

氏名	松田 寛之		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5919号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Effects of the Geometrical Structure of a Honeycomb TCP on Relationship between Bone / Cartilage Formation and Angiogenesis  (骨・軟骨形成と血管新生との関係性におけるハニカムTCPの幾何学的形状の影響)		
論文審査委員	岡村 裕彦 教授	浅海 淳一 教授	岡田 正弘 准教授

### 学位論文内容の要旨

#### 論文内容の要旨 (2000字程度)

##### 【緒言】

硬組織再生過程における細胞の分化や増殖には、幹細胞・増殖因子・細胞外基質(細胞外微小環境)の3要素が重要である。近年の再生医療研究では、組織再生に有利な細胞外微小環境を再現する人工生体材料の開発が進められ、人工生体材料の素材や様々な形状を付与することで効率的な組織再生が試みられている。

我々も、硬組織細胞分化誘導時における細胞外微小環境の重要性に着目し、直線的貫通孔をハニカム状に配列したハニカムリン酸三カルシウム(Honeycomb Tricalcium phosphate : hTCP)を開発し、硬組織形成に取り組んできた。我々は既に、hTCPの貫通孔孔径とBMP-2含有量を変化させることで、骨・軟骨組織の特異的誘導に成功している。この研究では、孔径75 $\mu$ mのhTCPにBMP-2を125ngを含浸させた試料をラット大腿部筋中に移植した場合、hTCP孔内に軟骨組織形成、孔径300、500 $\mu$ mのhTCPにBMP-2を1000ngを含浸させた試料を移植した場合にはhTCP孔内に骨組織形成を認めた。しかし、骨・軟骨組織が特異的に形成されるメカニズムについては未だ不明である。

一方近年、硬組織形成に酸素、栄養、サイトカインや幹細胞を供給するための血管新生が重要な役割を担っているとの報告がある。

そこで本研究では、hTCPの形状による骨・軟骨組織の特異的形成メカニズムについて、hTCP内の血管新生との関連に着目して、経時的に検討を行った。

##### 【材料と方法】

特異的に軟骨組織を誘導する孔径75 $\mu$ mのhTCPにBMP-2を125ngを含浸させた試料(以下75TCP)と、特異的に骨組織を誘導する孔径300、500 $\mu$ mのhTCPにBMP-2を1000ngを含浸させた試料(以下300TCP、500TCP)を、4週齢Wistar系ラットの大腿部筋中に移植した。移植後1, 2, 3週後に摘出し、組織学的検討を行った。また、血管新生はCD34に対する免疫組織化学染色を行い検討した。

hTCP内における硬組織形成面積解析は、HE染色標本の100倍視野で無作為に5視野撮影したものをImage J1.47vを用いて解析した。各視野において、hTCP孔内に形成された骨・軟骨面積とhTCP孔内腔面積を計測、hTCP孔内面積における硬組織形成面積の割合を算出し、5視野の平均値を求めた。またhTCP孔内に形成された血管新生面積解析は、抗CD34免疫組織化学染色標本を用いて、硬組織形成面積解析と同様の

方法で行った。さらに、TCP 孔内へ侵入する血管数、血管の太さを計測した。

#### 【結果】

75TCP の 1 週目においては hTCP 孔入口付近に細胞侵入と細い血管侵入を認めた。2 週目では、hTCP 孔の中心部まで線維性結合組織や細い血管侵入を認めたが、硬組織は認めなかった。3 週目には、hTCP 孔内で軟骨形成を認めた。hTCP 内における血管新生は、1、2 週目までは侵入血管数・血管面積・血管の太さとも経時的に増加したが、3 週目では減少した。

300TCP では、1 週目において hTCP 孔入口から 1/3 付近まで線維性結合組織の侵入を認め、入口付近では微細な血管侵入が観察された。また一部で、軟骨組織形成を認めた。2 週目では hTCP の中央部まで線維性結合組織や血管侵入が観察され、骨組織形成が認められた。3 週目では hTCP 内壁に添加するように骨組織形成が認められ、骨組織に囲まれた内腔には多数の血管形成が認められた。血管の豊富な部位では、血球系細胞が集簇した骨髄様組織が観察された。

500TCP では、1 週目において hTCP 孔入口から 1/3 程度まで線維性結合組織の侵入を認めた。hTCP 孔内には軟骨組織形成を認め、一部では骨組織の形成を認めた。また 300TCP と比して太い血管の侵入を認めた。2 週目では線維性結合組織や太い血管の侵入が hTCP 中央部まで観察され、hTCP 内壁に添加する様に、また血管周囲に骨形成を認めた。3 週目では 300TCP に比して旺盛な骨組織形成を示したが、骨髄様組織の形成はみられなかった。

