

学位研究紹介
--------

## FGF-2 の組織内徐放を用いたマウス上顎皮質骨新生とその機序の解析

### Analysis of a mechanism of additive bone generation on maxillary bone in mouse using recombinant human FGF-2 incorporating gelatinhydrogel

新潟大学大学院医歯学総合研究科, 口腔生命科学専攻,  
口腔健康科学講座, 顎顔面口腔外科学分野  
小玉 直樹  
Division of Oral and Maxillofacial Surgery,  
Department of Oral Health Science,  
Course of Oral Life Science, Niigata Graduate School of Medical  
and Dental Sciences  
Naoki Kodama

#### 【目 的】

歯科口腔外科の分野において新たな骨の形成が望まれる状況がある。それは口唇口蓋裂における顎裂や失われた歯槽骨の補填である。現在はこれらの骨の需要に対し自家骨移植が適応されるが、一般的にドナーサイトへの侵襲が大きいことが問題となる。新たな骨を必要としている部位へ低侵襲に生体材料を適用し、生体が本来備えている骨再生能力を賦活することで骨を形成することが可能になれば患者に大きな利益をもたらす事になる。近年、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) の組織内徐放が骨折の治癒を促進する事や、骨欠損の再生を惹き起こすことが報告されている。今回この研究では FGF-2 の組織内徐放を用いた歯槽骨新生の実用可能性を検討するとともに、その生物学的機序を解析した。

#### 【方 法】

最初に FGF-2 の組織内徐放による歯槽骨新生モデルを作製した。ゼラチンハイドロゲルを担体とし、マウス上顎歯槽骨上で 20  $\mu$ g の FGF-2 を 10 日間徐放した。対照としてゼラチンハイドロゲルのみを使用した実験群を設定した。徐放開始 28 日後にマイクロ CT 撮影を行い、画像解析により骨新生体積の定量を行った。次に骨新生現象の機序を解析するために FGF-2 徐放開始後 7, 14, および 28 日目の組織所見および PCNA 免疫染色所見を

解析した。加えて FGF-2 徐放開始後 7 日目、すなわち仮骨形成期骨膜における骨芽細胞関連マーカー遺伝子および FGF レセプター遺伝子の発現分布を in situ ハイブリダイゼーション法により検出した。また、これら遺伝子の発現量を Laser micro dissection 法およびリアルタイム RT-PCR 法により骨膜組織特異的に定量した。

#### 【結 果】

マイクロ CT を用いた骨体積の計測から、FGF-2 の徐放により上顎骨体積は平均 50% 増加する事が示され、対照群の平均増加量 1% と比較して有意に高値を示した (表 1)。組織学的な検索から、FGF-2 徐放開始後 7 日目には骨膜の多層化と既存歯槽骨に連続した仮骨形成が観察された。28 日目では骨膜の多層化と仮骨形成は終息し、層板構造を伴う肥厚した皮質骨が観察された (図 1)。PCNA 免疫染色からは、骨膜構成細胞の増殖活性が対照群と比較して有意に上昇していることが示された (表 2)。in situ ハイブリダイゼーション画像を図 2 に示す。FGF-2 徐放群において FGFR1, FGFR2 および FGFR3 の何れにおいても仮骨を取り囲む cuboidal osteoblast に強いシグナルを検出し、骨膜の紡錘形細胞でもシグナル陽性細胞の点在をみとめた。Runx2 は FGFRs にきわめて類似した発現パターンを示した。骨芽細胞系細胞の最終分化マーカーであるオステオカルシン (OC) は仮骨を取り囲む cuboidal osteoblast で特異的に検出された。中期分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP), オステオポンチン (OPN) は骨膜の広い範囲で検出された (図 1)。この骨膜の関連遺伝子発現量を表 3 に示す。FGF-2 徐放群の FGFR, Runx2 および OC を除く骨芽細胞関連マーカー遺伝子の発現量は対照群に対して有意に高値を示した。対照群と正常骨膜間には差を認めなかった。

#### 【考 察】

ゼラチンハイドロゲルを用いた FGF-2 組織内徐放は歯槽骨上へ添加性の皮質骨増生をもたらすことを示した。これまで骨欠損モデルや骨折治癒モデルにおいて FGF-2 を応用した骨再生が多く報告されてきているが、正常な骨への新生骨添加モデルは希である。我々の骨新生モデルは小動物ではあるが、新生する骨の体積は片側上顎骨の約 50% に達し、また組織学的に皮質骨であることから骨組織として十分な機械的強度が見込まれ、そ

の有用性は骨欠損部の再生や骨折の治癒と同等の意義を持つと考えられる。このように培養細胞ではなく生体既存の骨原性細胞をコントロールすることにより骨を形成させることが可能である点はこの方法の大きな利点であり、その簡便性、低侵襲性から実用可能性を持つと考えられる。

