEGF の機能を十分に発揮させるためには、一定期間増殖因子を持続的に放出させるような担体を開発し、欠損部での保持性を考慮する必要がある。加水分解性を持つポリ乳酸—ポリグリコール酸共重合体(poly (L, D-lactic-co-glycolic acid) : PLGA)は、組織工学の分野で広く使用されており、タンパク質をマイクロカプセル化し徐放することが可能とされている。

本研究では、VEGF を担持させた PLGA マイクロカプセルを開発し、ラット頭蓋骨欠損での骨再生における PLGA マイクロカプセルと PLGA 膜の併用効果を評価した。

【材料および方法】

Double emulsion solvent evaporation techniqueを用いてリコンビナントヒトVEGF₁₆₅を担持させたマイクロカプセル(VEGFカプセル)と担持させてないマイクロカプセル(PLGAカプセル)を作製し、表面形状を Scanning electron microscopy (SEM)にて観察した。また、VEGFカプセルからのVEGF徐放性をELISA kitを用いて計測した。

Wister系雄性ラット (13 週齢、N=20)に全身麻酔を施し、頭蓋骨に自然治癒不可能な大きさの骨欠損(直径 8mm)を作成した。ラットを以下の4群：①未処置群(N=5)、②VEGFカプセルのみを埋植する群(N=5)、③脳硬膜上にPLGA膜を設置し、膜上にPLGAカプセルを埋植後、さらにPLGA膜でマイクロカプセル及び欠損周囲の頭蓋骨まで被覆する群(N=5)、④③の手法に準じてVEGFカプセルを埋植する群(N=5)、に無作為に分けそれぞれの処置を骨欠損部に施した後、頭皮を復位縫合した。観察期間は3ヶ月とした。すべての骨欠損部に対して、ソフトX線写真撮影を行い、WinRoof[®]解析ソフトを用いてコンピュータによる画像解析を行った。また通法に従い脱灰標本作製後、Hematoxylin-Eosinにて染色し組織学的観察を行った。統計は、Scheffe testを用い、有意差を $P < 0.05$ とした。

【結果】

・ VEGF カプセルの形態学的観察

SEM 像では多孔性かつ滑らかで均質的な表面形状が観察された。

・ VEGF カプセルからの VEGF 徐放性測定

VEGF カプセルからの VEGF の放出を 7 日目以降から計測したところ、直線的に増加した。

・ 放射線学的観察

VEGF カプセルと PLGA 膜を併用した群では、他群と比較して、既存骨周囲から欠損部内にかけて新生骨と考えられる明らかな骨様不透過像が認められた。

・ 組織学的観察

全ての処置群において炎症性細胞の浸潤は認められず、VEGF カプセルと PLGA 膜を併用した群では、他の群と比較して、厚く成熟した骨組織が認められた。

・ 放射線学的画像解析

PLGA カプセルと PLGA 膜を併用した群は未処置群と比較して、また VEGF カプセルと PLGA 膜を併用した群は未処置群と VEGF カプセル単独で処置した群と比較して、骨欠損内の不透過面積の有意な増加が認められた。

【結論及び考察】

本研究では、ラット頭蓋骨に自然治癒が不可能な直径 8mm の骨欠損を作製し、その欠損に対して VEGF を担持させた PLGA マイクロカプセル移植と PLGA 膜を併用することで骨の再生を促進することを示した。

マイクロカプセルからの VEGF 徐放性測定結果では測定開始から 7 日目以降に VEGF の徐放が確認された。初期の徐放が無かった理由としては、今回使用したマイクロカプセルが多孔性であるが滑らかで均質な表面形態であり、周りに存在する水分との接触面積が低いことが考えられる。

