

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

ICHINNOROV CHIMEDTSEREN

論文題目

Collagen type I-based recombinant peptide promotes bone regeneration in rat critical-size calvarial defects by enhancing osteoclast activity at late stages of healing

I. 緒言

歯槽突起裂（以下顎裂）は妊娠6週から10週にかけての内側鼻突起と外側鼻突起の癒合不全に起因する先天異常である。口唇口蓋裂一貫治療において、顎裂は骨移植を行うことによって修復される。これまで移植骨の材料としては主に自家骨が用いられてきた。

顎裂形成術の目的は、口腔と鼻腔の閉鎖、上顎歯列の安定化、永久歯の萌出誘導、鼻翼基部の陥凹感の改善等である。手術では主に腸骨や脛骨等から採取した海綿骨細片（PCBM）が用いられてきたが、採取手術の侵襲や、瘢痕形成、皮膚の知覚障害などのドナー部位の合併症の回避のため、人工材料の開発が望まれてきた。これまでにハイドロキシアパタイトや β -TCP等の材料が開発されてきたが、新たにI型コラーゲンベースの組換えタンパク質 recombinant protein (RCP)が開発された。コラーゲンは生体内に最も多く存在するタンパク質のひとつであり、I型コラーゲンは骨の細胞外マトリックスの主要タンパク質であるため、骨伝導能、骨誘導能、生分解性、細胞接着、増殖、分化を促進する能力など、再生医療における多くの利点を有している。先行研究として、これまでに、RCPの特性と顎裂部への移植材としての適性を確認するため、基礎研究および動物を用いた応用研究を行ってきた。ラットの臨界サイズの下顎骨欠損に対して顆粒状のRCPを用い、脂質を含まない脱分化細胞を添加することで骨再生効果が高まることを報告した。またラット口蓋裂モデルにおいてRCPの骨形成に適した

密度を検討し、中架橋 (medium cross-linked)RCP (mRCP) が最大の骨形成能を有していることを報告した。しかし、これらの研究は観察期間が4週に限られていた。

本研究では、ラットの頭蓋冠欠損モデルを用い、12週にわたって骨形成能、骨誘導能、および生分解性を解析することにより、顎裂形成術の移植材料としての mRCP の適性を評価することを目的とした。さらに、炭酸アパタイト (carbonate apatite、以下 CA) を主成分とする骨補填材料である Cytrans Granules® (GC, 東京) とその性能を比較した。

II. 材料および方法

1. 動物実験モデル

9週齢雄のSD系ラットを無作為に mRCP 移植群 (n=15)、CA 移植群 (n=15)、対照群 (n=9) に分けた。手術は、全身麻酔下に、皮膚及び骨膜切開を行い、骨膜を剥離し頭蓋冠を露出させた。移植床にそれぞれ mRCP、CA を充填し、縫合閉鎖した。対照群はそのまま縫合閉鎖した。

2. 放射線学的評価および解析

評価はマイクロCT Cosmo Scan GX (Rigaku Corporation、東京) を用い、移植直後と移植後4、8、12週目に行った。頭蓋冠欠損部に新生された骨の体積と、新生された骨と隣接する母床骨の骨密度 (Bone mineral density BMD) を、骨量測定ソフトウェア 3 x 4 ビューア 2019 (Kitasenjyu Radist Dental Clinic i-View Image Center, 東京) で測定した。測定の対象領域

(region of interest; ROI)のサイズは半径 2.5mm×3.14×深さ 0.8mm とした。

3. 組織学的評価

ラットは移植後 4、8、12 週で炭酸ガスを用い安楽死させ、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。評価においては欠損部位全体の新生骨量と総新生骨量 (CA 顆粒を含む新生骨量)、中央部と左右 2 つの辺縁部、骨膜側と硬膜側の新生骨量を測定し、さらに欠損部に残存する移植材料の量を測定した。

新たに形成された骨中の破骨細胞は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色 (和光、東京)、骨芽細胞はアルカリホスファターゼ (ALP) 染色 (和光、東京) を用いて検出した。核が 3 個以上ある TRAP 陽性細胞を破骨細胞として数え、画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて欠損部全体のうちの ALP 陽性部位の面積を算出した。

4. 統計分析

統計解析は GraphPad Prism 9 ソフトウェア (GraphPad Inc, LA Jolla, CA, USA) を用いて、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差があると判断した。

III. 結果

1. 放射線学的解析

術後 4、8、12 週の時点で、mRCP 群の ROI 内の新生骨量は CA および対照

群の新生骨量よりも有意に多かった。CA 群では、手術後 4 週と 12 週の間で新生骨量に有意な増加が見られた。手術後 4、8、12 週の時点で、CA 群の ROI 内の全骨量は対照群の ROI 内の骨量よりも有意に大きかった。対照群では骨量の増加は緩やかであり、手術後 12 週で初めて、手術後 4 週および 8 週と比較して骨量の有意な増加が検出された。CA 群では術後 4 週の時点で CA 顆粒を含む ROI 内の全骨量は対照群および mRCP 群よりも多かったが、実験期間を通じて有意な増加はなく、術後 12 週では CA 群と mRCP 群の全骨量は同等であった。