FGF-2による骨添加の組織学的な解析からは、増殖した骨芽細胞が活発に骨基質を産生し、既存骨に連続した仮骨を形成することにより皮質骨添加が生じていることが示された。また、細胞増殖と骨添加現象は一時的であり、徐放開始後28日目には終息していた。仮骨を形成して急速に骨を形成していく過程は、長管骨骨折の治癒モデルでみられる骨膜性骨修復に類似している。FGF-2徐放による骨新生は本来生体に内在する骨膜性骨修復機転を人工的に惹き起こす事によると考えられる。PCNA染色を用いた増殖活性の評価から、FGF-2を含まないゼラチンハイドロゲル (FGF-2(-)) を埋入した骨膜組織の増殖活性が正常骨膜と比較して高いことを示した。このことはゼラチンハイドロゲル埋入に伴う外科的侵襲が内因性の組織修復機転を惹き起こしたためと考えられる。内因性の組織修復過程においては、scaffold protein と結合しているさまざまな内因性のサイトカインが働き、組織修復に関わる細胞の遊走や増殖、分化に影響する。しかし、FGF-2徐放群骨膜ではそれ以上の細胞増殖活性を示した。これはFGF-2が持つ強力な細胞分裂励起活性によると考えられる。FGF-2(-)群とは対称的に、FGF-2徐放群では増殖している細胞の大部分が骨芽細胞のマーカーであるALPを発現して

いた。FGF-2のシグナルを直接受けるFGFR1, FGFR2およびFGFR3をコードするmRNAは仮骨表層の成熟した骨芽細胞に強く発現していた。そのため、FGF-2シグナルの影響がこれらの成熟した骨芽細胞により強く影響していると予想される。したがって、FGF-2の作用の一つである細胞分裂誘起活性がより成熟した骨芽細胞に対して強く働いている事が考えられる。これらの所見は、既存骨表層に存在している成熟した骨芽細胞の増殖がこの仮骨形成を伴う急速な骨形成の重要な要素の一つとなっていることを示している。骨膜組織特異的に抽出したRNAの定量的RT-PCRは、FGF-2刺激により骨膜組織のRunx2発現量が上昇する事を明らかにした。Runx2の発現量が上昇した理由としては、第一に成熟した骨芽細胞の割合が増加したことがあげられる。それはRunx2は増殖活性が高められた成熟した骨芽細胞に強く発現しているからである。第二の理由として、FGF-2刺激により骨芽細胞系細胞のRunx2の転写が促進されたことが考えられる。Runx2は骨芽細胞の分化に必須である。FGF-2徐放群のALPの発現分布は仮骨表層の骨芽細胞だけでなく骨膜外層の紡錘形細胞にまで及び、対照群で増殖した細胞の大部分が骨芽細胞系細胞の発現型をもたないことは対称的である。この違いは、FGF-2は幼弱な骨芽細胞系細胞のRunx2発現上昇を促進し、結果として分化が促進されることを示唆している。今回の実験は、in vivoで観察されるFGF-2の骨形成効果が骨芽細胞の増殖によるものだけではなく、骨芽細胞系細胞の分化や成熟をRunx2の発現上昇を通して促進させている可能性を示した。

表 1. Average volumes of one-sided maxillary bones 28 days after treatment with FGF-2 (+) gelatinhydrogel or FGF-2 (-) gelatinhydrogel.

Experimental group	Average volume [mm <sup>3</sup> ]*	
FGF-2 (+)	Experimental side	7.19 ± 0.80 <sup>†</sup>
	Untreated side	4.82 ± 0.35
FGF-2 (-)	Experimental side	4.55 ± 0.74
	Untreated side	4.49 ± 0.65

\* Values are expressed as the mean ± standard deviation of four samples.

<sup>†</sup>P < 0.01 compared with experimental side of FGF-2 (-)

表 2. PCNA-positive cells indices [%] of the periosteums in the maxillary bone located at the site of gelatinhydrogel implantation.

Experimental group	Experimental time		
	Day 7	Day 14	Day 28
FGF-2 (+)	75.92 ± 4.91 <sup>AB</sup>	48.28 ± 3.05 <sup>AB</sup>	18.06 ± 9.56
FGF-2 (-)	56.26 ± 5.81 <sup>B</sup>	34.18 ± 7.82 <sup>B</sup>	10.15 ± 4.50 <sup>B</sup>
Normal periosteum (No material implanted)	5.24 ± 0.72	3.80 ± 2.00	3.79 ± 2.35

Randomly selected high-power fields of the immunostained sections were examined and at least 1000 cells were counted for PC10 staining in each section. Values are expressed as the mean ± one standard deviation of four samples.

