

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 中村 有宏
論文題目 血管内皮細胞増殖因子(VEGF)がマウスの 変形性顎関節症の進行に与える影響について	

I. 緒言

変形性関節症(OA)は進行性の関節疾患である。OAの有病率は膝関節で23.9%、股関節で10.9%、手指関節で43.3%と報告されている。顎関節(TMJ)は咬合により機械的負荷がかかりやすく、TMJのOAである変形性顎関節症(TMJ OA)は開口障害などの機能障害、開口時痛や咀嚼時痛などの疼痛、顎関節雑音を伴う顎関節症の一つである。TMJ OAの有病率は86人を対象に行われた調査では30.2%で、加齢と共に有病率が増加し、男性より女性の方が多いと報告されている。放射線学的変化としてsubchondral cyst(軟骨下嚢胞)、erosion(骨びらん)、generalized sclerosis(下顎頭骨硬化)、osteophyte(骨棘)、atrophy(萎縮)が観察される。病理所見として進行性の軟骨分解、軟骨下骨のリモデリング、滑膜組織の炎症を示す。

TMJ OAの病因としては、炎症、過度な機械的応力、異化酵素、エストロゲン、遺伝的要因、肥満などが報告されている。

動物実験では、臼歯部喪失や下顎偏位などによる下顎頭の位置変化によって、下顎頭の機械的負荷が増大し、軟骨細胞に血管内皮細胞増殖因子(VEGF)が増加すると報告されている。マウスの膝関節にVEGFを投与することで、変形性膝関節症が誘発されたとの報告がある。また、人間でも顎関節症の顎関節でもVEGFが発現されると報告されている。

VEGFは血管内皮細胞などの様々な細胞で産生される。VEGFは血管内皮細胞の増殖を誘導、血管透過性の亢進、細胞の遊走を促進し、血管新生、細胞増殖、アポトーシス制御、創傷治癒に関与する。VEGFは生理的には軟骨内骨化に必要で、骨格成長や生体の恒常性に関与する。また、腫瘍や関節リウマチなどの炎症性疾患での血管新生を誘導にも関与する。

軟骨細胞でのVEGFの発現は、軟骨内骨化が盛んな成長期に生理的に増加し、成熟期になると成熟軟骨は無血管になるため、VEGFの発現は抑制される。加齢と共に、炎症や機械的負荷の増加によって、再度VEGFは病的な増加すると報告されている。

TMJ OAでは下顎頭軟骨に機械的負荷がかかることで、低酸素誘導転写因子-1(HIF-1)が誘導される。その後、軟骨細胞からVEGFが誘導され、軟骨細胞のVEGF受容体に結合し、軟骨細胞からコラーゲンやプロテオグリカンを破壊するMatrix metalloproteinase(MMP)が増加し、MMPを阻害するTissue Inhibitor of Metalloproteinase(TIMP)が減少することによって、軟骨破壊が生じる。

マウスの関節円板を除去することによって、TMJ OAが発症すると報告されている。これは関節円板切除によって、下顎頭の機械的応力が増大し、TMJ OAが発生する。

本研究では外科的処置でTMJ OAを発症させたマウスに対し、顎関節にVEGFを局所投与して、下顎頭の形態や下顎頭軟骨の変化およびModified Mankin Scoreを用いてTMJ OAの進行の程度を観察し、VEGFがマウスのTMJ OAの進行に与える影響に関して検討することとした。

II. 材料および方法

本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認(承認番号AGUD397号)を受け、実験動物の取り扱いと同委員会の指針に沿って行った。

1. 実験動物、材料

動物実験は雄性マウス(C57BL/6J、日本エスエルシー株式会社、浜松)54匹を使用した。飼

育条件は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、13 時間照明 (7:00~20:00) に設定した。飼料は普通飼料 (CE-2、日本クレア社、東京) を与え、飲水用水道水を自由摂取させて飼育した。生後 12 週齢マウスを使用して、関節円板切除後に顎関節へ VEGF を局所投与した群 (VEGF+disc 切除群)、関節円板切除のみを行った関節円板切除群 (disc 切除群)、偽手術群 (sham 群) の 3 群に分けた。

