

論文内容要旨

論文題目 **Stromal cell-derived factor-1 担持スキャホールドを用いた骨組織誘導の促進**

学位申請者 伊達 智美

1. 緒言

現在、骨欠損を伴う口唇口蓋裂の治療には自家骨移植が一般的である。しかしながら、この治療法では、患者への侵襲が大きい上に、移植部位の形態維持が難しい。また、十分な強度をもつ新生骨が形成されないため、後の歯列矯正が難しいなどの問題を抱えている。

このような問題を解決する新たな手段として、生体分解性スキャホールドを用いた組織工学による治療が注目されている。スキャホールドの力学的性質を制御することによって、移植体の形態維持が容易なことから、各種の口腔内組織の再生治療研究が盛んに行われている。口唇口蓋裂のような比較的大きな骨欠損の場合、スキャホールド内部での骨形成には長時間を要するため、骨組織の新生を促進する細胞、ならびに、細胞増殖・分化制御の可能な因子を併用する試みも数多くみられる。

本研究では、骨芽細胞や間葉系幹細胞の誘引因子として知られる **stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)** に注目した。この **SDF-1** を多孔質性スキャホールド内に担持し、その局所濃度を高く維持することによって、内在性の骨形成細胞がスキャホールド内へ誘引され、スキャホールド内部における骨再生速度が向上するとの仮説を立てた。これを検証するため、スキャホールドに親和性を有するペプチドを利用して生体分解性スキャホールド-SDF-1 複合体を作製した。これをラット頭蓋骨骨欠損部に埋植して、**SDF-1** の担持が骨形成速度に及ぼす影響を調べた。

2. 実験方法

2. 1 スキャホールド親和性 **SDF-1** の作製

塩基性アミノ酸 (K) および疎水性アミノ酸 (L) の連鎖が 5 回繰返されたペプチド **KLKLLKLLKLL (KL5)** を **SDF-1** に連結した融合タンパク質 **SDF-1-KL5** を大腸菌発現系によって合成した。

精製物の分子サイズおよび純度は **SDS-PAGE** 法により分析し、二次構造に関する情報は円二色性分析 (CD 分析) により取得した。

SDF-1-KL5 の機能評価として、**Boyden chamber** 法による細胞走化性試験を行った。細胞には、ヒト骨芽細胞株 (**MG63**) およびヒト不死化間葉系幹細胞株 (**UE6E7T-3**) を用いた。それらの細胞における **SDF-1** レセプター (**CXCR4**) の発現は **RT-PCR** 法によって調べた。

別紙様式 2

2. 2 スキャホールド-SDF-1-KL5 複合体の作製

SDF1-KL5 と生体分解性高分子 [L-乳酸-ε-カプロラクトン共重合体 ; P(LA/CA)] との親和性は表面プラズモン共鳴分析 (SPR 分析) により調べた。

ソルトリーチング法によって作製された P(LA/CA) スポンジに SDF-1-KL5 溶液に浸透させ、内部に SDF-1-KL5 を担持した。担持量は BCA 法によって定量した。

2. 3 動物内骨再生試験

ラットの頭蓋骨に直径 5 mm の骨欠損部を作製し、そこへ P(LA/CA) スポンジ-SDF-1-KL5 複合体を埋植した。比較のため、欠損部に何も埋植しないコントロール群、および、リン酸緩衝液適用群についても実験を行った。埋植後 0~28 週目にマイクロ CT 撮影を行い、骨欠損部の体積を測定した。さらに、埋植 28 週後に頭蓋骨を固定・脱灰し、凍結切片を作製した後、ヘマトキシリンエオジン染色を行い顕微鏡観察に供した。

【結果および考察】

大腸菌内で発現させ、精製したタンパク質は、SDS-PAGE 分析において単一バンドを与え、その移動度は SDF-1-KL5 のアミノ酸配列から予測される移動度とよく一致した。また、同タンパク質の CD スペクトルは、天然型 SDF-1 のそれとよく一致した。以上の結果から、目的通りの SDF-1-KL5 を取得することができ、その SDF-1 領域の構造は、KL5 を連結しても損なわれないことが示唆された。また、細胞走化性試験の結果、作製した SDF-1-KL5 は間葉系幹細胞および骨芽細胞の走化性を亢進することがわかり、SDF-1 としての機能を備えていることが示された。

さらに、SPR 分析によって、SDF-1-KL5 が P(LA/CA) 表面に吸着することが示された。その解離定数は 9.8×10^{-8} M であった。また、P(LA/CA) スポンジ内に SDF-1-KL5 溶液を浸透させた結果、 $0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の表面密度 (6.1×10^{-4} g/g sponge) で SDF-1-KL5 が担持された。

動物実験において、骨欠損部の体積はラットの成長につれて増大したが、SDF-1-KL5 担持 P(LA/CA) スポンジ埋植群では、欠損部に何も埋植しないコントロール群、および、リン酸緩衝液適用群に比べて、欠損部体積の増大が有意に抑えられた。この結果は、骨芽細胞等の内在性骨形成細胞のスポンジ内部への浸潤が、SDF-1-KL5 の作用によって促進されたことを示唆する。組織切片の観察結果も、骨欠損部における骨様組織の形成が SDF-1-KL5 の担持によって促進されたことを支持した。

【結論】

SDF-1 を担持した P(LA/CA) スポンジを骨欠損部に移植することによって、内在性の骨形成細胞がスキャホールド内へ誘引され、スキャホールド内部における骨再生速度が向上することが示唆された。