<sup>A</sup> P < 0.05 compared with gelatinhydrogel<sup>B</sup> P < 0.05 compared with Normal periosteum

表 3. mRNA expression values \* of FGFRs, Runx2 and bone markers of the periosteum day 7 after implantation of the gelatinhydrogel. [Copies of transcripts per 10<sup>6</sup> copies GAPDH]

	FGFR1	FGFR2	FGFR3	Runx2	ALP	OPN	OC
FGF-2 (+)	0.601 ± 0.211 <sup>ab</sup>	0.1171 ± 0.0495 <sup>ab</sup>	0.0527 ± 0.0189 <sup>ab</sup>	0.722 ± 0.241 <sup>ab</sup>	1.480 ± 0.332 <sup>ab</sup>	1.687 ± 0.547 <sup>ab</sup>	39.96 ± 34.17
FGF-2 (-)	0.235 ± 0.059 <sup>b</sup>	0.0361 ± 0.0152 <sup>b</sup>	0.0208 ± 0.0075 <sup>b</sup>	0.285 ± 0.109 <sup>b</sup>	0.528 ± 0.160 <sup>b</sup>	0.588 ± 0.120 <sup>b</sup>	13.59 ± 6.61
Normal periosteum	0.165 ± 0.067	0.0358 ± 0.0146	0.0247 ± 0.0113	0.186 ± 0.066	0.301 ± 0.223	0.482 ± 0.255	16.54 ± 20.23

\* values are expressed as the mean ± one standard deviation of five samples.

<sup>a</sup> P<0.05 compared with FGF-2(-) <sup>b</sup> P<0.05 compared with Normal periosteum

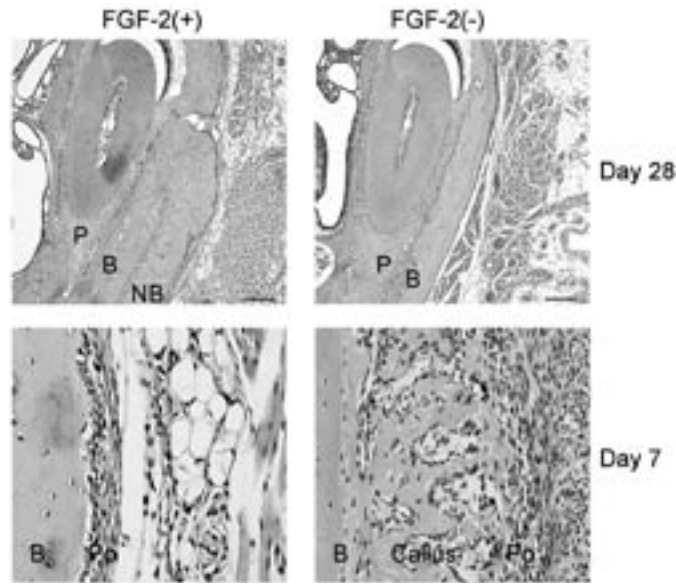


図 1 Photomicrographs showing histological frontal cross section with Hematoxylin-Eosin staining of the maxillary bone located at the site of gelatinhydrogel implantation.

P: periodontal ligament, B: alveolar bone

NB: new bone, Po: periosteum Scale bars: 200 μm

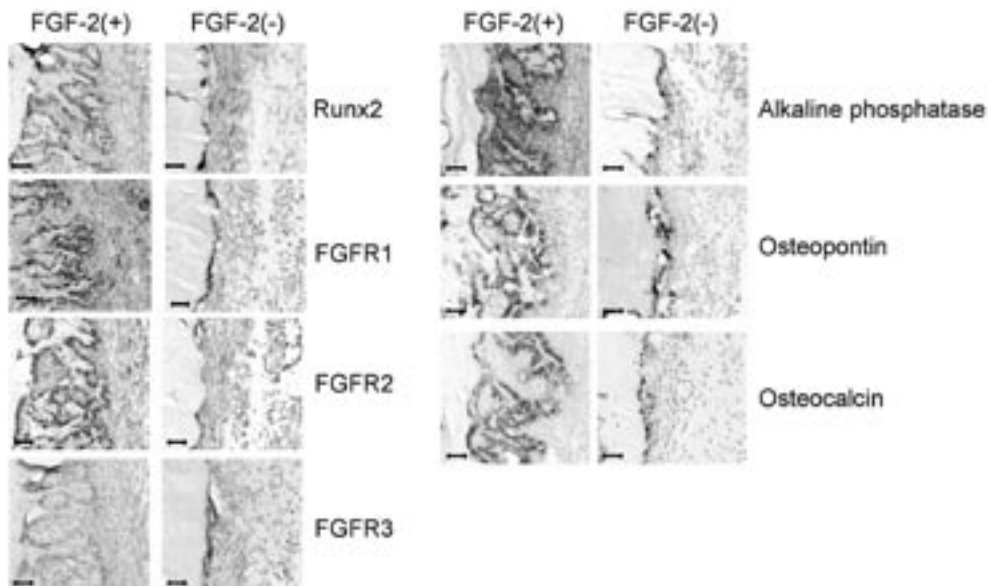


図 2. Photomicrographs showing in situ hybridization of periosteal tissues 7 days after implantation of the gelatinhydrogel. mRNA signals were visualized by BCIP/NBT. Counterstained with methyl green. Bar = 30 [ μm]