2. 実験方法

1) 顎関節手術

各群 18 匹に対し、生後 12 週齢時に左側顎関節の顎関節手術を行った。全身麻酔薬として塩酸メデトミジン (ドミツール[®]、日本全薬工業株式会社、福島)、ミダゾラム (ミダゾラム注 10mg 「サンド」[®]、サンド株式会社、山形)、酒石酸ブトルファノール (ベトルファール[®]、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京) を用いた三種混合麻酔薬を腹腔内注射 (0.05/10g) した。左側耳前部を剃毛し、局所麻酔および止血目的に $1/80000$ エピネフリン含有 2% リドカイン塩酸塩 (キシロカイン[®]、アスペンジャパン株式会社、東京) を術部に適量を皮下注射した。

disc 切除群は実体顕微鏡下に、左側耳前部に 10mm 程度の縦方向の皮膚切開を加え、血管を傷つけないように筋層を剥離し、顎関節腔に到達し、顎関節腔を開放させた。関節円板をピンセットで把持し、マイクロ剪刀で周囲組織より切離させ、関節円板を除去した。この時、下顎頭に器具が接触しないように配慮した。創部は 6-0 ナイロン糸で縫合した。

VEGF+disc 切除群は上記の関節円板除去後に加えて生体吸収性ゼラチンハイドロゲル (メドジェル[®]粒子 II、新田ゼラチン株式会社、大阪) に VEGF (VEGF₁₆₅、PeproTech、Rocky Hill, NJ) 20 μg を溶解させ、顎関節腔に注入した。薬剤が流出しないように注意しながら、創部を 6-0 ナイロン糸にて縫合した。

sham 群は顎関節腔を開放して、関節円板を確認し、関節円板を除去せずに閉創した。

2) 組織学的処理、染色

各群 (n=6) のマウスは顎関節手術の術後 4 週、8 週、16 週で炭酸ガスを吸入させ安楽死させた。断頭後に頭部を 10% 中性緩衝ホルマリン液中で 24 時間 (室温) 固定した。固定後に頭部を正中で分割し、左側顎関節を傷つけないように、余剰組織を除去し、10% EDTA 液にて 4 週間 (4 $^\circ\text{C}$) 脱灰を行った。通法通り組織をパラフィン包埋し、ミクロトーム (リトラトーム REM-700、大和光機工業株式会社、埼玉) で 5 μm の厚さに薄切し、下顎頭と周囲組織を含めた前頭断のパラフィン組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびサフラニン O-ファストグリーン染色を行った。組織切片は下顎頭、下顎枝、下顎窩を、偽手術群は関節円板を含む全てが観察できた組織切片を選択し、顕微鏡 (BX43、オリンパス株式会社、東京) で観察し、デジタルカメラ (DP22、オリンパス株式会社、東京) で撮影した。

3) 組織形態計測学的観察

組織切片は、イメージングソフトウェア (cellSens、オリンパス株式会社、東京) を使用し、撮影した画像上で形態計測を行った。横径は下顎頭の内外側極の最大幅径とし、計測距離が最大のもので 1 枚選択した。縦径は選択した組織切片の下顎頭の頂点から横径までの垂直的距離とした。軟骨層の欠損が大きく、下顎頭の頂点が不明確な場合は、横径の midpoint からの垂直距離を縦径とした。下顎頭の軟骨層の厚さは縦径測定に使用した線上の軟骨層の距離とした。

4) 変形性顎関節症の評価

組織形態計測学的観察で使用した組織切片を、Yodoh らの Modified Mankin Score を用いて評価を行った。Modified Mankin Score ではサフラニン 0-ファストグリーンの染色性 (Safranin 0-fast green staining) を 0～6 点、軟骨細胞の減少 (Chondrocyte loss) を 0～4 点、構造 (Structure) を 0～8 点で点数化し、合計 0 点 (正常)～18 点 (重度の OA) で、OA の重症度を評価した。

5) 統計学的分析

本研究の結果 (形態計測値、Modified Mankin Score) は正規分布を示さないため、すべての結果は中央値で算出し、VEGF 群と disc 群、sham 群の 3 群間の比較を行った。統計解析には Excel 統計ソフト (BellCurve for Excel version 2.15、株式会社社会情報サービス、東京) を用いて、Kruskal-Wallis 検定を行い、 $P < 0.05$ で有意差ありとした。

III. 結果

1. 組織形態計測学的観察

1) 下顎頭の横径

下顎頭の横径の中央値は、術後 4 週、術後 8 週、術後 16 週の順に VEGF+disc 切除群は 1256.5、1324.0、1292.0 μm であった。disc 切除群は 1137.5、1279.0、1223.5 μm であった。sham 群は 854.5、855.6、876.2 μm であった。