担体を持たない VEGF を局所に投与した場合、VEGF は急速に拡散する。また生体内での VEGF の半減期は短いことが報告されている。生体内で VEGF の作用を十分に発揮させるためには局所に一定の時間ある濃度で保持させる必要がある。従って VEGF を PLGA にてマイクロカプセル化することは VEGF の短時間での拡散、変性、分解を防ぎ、かつ長期間にわたる VEGF の放出を可能にし、VEGF の作用として血管新生の促進や前骨芽細胞、間葉系前駆細胞等の遊走の亢進が生じると考えられる。しかし本実験では VEGF カプセル単独での効果はそれほど再生を促していなかった。この理由としては、放出された VEGF やマイクロカプセルそのものが周囲の軟組織へ拡散した可能性が考えられる。

放射線学的画像解析において PLGA カプセルと PLGA 膜を併用した群は未処置群と比較して、また VEGF カプセルと PLGA 膜を併用した群は未処置群と VEGF カプセル単独で処置した群と比較して、骨欠損内の不透過面積の有意な増加が認められたが、PLGA 膜と PLGA カプセルを併用した群と PLGA 膜と VEGF カプセルを併用した群で有意な差はなかった。しかし組織学的観察では PLGA 膜と VEGF カプセルを併用した群においては骨欠損内の一部に厚く成熟した骨組織が認められた。このような骨再生が生じた理由としては、PLGA 膜が脳硬膜と頭皮下結合組織との間に空間を保持し（スペースメイキング）、結合組織の欠損内への侵入を防ぐ遮断膜として機能し、かつ骨欠損周囲組織からの骨芽細胞を誘導したこと、及び PLGA 膜がマイクロカプセルの吸収、拡散を防ぎ VEGF が長期間にわたって骨欠損内に存在した可能性があることが考えられる。

本研究により、VEGF を担持させた PLGA マイクロカプセルと PLGA 膜を併用することは、VEGF カプセル単独よりも骨再生に効果的かつ有用である可能性が示唆された。

(Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 86 号	学位申請者	與那嶺 豊
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士(医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	杉原 一正	副査 田中 卓男
	副査	田沼 順一	副査 町頭 三保

Effectable application of vascular endothelial growth factor to critical sized rat calvaria defects

(ラット頭蓋骨欠損モデルに対する血管内皮増殖因子の効果的な投与)

血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)は血管内皮細胞の増殖促進、血管新生の促進、血管透過性の亢進の作用に加えて、骨芽細胞や間葉系幹細胞の走化性亢進の作用が報告されている。組織再生を促す増殖因子として VEGF を用いる為には、一定期間 VEGF を持続的に放出させるような担体を開発し、欠損部での保持性を考慮する必要がある。加水分解性を持つポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(poly(L, D-lactic-co-glycolic acid): PLGA)は、タンパク質をマイクロカプセル化し徐放することが可能とされているが、局所に移植されたマイクロカプセルは分散する可能性がある。Guided Bone Regeneration 法は骨の造成を必要とする部位に遮断膜を設置し、軟組織の侵入を防ぐことで骨の新生を図る方法であるが、骨の再生に長期間要するという欠点がある。そこで学位申請者は VEGF165 を含有させた PLGA マイクロカプセルを開発し、ラット頭蓋骨欠損での骨再生における VEGF 含有 PLGA マイクロカプセルと PLGA 膜の併用効果を評価した。PLGA を用いて VEGF 含有マイクロカプセルを作製し、マイクロカプセルの SEM による形態学的観察、マイクロカプセルからの VEGF 徐放性測定を行った。さらに、ラット頭蓋骨にクリティカルサイズの骨欠損を作製し、1)未処置群、2)VEGF 含有カプセル(VEGF カプセル)群、3)VEGF 非含有カプセル群(PLGA カプセル)/PLGA 膜群、4)VEGF カプセル/PLGA 膜群の 4 群(各群 N=5)に分けて移植実験を行い、放射線学的観察・評価、組織学的観察(HE 染色)を行った。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) SEM を用いた VEGF カプセルの形態学的観察では多孔性、小穴性かつ滑らかな表面形状を呈していた。
- 2) VEGF カプセルからの VEGF 徐放性測定では VEGF の放出は 7 日目以降から検出可能となり、21 日目まで継続的に VEGF 徐放量が増加した。
- 3) 放射線学的観察では VEGF カプセル/PLGA 膜群では、他群と比較して、既存骨周囲から欠損部内にかけての一部の領域に新生骨と考えられる明らかな骨様不透過像が認められた。
- 4) 放射線学的評価では PLGA カプセル/PLGA 膜群は未処置群と比較して、また VEGF カプセル/PLGA 膜群は未処置群と VEGF カプセル群と比較して、骨欠損内の不透過面積の有意な増加が認められた。
- 5) 組織学的観察では全ての処置群において炎症性細胞の浸潤は認められず、VEGF カプセル/PLGA 膜群では、他の群と比較して、厚く成熟した骨組織が認められた。

