

はしがき

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費(基盤研究(C)(2))によって得られたような骨創治癒における血管および末梢神経再生の役割に関する分子機構研究を行ったのでその成果を報告する。

の解明

研究代表者：松田光悦(旭川医科大学医学部) (課題番号 10671763)

研究分担者：竹川政範(旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成 11 年度 1,600 千円

合 計 3,100 千円

研究発表

(1) 学会誌など

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

平成 13 年 3 月

研究代表者 松田光悦

(旭川医科大学・医学部 講師)

はしがき

平成10年度～平成11年度科学研究費（基盤研究(C)(2)）によって標題のような研究を行ったのでその成果を報告する。

研究組織

研究代表者：松田光悦(旭川医科大学医学部講師)

研究分担者：竹川政範(旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成10年度	1,500千円
平成11年度	1,600千円
合 計	3,100千円

研究発表

- (1) 学会誌など
なし
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし

序

歯科口腔外科領域の疾患においては、歯のみならず、顎骨の損傷や欠損を伴うことが多い。この損傷部や欠損部の治癒、すなわち骨創の治癒に関しては骨折の治癒をはじめとして、多くの研究がなされている。そしてその治癒系かにおける骨系細胞の相互作用や骨の再生過程などについては良く知られている。

研究代表者はこれまで、各種顎骨再建材料を動物(ラット)の頭頂骨に移植し、移植後の骨創治癒を形態学および組織化学的に検討してきた。その結果、移植部の血管鑄型を用いた詳細な観察と骨膜再生時の各種神経ペプチドの発現、分布から創傷治癒における血管や神経再生の重要性を確認してきた。さらに研究分担者らとともに行った、放射線照射骨に対する骨移植実験においても、照射骨では骨創の治癒遅延が著明に認められ、骨の創傷治癒には骨系細胞だけでなく周囲組織や血管および血管系細胞への照射の影響が、その後の治癒に関して重要な因子であることを確認した。

これまでの研究結果から、骨損傷時に同時に損傷された血管系や神経の再生が、骨創治癒における骨系細胞に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。本研究は骨損傷部の血管、神経の再生が、骨創治癒に及ぼす影響を分子レベルで解析し、骨代謝における血管、神経の役割を組織化学および分子生物学的に解明することを目的として行われた。このために本研究では、ラット頭頂骨に骨欠損部を作製し、経時的に組織を採取して、形態学的には血管鑄型法による走査型電子顕微鏡観察を、そして組織化学的には免疫組織化学的手法を用いて観察した。また分子生物学的には骨創治癒組織より、経時的に組織を採取し、メッセンジャーRNA (mRNA) を抽出、逆転写PCR法にてcDNA合成を行った後、目的とするmRNAの検索を行った。

実験動物と実験方法

1. 実験動物

生後7週齢 SD系ラット，雄

2. 実験方法

(1) 骨創の作製

本研究では，骨創作製部位を頭頂骨とした。この理由は口腔外科領域で扱う骨は主として膜性骨骨化を行うこと，また実験動物の場合，ヒトのような顎間固定が困難であり創傷作製後の骨片固定が困難と思われたからである。

・ 単純骨創群

ペントバルビタール腹腔内麻酔下で頭頂骨を骨膜下で露出し，径約3mmの円形の骨欠損を，歯科用バーを用いて作製した。創部は切削片を生理食塩水で洗浄後、骨膜で創を被覆するようにして皮膚縫合した。

・ 骨移植群

移植材料として新鮮自家骨，焼成骨，人工ヒドロキシアパタイトを用いた。

(新鮮自家骨)

ラットの頭頂骨から約2x4mmの骨片を採取し，これを移植骨とした。

(焼成骨)

移植に使用しないラットの頭頂骨より骨を採取し，以下のように

処理し作製した。

- a) 採取骨に付着した組織を NaOH と H₂O₂ の混合液(1 : 1)に浸漬して除去した(室温, 3 時間)。
- b) マッフル炉 (Automatic Precision Muffle Furnace, Tomas Scientific 社, 東京) を使用し, 600°C で 4 時間一次焼成し, 1100°C で 3 時間の二次焼成を行った。焼成終了後, 自然冷却した。

(人工ヒドロキシアパタイト)

多孔質, 緻密型の人工ヒドロキシアパタイト (アパセラム, 旭光学社, 東京) を使用した。

・骨移植方法

ペントバルビタール腹腔内麻酔下で頭頂骨を骨膜下に露出し, 2x4mm の骨欠損部を作製した。この部位に上述した方法で作製した各移植材料を移植し, 剥離した骨膜を縫合し, さらに皮膚縫合して移植骨を固定した。

(2) 実験期間

実験期間は, 各群とも創傷作製後 5 日, 7 日, 10 日, 14 日, 21 日とした。放射線照射群は, 照射後 2 週および 4 週目に新鮮自家骨移植を行った。

(3) 観察方法

(形態および免疫組織化学的観察)

形態および組織化学的観察には, それぞれのラットを各実験期間ごとにペントバルビタールによる腹腔内麻酔下で開胸後, 経心臓的に生

理食塩水で灌流を行って脱血後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、引き続きレジンで灌流して血管鑄型を作成した。その後創傷部を中心に周囲組織を付着させたまま試料を切除、摘出した。

- ・ 走査型電子顕微鏡観察

試料 0.05M PBS(pH7.4)で洗浄後、周囲軟組織を剥離した。さらに5%次亜塩素酸ナトリウム溶液中で、約20分間、脱有機処理を行った。洗浄後、1%オスミウム酸で90分後固定し上昇エタノール系列で脱水した。酢酸イソアミル浸漬後、液体二酸化炭素で臨界点乾燥を行い走査型電子顕微鏡で観察した。