BMD については、mRCP 群では手術後 12 週、CA 群では全ての時点で、宿主骨と同等のレベルに達した。

2. 組織学および組織形態学的解析

HE 染色を施した組織切片像より、mRCP 群では移植後 4 週で明らかな新生骨の形成が認められ、mRCP 群の新生骨量 (切片上の面積) は、どの時点においても CA 群および対照群より有意に多かった。CA 群の新生骨量は術後 4 週目で対照群の新生骨量より有意に多く、その後も経時的に有意な増加が認められた。一方、欠損部 (ROI) 内の全骨量の比較では、術後 4 または 8 週では CA 群の全骨量は mRCP 群より有意に多かったが、術後 12 週では mRCP 群と同程度であった。部位では、中央部と辺縁部の比較では辺縁部、また骨膜側と硬膜側の比較では硬膜側で、新生骨の面積が大きかった。新生骨の面積は、評価期間中のすべての時期で mRCP 群と CA 群において対照群よ

りも大きかった。

骨の再生や代謝には破骨細胞と骨芽細胞が協調して働く必要があるため、各群の欠損部位における破骨細胞と骨芽細胞の有無と組織切片上での各細胞が占める面積を TRAP 染色と ALP 染色によりそれぞれ調べた。その結果、新生骨における破骨細胞と骨芽細胞の存在が確認され、mRCP 群では CA 群および対照群と比較して有意に多くの骨芽細胞が検出された。破骨細胞の数は、mRCP 群では移植後 8 週でピークに達し、これは mRCP の吸収のタイミングのピークと一致していた。ALP 陽性で示される骨芽細胞が占める領域については、mRCP 群では術後 4 週および 8 週で CA 群および対照群よりも有意に大きかった。CA 群と対照群の ALP 陽性領域は、観察された期間内には有意な変化はなく、両群間の統計的な差異も検出されなかった。

IV. 考察

顎裂形成術では、骨または骨に代わる人工移植材料の移植後、十分な骨密度が達成され、かつ移植片の吸収が完了していない移植後 12 週頃に矯正歯科治療を開始する。本研究では移植 8 週後に残存 mRCP の大幅な減少と新生骨の増加が観察された。これは、評価期間の後期段階の 8 週後に至るまで、骨リモデリングを促すのに十分な材料が残っていたことを示唆し、この点でも mRCP が移植材料として適していることが示唆された。

移植後 4 週目に TRAP 陽性細胞が検出されたことから明らかなように、mRCP 粒子は移植部位で破骨細胞の活性化を誘導した。今回の研究では、移

植後8週目に、4週目および12週目に比べて多くの破骨細胞が観察された。破骨細胞および骨芽細胞の数はCA群において有意に少なかった。これらの結果は、mRCP群に比べてCA群では新しく形成された骨の量が少ないことに反映されている。骨形成細胞を誘導する能力の相違は、CAが強固で緻密な構造であること、mRCPに比べて生分解性が低いためその後の骨形成のスペースが制限されることなど、上述の特性に起因すると考えられる。実際、CAの吸収は破骨細胞によってのみ行われ、その吸収はCAの特定の組成によっても変化する。例えば、ハニカムブロック構造を持つCAはハイドロキシアパタイトやβ-リン酸三カルシウムよりも吸収速度が速く、成熟骨形成速度も速かった。しかし一般にCAは自家骨よりも骨誘導能は低く、自家骨と組み合わせることにより、破骨細胞および骨芽細胞の数が増加し、骨量が増加することが報告されている。今回の実験条件下では、mRCPはCAよりも骨誘導能が高いことが示された。したがって、本研究の結果は、mRCPが十分な骨形成を誘導する独自の特性を持つ汎用性の高い骨移植材であることを示している。

顎裂骨移植は、歯肉と口蓋粘膜骨膜のフラップと、骨移植後のそれらの閉鎖を伴い、骨膜と脱落した骨からなる壁が移植材と接触する空間を形成する。骨膜の構造内には、骨修復過程に寄与する骨芽細胞や骨形成細胞が存在する。このような骨形成細胞の供給源は、顎裂の骨修復を成功させる

ために重要であると考えられる。我々は、mRCPの移植が、CAの移植や移植を受けない対照群よりも素早く骨欠損部に骨形成反応を誘導することを示し、ヒトの顎裂修復に適した材料である可能性を示唆した。ヒトの顎裂形成術では、移植術から12週間後には骨構造と顎裂骨の高さが安定することが、その後の治療のために推奨される。上述のように、mRCPは、骨欠損を修復し、臨床現場でインプラント治療や歯の移動が必要とされる時期に十分な骨構造を提供できる可能性がある。本研究によりmRCPが十分な骨誘導能を有することが明らかとなり、さらに移植材料としての使用に際し病原体による汚染のリスクもないことから、mRCPはヒトの顎裂形成術において有用と考えられる。

V. 結論

本研究は、骨移植材としてのmRCPの有用性を12週間にわたり検証し、CAと比較して、mRCPがより効率的に新生骨形成を誘導できることを実証した。さらに、CA顆粒を測定に含めた場合でも、mRCPは治療期間終了時に同レベルの骨形成を示した。このことは、mRCPが適当な時間に骨形成細胞の分化を誘導するのに適しており、口唇口蓋児の顎裂部の新たな治療法となりうることを示唆している。mRCPによって誘発される骨形成シグナル伝達を正確に確認するには、さらなる検証が必要と考えられる。