未処置群と VEGF カプセル群で放射線学的評価において有意差がなかった理由としては、放出された VEGF やマイクロカプセルそのものが周囲の軟組織へ漏出した可能性が考えられた。放射線学的評価においては PLGA カプセル/PLGA 膜群と VEGF カプセル/PLGA 膜群では有意差がなかったが、組織学的観察で VEGF カプセル/PLGA 膜群で骨欠損内の一部に厚く成熟した骨組織が認められた理由としては、マイクロカプセルと PLGA 膜が脳硬膜と頭皮下結合組織との間に空間を保持し(スペースメイキング)、PLGA 膜が結合組織の欠損内への侵入を防ぐ遮断膜として機能し、かつ VEGF が保持され骨再生を促進したことが示唆された。

本研究はラット頭蓋骨欠損での骨再生における VEGF 含有 PLGA マイクロカプセルと PLGA 膜の併用効果を評価したものであり、その結果 VEGF を含有させた PLGA マイクロカプセル移植と PLGA 膜の併用により骨の再生が促進されることが示された点で興味深い。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 86 号	学位申請者	與那嶺 豊
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	杉原 一正	副査 田中 卓男
	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21年12月21日、学位申請者 與那嶺 豊 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なされ、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) マイクロカプセル作製の際、VEGF 及び PLGA は何に溶かしてあるのか？

(回答) VEGF は PBS に、PLGA はジクロロメタンに溶解させた。

質問2) VEGF 溶液と PLGA 溶液を混ぜたとき2層に分離しているのか？

(回答) 500 μ l の PLGA 溶液に 20 μ l の VEGF 溶液を加えるのではっきりと2層に分離はしていない。

質問3) マイクロカプセルの内部構造はどうなっているのか？

(回答) 今回の実験で断面の確認は行わなかったが、他の論文では今回のマイクロカプセルと同様の分子量で作製した PLGA マイクロカプセルの内部が示されており、PLGA の固まりの中に空洞が散在している SEM 像が示されている。

質問4) マイクロカプセルの表面に VEGF は存在しているのか？

(回答) カプセルの作製段階では存在していると考えられるが、カプセルを凍結乾燥させる前に蒸留水で十分に洗浄するので最終的には表面から取り除かれていると思われる。

質問5) 1回のマイクロカプセル作製で何グラム回収できるか、また VEGF はどのくらい入っているのか？

(回答) 1回の作製で 1 μ g の VEGF と 500mg の PLGA を使用し 300mg 前後のマイクロカプセルを回収した。回収されたマイクロカプセルには 50ng の VEGF が含有されていた。

質問6) この研究のオリジナリティーは何か？

(回答) VEGF を含有させた PLGA マイクロカプセルと PLGA 膜を併用して骨の再生を評価した点である。

質問7) マイクロカプセルの強度はどのくらいなのか？

(回答) 正確に強度を計測したわけではないが、圧力に対し多少変形し、弾性を示す。

質問8) マイクロカプセルの表面にある穴はどんな意義があるのか？

(回答) 内部まで交通している穴からは水分が内部まで浸透し PLGA が加水分解され VEGF が徐放されると考えられるが、今回作製したマイクロカプセルは初期の徐放がなかったことから表面だけに留まっている穴が多いことが考えられる。