- ・ 免疫組織化学的観察

4%4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、骨創作製部を採取し10%EDTA液で脱灰、脱水後パラフィン包埋し5 μ mの切片を作製した。脱パラフィン後、ABC法に従って、抗VEGFおよび抗TGF- β 1を用いて反応させた。

- ・ 分子生物学的観察

各実験期間ごとに、ペントバルビタールによる腹腔内深麻酔下で骨創作製部から試料を採取し、それぞれの組織からAGPC法によって総RNAを抽出、PCR法を用いて、CGRP, TGF- β , NPY, CTGF, NGF, Osteocalcine, Osteopontineの遺伝子発現について検討した。

研究成果

1) 形態学的観察

単純骨創群，新鮮自家骨群ともに血管鋳型を用いた観察で，治癒早期には，既存の血管から血管芽球を形成し，それらが棒状に成長していた．次いで不規則に蛇行しながら成長し，分枝、融合した後次第に血管径が均一に成り，新生骨の成長とともに血管数が減少して成熟した血管へと変化していた．この結果は，生理的状态における新生血管形成過程、すなわち既存の血管のうち主として細静脈から新しい分枝が血管内皮細胞の分裂，発芽，分枝によって派生する過程に類似していた．移植群のうち焼成骨移植では血管形成過程とその時期の両者において，単純骨創群や新鮮自家骨移植群と同様であった．しかし人工ヒドロキシアパタイト移植群では初期の血管形成過程やその形態は、単純骨創群や新鮮自家骨移植群と類似していたが時間の経過とともにその成長は止まり、骨創作製 21 日でさえ血管芽球を先端に持った未熟な血管で占められていた．

これらのことから、骨創治癒過程では、新生骨形成は常に血管周囲に認められ，特に組織の修復の盛んな部位で血管芽豊富に新生され，これに伴って新生骨も豊富に形成されることが分かった．またこの治癒過程にたとえ移植材料として開発された生体材料といえども，人工的に造られた材料では新生した血管の成長を阻害するものがあることが示唆され、血管の成熟に必要な因子の出現が少ないかあるいは何らかの阻害因子が出現するのかもしれない．

2) 免疫組織化学的観察

血管新生にかかわる代表的な促進因子は血管内皮増殖因子(VEGF)である．これは血管内皮細胞を特異的に増殖させるサイトカインであり，血管周囲の細胞が分泌している．一方増殖を抑制する方向に働くものとして Transforming growth factor(TGF β)が挙げられる．本研究で，抗 VEGF 抗体を用いた免疫組

組織学的観察で、単純骨創群、新鮮自家骨移植群そして焼成骨群で骨創作製後 5 日目で VEGF 陽性細胞が骨創の断端周囲に最も多く観察され、21 日目には減少していた。TGF β 陽性細胞は 5 日目から観察され、14 日目において最も豊富に見られた。一方、人工物を骨創に埋入したヒドロキシアパタイト移植群では VEGF 陽性細胞は骨創作製後 14 日目で、ヒドロキシアパタイト周囲に豊富に見られるようになり、気孔周囲のものは 21 日目でも減少しなかった。TGF β 陽性細胞は骨創作製後 7 日目で豊富に存在し、その後徐々に減少していた。ヒドロキシアパタイト気孔内およびその周囲に VEGF 蛋白が長く作用することや TGF β 蛋白が減少していることは、血管内皮細胞の増殖、遊走が継続し、血管が未熟なままであることを示している。また TGF β は血管内皮細胞増殖の抑制に働くだけでなく、骨芽細胞の活性促進や線維芽細胞の増殖促進など、ほかの役割も報告されており骨創治癒における TGF β 陽性細胞の消長は興味深いものである。

3) 分子生物学的検討

血管系の指標として、VEGF と TGF β の mRNA 遺伝子発現を検索した。その結果 TGF mRNA の遺伝子発現は実験期間を通じて観察されたが、VEGF は発現が弱く明確な差を判断することができなかった。

神経系の指標として、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)と神経発生時に発現する神経成長因子(NGF)のそれぞれの mRNA 発現について検討した。CGRP mRNA と NGF mRNA の発現は両者とも、実験期間を通じて見られ、経時的にわずかであるがその発現は増加していた。

骨代謝の指標としてオステオカルシン、オステオポンチンそして内軟骨性骨形成に関係する結合組織成長因子(CTGF)について検討した。オステオカルシンは実験期間を通じて発現が弱かったが、オステオポンチンは骨創作製 10 日目の試

料から強い発現が見られ、また CTGF mRNA の発現は骨創作製後 14 日目に強く見られた。

骨形成と血管新生の研究はこれまで多くなされていた。一般的に生理的な骨形成過程では、血管の成長に伴いまずその周囲に存在する未分化間葉系細胞が骨芽細胞に分化する。そして血管周囲で新生骨（線維骨）が形成され、それらが厚みを増すとともに I 型コラーゲン線維が規則的に配列し血管を中心に同心円状に結合して骨の血管空隙を創る。本研究から、新生骨は常に血管周囲につくられ、特に骨形成も含めて損傷組織の修復が盛んなところで血管が豊富に新生されていた。

VEGF は血管内皮細胞に対する特異的因子とされていたが、近年軟骨芽細胞、骨芽細胞などにも認められており、TGF の骨や線維芽細胞に対する役割も含めて骨創の治癒に多いに関係していることが示唆された。この他にも種々な因子が骨創治癒に関連しているものと思われ遺伝子発現も含めて更なる研究が必要である。

以 上