



Localization of Vascular Endothelial Growth Factor during the Early Stages of Osteochondral Regeneration using a Bioabsorbable Synthetic Polymer Scaffold

坂田, 亮介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5389

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005389>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Localization of Vascular Endothelial Growth Factor during the Early Stages of Osteochondral Regeneration using a Bioabsorbable Synthetic Polymer Scaffold

生体吸収性ポリマースキャフォールドを用いた骨軟骨再生初期における
Vascular Endothelial Growth Factor の局在の検討

坂田 亮介、国分 毅、名倉 一成、豊川 成和、
乾 淳幸、藤岡 宏幸、黒坂 昌弘

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科
(指導教員：黒坂 昌弘教授)

坂田 亮介

要旨

はじめに

軟骨は自己修復能が低いいため軟骨損傷に対する治療には難渋することが多く、これまでに骨髄刺激法、骨軟骨柱移植、培養細胞移植などが試みられているが、未だ統一された治療方法はない。

我々は、これまでに生体吸収性高分子である poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLG) scaffold を作製し、動物モデルにおいて骨軟骨再生に有用であることを報告してきた。しかし、骨軟骨再生の早期における再生過程や成長因子の関与についての詳細な検討はなされていない。そこで、軟骨修復早期における血管新生を重視し、血管新生のもっとも中心的な働きを担う因子の一つである Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) に着目した。VEGF は四肢の発生において幹細胞や軟骨細胞の生存に必須であり、成長軟骨板においては骨化を促進させ、さらに変形性関節症においては軟骨を傷害するという報告もあり、軟骨に対する相反する作用が報告されている。本研究では生体吸収性 PLG scaffold を用いて、骨軟骨修復の初期段階における VEGF の局在と軟骨修復過程の関連性について検討した。

対象と方法

生体吸収性 PLG scaffold の作製

scaffold は electrospinning 法にて作成した。正に帯電させた PLG 溶液(乳酸:グリコール酸=50:50)を、負に帯電させた電極に向けて高電圧下に噴出させ、一定の径(径 3-14 μm)の繊維を作成した。この繊維を負の電極棒を回転させて巻き取り、ほぼ均一な空隙(空隙率 $85 \pm 0.8\%$)を持ち、断面が同心円となる円柱を作成した。80 度、10 分間の熱処理後、この円柱を直径 5mm、深さ 5mm にくり抜いて PLG scaffold を作成した。

手術手技

日本白色家兔(48 匹)の大腿骨顆部に直径 5mm、深さ 5mm の骨軟骨欠損を作成し、欠損部に PLG scaffold を挿入した scaffold 群と欠損のまま放置した control 群とに分けた。術後 3 日、1 週、2 週、4 週で肉眼所見、組織所見(ヘマトキシリンエオジン染色、トルイジンブルー染色、免疫組織染色)について検討し、術後 2 週、4 週における欠損部表層(表層 1mm)の VEGF と VEGF receptor2 (VEGFR2) の遺伝子発現について real-time RT PCR を施行した。

統計学検定

VEGF と VEGFR2 の遺伝子発現について scaffold 群と control 群との比較に

Mann-Whitney 検定を用いた。p<0.05 を統計学的に有意とした。

結果

肉眼所見

感染兆候やアレルギー反応は見られなかった。両群において術後 3 日においては血腫が見られ、時間経過とともに表面に白色の再生組織の出現を認めた。scaffold 群では、control 群と比較して、全経過を通して表面平滑で陥凹が少なく、術後 4 週で表面は光沢のある白色で周囲組織との境界も不明瞭となった。

組織所見

ヘマトキシリンエオジン染色では、術後 3 日で、両群において血腫の貯留が認められた。scaffold 群においては術後 3 日より、control 群においては術後 2 週より表層の線維性被膜形成が見られた。scaffold 群においては術後 3 週よりヘマトキシリンに染色される再生組織の形成が部分的に認められ、術後 4 週で表層全域に拡大した。深層においては、経過とともに周囲の骨梁と連続した骨新生を両群で認めた。