300TCP、500TCP では経時的に侵入血管面積・形成骨組織面積とに増大傾向を示し、300TCP と比較して 500TCP の方が、侵入血管数・血管面積・血管の太さが大きい傾向がみられた。75TCP は、侵入血管数・血管面積・血管の太さとも、300TCP より低い傾向がみられた。

#### 【考察】

最も旺盛な骨形成は多数の太い血管侵入を認める 500TCP 孔内で、骨髄形成は 500TCP と比較して細い血管侵入を認める 300TCP において、軟骨形成は少量の非常に細い血管侵入しか認めない 75TCP で認められた。血管侵入が豊富なほど、hTCP 孔内の酸素分圧は高いと推測され、酸素分圧の低い順から軟骨形成(75TCP)、骨髄形成(300TCP)、骨形成(500TCP)を認めた。これは生体内で各組織が存在する環境の酸素分圧を反映していると考えられ、hTCP の形状を変化させることにより、侵入血管を制御することで軟骨・骨組織形成に有利な環境を選択的に再現した可能性が示された。また 75TCP の 3 週目において血管形成の減少傾向がみられたのは、軟骨細胞が産生する chondromodulin が関わっていると推測される。Chondromodulin には血管新生抑制作用があり、それにより TCP 内の軟骨組織が維持された可能性が考えられた。さらに、BMP-2 は細胞凝集や血管新生に関与しているとの報告もあるため、BMP-2 が低濃度であれば、骨形成や血管新生が起こりにくいと考えられ、軟骨形成には有利な条件となったのではないかと考えられる。

#### 【結語】

ハニカム TCP の形状による骨・軟骨組織の特異的形成メカニズムは、その形状変化により血管侵入を制御することで、hTCP 孔内の酸素分圧が骨・軟骨形成に有利な環境を作り出すためであると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

近年、硬組織再生においてハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウム (tricalcium phosphate, TCP) 等からなる人工生体材料が開発されており、既に広く臨床応用されている。申請者はこれまでに硬組織形成過程における足場としての生体材料の幾何学的形状の重要性に着目し、様々な直径の貫通孔をハニカム状に配列した TCP (以下ハニカム TCP) を開発した。その結果、ハニカム TCP の孔径を変化させることで、特異的に軟骨・骨形成させることに成功している。しかし、特異的軟骨・骨形成を起こさせるメカニズムについて詳細は不明である。一方、近年の研究において生体内で血管内皮細胞と骨芽細胞、その前駆細胞との間には分子的なクロストークがあるなど、骨形成と血管新生との間には強い関連性があるとの報告されている。そこで本研究では、ハニカム TCP の形状変化による特異的軟骨・骨形成メカニズムを TCP 孔内に形成される血管新生に着目し、検討した。

研究は、ハニカム TCP をラット大腿部筋中に埋入した異所性硬組織形成モデルを用いて、ハニカム TCP 孔径変化による血管形成、硬組織形成との相関を経時的に解析した。孔径 75、300、および 500  $\mu\text{m}$  のハニカム TCP に rhBMP-2 を含浸させ、ラット大腿部筋中に埋入した。埋入後 1 週、2 週および 3 週のハニカム TCP を摘出し、異所性硬組織形成について組織学的に評価した。また、血管形成を評価するために CD34 免疫染色を行った。その結果、軟骨形成が旺盛な孔径 75  $\mu\text{m}$  のハニカム TCP では、初期では少量の細い血管形成を認めたが、3 週目には血管形成の減少を認めた。孔径 300  $\mu\text{m}$  では、経時的に TCP 孔内に細い分岐した血管のネットワークがみられ、3 週目には骨髓様組織が形成された。孔径 500  $\mu\text{m}$  では、太い直線的な血管が形成され、最も旺盛な骨形成がみられた。これらの結果は、ハニカム TCP の孔径によって TCP 孔内における血管形成様式が異なることが、軟骨・骨組織構成に影響することを示唆しており、TCP 孔内の血管形成によりもたらされる酸素分圧変化が TCP 孔内に形成される硬組織に影響を与えることが考察された。

本研究は、ハニカム TCP の幾何学的性状変化による、特異的骨・骨髓および軟骨組織形成は、TCP 孔内への血管侵入様式の違いに深い関わりがあることを見出したという点で新規性がある。さらには、より効率的な硬組織再生方法の確立や、臨床応用への寄与が期待できると考えられる。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。