VEGF+disc 切除群と disc 切除群では術後 4 週、術後 8 週、術後 16 週に有意差がみられなかった。VEGF+disc 切除群は sham 群と比較して術後 4 週、術後 8 週、術後 16 週に有意に横径が増加していた。

2) 下顎頭の縦径

下顎頭の縦径の中央値は、術後 4 週、術後 8 週、術後 16 週の順に VEGF+disc 切除群は 528.0、561.0、426.8 μm であった。disc 切除群は 552.0、494.8、434.1 μm であった。sham 群は 468.1、428.6、420.2 μm であった。

VEGF+disc 切除群と disc 切除群では術後 4 週、術後 8 週、術後 16 週に有意差がみられなかった。VEGF+disc 切除群は sham 群と比較して術後 8 週に有意に縦径が増加し、術後 4 週、術後 16 週では有意差がみられなかった。

3) 下顎頭軟骨層の厚さ

下顎頭軟骨層の厚さの中央値は、術後 4 週、術後 8 週、術後 16 週の順に VEGF+disc 切除群は 224.7、185.2、95.2 μm であった。disc 切除群は 228.8、144.5、197.6 μm であった。sham 群は 193.8、218.7、206.5 μm であった。

VEGF+disc 切除群は disc 切除群と比較して術後 16 週に有意に軟骨層の厚さが減少し、術後 4 週、術後 8 週では有意差はみられなかった。VEGF+disc 切除群は sham 群と比較して術後 16 週に有意に軟骨層の厚さが減少し、術後 4 週、術後 8 週では有意差はみられなかった。

2. 変形性顎関節症の評価

1) 術後 4 週

VEGF+disc 切除群と disc 切除群でサフラニン 0-ファストグリーンの染色性の低下や、軟骨の

中間層に至る裂隙がみられた。

VEGF+disc 切除群は disc 切除群と比較して Modified Mankin Score による評価では、サフラニン 0-ファストグリーンの染色性 (Safranin 0-fast green staining) の項目において点数が有意に高くなった。その他の軟骨細胞の減少 (Chondrocyte loss)、構造 (Structure)、合計値では有意差はみられなかった。VEGF+disc 切除群と sham 群ではサフラニン 0-ファストグリーンの染色性、軟骨細胞の減少、構造、合計点の全ての項目で VEGF+disc 切除群が有意に高得点となった。

2) 術後 8 週

VEGF+disc 切除群と disc 切除群でサフラニン 0-ファストグリーンの染色性の低下や、軟骨の深層に至る裂隙や欠損がみられた。

VEGF+disc 切除群は disc 切除群と比較して Modified Mankin Score による評価では、サフラニン 0-ファストグリーンの染色性 (Safranin 0-fast green staining) の項目において VEGF+disc 切除群は点数が有意に高くなった。その他の軟骨細胞の減少 (Chondrocyte loss)、構造 (Structure)、合計値では有意差はみられなかった。VEGF+disc 切除群と sham 群ではサフラニン 0-ファストグリーンの染色性、軟骨細胞の減少、構造、合計点の全ての項目で VEGF+disc 切除群が有意に高得点となった。

3) 術後 16 週

VEGF+disc 切除群と disc 切除群でサフラニン 0-ファストグリーンの染色性の低下や、軟骨の深層に至る裂隙がみられた。VEGF+disc 切除群では著名な軟骨細胞の減少がみられた。

VEGF+disc 切除群は disc 切除群と比較して Modified Mankin Score による評価では、軟骨細胞の減少 (Chondrocyte loss) の項目において VEGF+disc 切除群は点数が有意に高くなった。その他の、サフラニン 0-ファストグリーンの染色性 (Safranin 0-fast green staining) 構造 (Structure)、合計値では有意差はみられなかった。VEGF+disc 切除群と sham 群ではサフラニン 0-ファストグリーンの染色性、軟骨細胞の減少、構造、合計点の全ての項目で VEGF+disc 切除群が有意に高得点となった。

IV. 考 察

1. VEGF がマウスの変形性顎関節症に与える影響

本研究では外科的に関節円板切除し TMJ OA を発症させたマウスの TMJ に VEGF を局所投与し、VEGF が TMJ OA の進行に及ぼす影響について、関節円板切除し TMJ OA を発生させたマウスの下顎頭と、偽手術を行ったマウスの下顎頭とを比較検討を行った。

