

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	実験計画の立案、実験、評価の指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 口腔病理学	身分 大学院生	氏名 松田 寛之
<p>論文題名 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)</p>		
<p>論文内容の要旨 (2000字程度)</p> <p>【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75μm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、500μm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。</p> <p>【材料と方法】 特異的に軟骨組織を誘導する孔径75μm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、500μm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。</p>		

【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髓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、骨髓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。