トルイジンブルー染色では、術後 2 週では両群とも再生軟骨は認められなかった。術後 4 週では、scaffold 群においてプロテオグリカンを含む再生軟骨を表層全域に認め、再生軟骨の深層には肥大軟骨と思われる染色性の弱い領域も認められた。control 群では、トルイジンブルーに染色される再生軟骨領域は表層の限られた領域にのみ認められた。

免疫組織染色所見

術後 2 週では control 群において、I 型コラーゲンは周囲の骨組織と連続して局在していた。両群において、II 型コラーゲンは認められなかった。VEGF は欠損部全域に見られた。

術後 4 週では、両群において I 型コラーゲンは深層から軟骨下層に見られ、さらに scaffold 群では再生軟骨深層にも局在していた。II 型コラーゲンは control 群では表層辺縁で認めた一方、scaffold 群の表層では再生軟骨全域で認められ、内軟骨骨化領域では減少していた。VEGF は、scaffold 群では II 型コラーゲンしていた再生軟骨領域では減少していたが、内軟骨骨化領域には局在が見られた。

遺伝子発現

術後 2 週では、表層の VEGF、VEGFR2 発現に両群間の有意差は認めなかったが、術後 4 週においては VEGF、VEGFR2 ともに control 群で有意に高い発現を認めた。

考察

われわれはこれまでに PLG scaffold が力学的支持となりうることを、そして遊走

する骨髄由来幹細胞を保持することで骨軟骨再生を促進することを報告してきた。本実験で、軟骨再生については、術後 3 日より見られた最表層の線維性被膜が経過とともに重層化し、その直下の層にトルイジンブルーに染色され、II 型コラーゲンの局在を認める軟骨組織の再生を認めた。

VEGF は血管新生において最も知られた成長因子であり、成長軟骨における内軟骨骨化、発育段階における軟骨細胞の維持、変形性関節症における軟骨破壊など、軟骨に対し様々な影響を与えることが報告されてきた。しかし、骨軟骨再生における VEGF の発現部位や発現量、そのタイミングについては詳細に検討された報告はない。本研究においては、術後 2 週の免疫染色所見では両群で欠損部全域に VEGF の局在を認め、表層においては VEGF、VEGFR2 の発現に有意差は認められなかった。術後 4 週の免疫染色所見では、VEGF は再生軟骨では発現しておらず、その深層の骨化領域で発現していた。表層の VEGF、VEGFR2 の発現は、軟骨再生が進むにつれて、scaffold 群において有意に低下していた。これらの結果から、本モデルでの軟骨再生と VEGF の発現については負の相関がある可能性が示唆され、VEGF の発現のコントロールが骨軟骨再生治療に寄与する可能性があると考えられた。

まとめ

生体吸収性 PLG scaffold を用いた骨軟骨再生過程における、I、II 型コラーゲン、VEGF、VEGFR2 の発現部位や発現時期について検討を行った。骨軟骨再生の部位や時期により、VEGF の発現が変化し、再生過程に影響を与えていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2219号	氏 名	坂田 亮介
論文題目 Title of Dissertation	Localization of Vascular Endothelial Growth Factor during the Early Stages of Osteochondral Regeneration using a Bioabsorbable Synthetic Polymer Scaffold 生体吸収性ポリマースキャフォールドを用いた骨軟骨再生早期における Vascular Endothelial Growth Factor の局在の検討		
審査委員 Examiner	主 査 平田 健一 Chief Examiner 副 査 古 森 孝 英 Vice-examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

軟骨は自己修復能が低いいため軟骨損傷に対する治療には難渋することが多く、未だ統一された治療方法はない。研究者らは、生体吸収性高分子である poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLG)scaffold を作製し、動物モデルにおける骨軟骨再生に有用であることを報告してきた。しかし、骨軟骨再生早期における再生過程や成長因子の関与について詳細な検討はなされていない。そこで、軟骨修復早期における血管新生を重視し、血管新生の中心的な働きを担う因子の一つである Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) に着目した。VEGF は四肢発生における幹細胞や軟骨細胞の生存に、成長軟骨板では骨化に、さらに変形性関節症における軟骨の傷害に、という相反する作用が報告されている。本研究では PLG scaffold を用いて、骨軟骨修復早期における VEGF の局在と修復過程の関連について検討した。