VEGF+disc 切除群と sham 群とを比較すると、VEGF+disc 切除群では術後 4、8、16 週で横径が有意に増加していた。また、術後 16 週で有意に下顎頭の軟骨の厚さが減少しており、TMJ OA の進行度を点数化した Modified Mankin Score では術後 4、8、16 週で全ての項目で TMJ OA が有意に進行していた。VEGF+disc 切除群と disc 切除群とを比較すると、VEGF+disc 切除群では術後 16 週で下顎頭の軟骨の厚さが減少していた。また、VEGF+disc 切除群では Modified Mankin Score では術後 4、8 週にプロテオグリカンの染色性を有意に低下させ、術後 16 週に軟骨細胞数が有意に減少していた。

マウスの大腿骨骨折モデルに外因性 VEGF を投与することによって、骨修復が促進されると報

告されており、VEGF は血管新生と骨代謝を促進し、骨修復を促進する。本研究でも外因性 VEGF を顎関節に投与しているため、関節円板が切除され機械的負荷が増大した下顎頭に VEGF が作用し、骨代謝が促進され、下顎頭の横径が増大したと考えられた。

また、VEGF は軟骨の破壊に関与すると報告されている。マウスの膝関節に VEGF を投与した研究ではプロテオグリカンが減少し、変形性膝関節症が発症すると報告されている。本研究でも VEGF が下顎頭軟骨のプロテオグリカンを破壊し、軟骨細胞数を減少させることによって、軟骨破壊を進行させたため、VEGF+disc 切除群は disc 切除群より TMJ OA が進行していたと考えられた。

本研究の結果から VEGF が TMJ OA の進行に影響する可能性が示唆された。

2. 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルについて

本研究では VEGF が液体のため、関節円板切除時に単独では漏出し、投与が困難だったため、生体吸収性ゼラチンハイドロゲル (メドジェル®粒子 II) に VEGF を含浸させて投与した。メドジェル®粒子 II は 4 週間で生体に吸収され、その間に含浸した薬剤を徐放する。メドジェル®粒子 II は分解産物が炎症などを惹起せず、架橋剤にホルムアルデヒドなどの有害物質を使用していない。これまでに、メドジェル®粒子 II は結合組織成長因子によるラット膝関節の関節軟骨欠損の再生の研究で使用されており、臨床でも類似の生体吸収性ゼラチンハイドロゲルが膝関節の骨再生のための成長因子の局所投与に応用されている。本研究の結果からも、生体吸収性ゼラチンハイドロゲルは今後の動物実験や臨床において薬剤の確実な投与に有用なことが示唆された。

3. 実験動物について

これまでに、本研究で使用した雄性マウス C57BL/6 J は関節円板を切除することによって TMJ OA が発症することが知られている。Xu らの報告によると、関節円板の部分的な切除でも TMJ OA が発症するとされているが、本研究では小熊らの報告と同様に、切除範囲を統一するために、関節円板は全て切除した。

本研究で関節円板切除し変形性顎関節症を発症させたマウスは、偽手術群に比べて組織形態計測学的観察では横径と縦径が増加しており、術後 8、16 週で軟骨層の厚さが減少していた。Modified Mankin Score でも高得点であり、TMJ OA は進行している結果となった。本研究でも前述の報告と同様に C57BL/6 J の関節円板切除によって TMJ OA が発症していた。

4. 関節円板切除術について

本研究ではこれまでに報告されているマウスの関節円板を切除することで TMJ OA を発症させた。しかし、関節円板切除は外科的な TMJ OA 発症モデルであるため、機械的負荷の増加ではなく、炎症反応により TMJ OA の進行に影響している可能性がある。今後は非侵襲的な TMJ OA 発症モデルも必要だと考えられた。しかしながら、本研究では、外科的手術から術後 4、8、16 週に標本製作を行ったため、反応性炎症の影響は少なかったと考えられた。

VI. まとめ

本研究では関節円板を切除することで TMJ OA を発症させたマウスの TMJ に VEGF を局所投与し

(学位論文の内容を要約したもの)

No. 6

愛知学院大学

て、VEGF が TMJ OA の進行に与える影響について検討を行った。VEGF が軟骨破壊に関与し、TMJ OA が進行させることが示された。今後、TMJ における抗 VEGF 抗体の開発のため、TMJ OA と VEGF との関連について検討が必要と考えられた。