質問9) VEGF を含有していない PLGA マイクロカプセルの形態学的観察は行ったか？

(回答) 行わなかった。

質問10) 何故、乳酸とグリコール酸の比率が 75 対 25 の PLGA を使用してマイクロカプセルを作製したのか？

(回答) 乳酸とグリコール酸の比率が 100 対 0 や 0 対 100 の場合は分解速度が非常に遅く半減期が数ヶ月と報告されており、50 対 50 の場合は逆に半減期が短いので、その中間の性質を持つ 75 対 25 の PLGA を使用した。

最終試験の結果の要旨

質問 1 1) 生体内で VEGF の徐放性を計測したか？

(回答) 計測していない。生体内での VEGF 濃度の変化を確認する必要はあるので、今後の検討課題である。

質問 1 2) PLGA 膜を使用し VEGF を含有させたマイクロカプセルを移植した群と含有させてないマイクロカプセルを移植した群を比較した場合、放射線学的評価では有意差が無かったが、組織学的観察では組織像に大きな違いがあったが、この違いをどのように解釈するのか？

(回答) 放射線学的評価はあくまでも不透過面積を比較したものであり不透過率は考慮されていない。つまり、再生した骨組織の構造や厚さは評価されていない。放射線学的評価において不透過率を加味した評価を行ったら両群間には有意差が生じると思われる。

質問 1 3) 骨の再生を目的とするなら BMP を使用してもよかったのではないか？

(回答) 骨の再生だけを目的とするなら BMP のほうが VEGF よりも効果があると思われるが、将来的には歯周組織再生に使用したいと考えており、BMP は歯周組織再生に用いた場合骨性癒着が生じるという報告があるので今回は使用しなかった。

質問 1 4) 組織学的観察において VEGF が誘導したと思われる骨芽細胞や間葉系幹細胞等は観察されなかったのか？

(回答) 観察されなかった。観察期間が 3 ヶ月であり骨の再生は終了していると考えられる。

質問 1 5) 治癒過程の早期における組織学的観察も必要だったのではないか？

(回答) 今回の実験は VEGF を含有したマイクロカプセルと PLGA 膜の併用した場合の骨再生における効果を確認することを目的としていたので、早期における組織学的観察は行わなかった。今後、早期(例えば移植 2 週間後)における組織像の観察も必要と考えている。

質問 1 6) VEGF を含有したマイクロカプセルと PLGA 膜の併用を臨床応用した場合、現在行われている組織再生療法と比較して利点は何か？

(回答) 骨再生に要する期間を短縮出来る可能性がある。

質問 1 7) 頭蓋骨と硬膜の間に PLGA 膜を設置する意味があるのか？

(回答) 溶出してきた VEGF やマイクロカプセルを骨欠損内に保持する役割がある。

質問 1 8) 組織学的観察においてマイクロカプセルの残留は認めたか？

(回答) PLGA 膜の残留は認めたが、マイクロカプセルの残留は認めなかった。

質問 1 9) VEGF を含有したマイクロカプセルのみを移植した場合、VEGF の濃度が高すぎて治癒を遅延させた可能性はないか？

(回答) 骨再生を目的として VEGF を用いている他の論文では μg 単位で投与され骨再生を促進したと報告されている。今回の実験で骨欠損内に移植したマイクロカプセルは 30mg 前後であり、含有された全ての VEGF が放出されたとしてもその総量は 5ng なので、濃度が高すぎて治癒を遅延させたということは考えにくい。

質問 2 0) VEGF を含有した PLGA 膜は作製可能か？

(回答) PLGA は疎水性であるので水溶性の溶媒に溶かした VEGF のようなタンパク質を単純に含有させ徐放させることは困難と思われる。

質問 2 1) VEGF を染色し組織学的に観察することは可能か、また同じような実験系で VEGF を染色した報告はあるのか？

(回答) VEGF の免疫組織化学的染色は可能である。しかし同様な実験系で VEGF を染色した報告はない。

質問 2 2) 放射線学的観察において全ての実験群で骨様不透過像が偏っているのは何故か？

(回答) 頭頂部皮膚の切開線が U 字型で後頭部にその基部を設定したので、弁の基部は血流が豊富だが、弁の先端は基部と比較して血流に乏しいため骨の再生に偏りが生じたと思われる。

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。