対象と方法

生体吸収性 PLG scaffold の作製

Scaffold は electrospinning 法にて作成した。正に帯電させた PLG 溶液(乳酸:グリコール酸=50:50)を、負に帯電させた電極に噴出させ、それを負の電極棒を回転させて巻き取り、PLG scaffold を作成した。

手術手技

日本白色家兎(48 匹)の大腿骨顆部に直径 5mm、深さ 5mm の骨軟骨欠損を作成し、欠損部に PLG scaffold を挿入した scaffold 群と欠損のままとした control 群とに分けた。術後3日、1、2、4週で肉眼所見、組織所見について検討し、術後2、4週における欠損部表層の VEGF と VEGF receptor2 (VEGFR2) の遺伝子発現について real-time RT PCR を施行した。

統計学検定

VEGF と VEGFR2 の遺伝子発現について scaffold 群と control 群との比較に Mann-Whitney 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結果

肉眼所見

scaffold 群では、control 群と比較して、全経過を通して表面平滑で陥凹が少なく、術後4週で表面は光沢のある白色で覆われ、周囲組織との境界も不明瞭であった。

組織所見

ヘマトキシリンエオジン染色では、術後3日で両群において血腫の貯留が認められた。scaffold 群では術後3日より、control 群では術後2週より表層の線維性被膜形成が見られた。scaffold 群においては術後3週よりヘマトキシリンに染色される再生組織が部分的に認められ、術後4週で表層全域に拡大した。深層では、経過とともに周囲の骨梁と連続した骨新生を両群で認めた。

トルイジンブルー染色では、術後2週では両群とも再生軟骨は認められなかった。術後4週では、scaffold群においてプロテオグリカンを含む再生軟骨を表層全域に認め、再生軟骨の深層には肥大軟骨と思われる染色性の弱い領域も認められた。control群では、再生軟骨領域は表層の一部にのみ認められた。

免疫組織染色所見

術後2週では、control群において、I型コラーゲンは周囲の骨組織と連続して局在していた。両群において、II型コラーゲンは認められなかった。VEGFは欠損部全域に見られた。

術後4週では、両群においてI型コラーゲンは深層から軟骨下層に見られ、さらにscaffold群では再生軟骨深層にも局在していた。II型コラーゲンはcontrol群では表層辺縁で認めた一方、scaffold群の表層では再生軟骨全域で認められ、内軟骨骨化領域では減少していた。VEGFは、scaffold群ではII型コラーゲンが発現していた再生軟骨領域では減少していたが、内軟骨骨化領域には局在が見られた。

遺伝子発現

術後2週では、表層のVEGF、VEGFR2発現に両群間の有意差は認めなかったが、術後4週においてはVEGF、VEGFR2ともにcontrol群で有意に高い発現を認めた。

考察

VEGFは血管新生において最も知られた成長因子であり、成長軟骨における内軟骨骨化、発育段階における軟骨細胞の維持、変形性関節症における軟骨破壊など、軟骨に対し様々な影響を与えることが報告されてきた。しかし、骨軟骨再生におけるVEGFの発現部位や発現量、そのタイミングについては詳細に検討された報告はない。本研究においては、術後2週の免疫染色所見では両群で欠損部全域にVEGFの局在を認め、表層においてはVEGF、VEGFR2の発現に有意差は認められなかった。術後4週の免疫染色所見では、VEGFは再生軟骨では発現しておらず、その深層の骨化領域で発現していた。表層のVEGF、VEGFR2の発現は、軟骨再生が進むにつれて、scaffold群において有意に低下していた。

本研究は、PLG scaffoldを用いた骨軟骨再生早期の修復過程の検討とVEGFの発現の関連性について研究したものであるが、従来ほとんど行われていない骨軟骨再生におけるVEGFの発現様式について重要な知見を得たと同時に、その発現が軟骨再生に与える負の相関についても明らかにした。今後の軟骨再生治療のあらたな足がかりとなりうる点において価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。