

平成21年 5月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791043

研究課題名 (和文) 骨再生能を制御する分子メカニズムに関する研究

研究課題名 (英文) Investigation of molecular mechanism in bone regeneration

研究代表者

松村 昭 (Matsumura Akira)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号： 40445036

研究成果の概要：

動物種間での骨形成能の差を解明すべく、ラット及びイヌの大腿骨より骨髄間葉系細胞を採取し BMP を添加して ALP 活性を測定した。BMP を添加しない状態でもラットにおける ALP 活性はイヌの約 10 倍高く、BMP を添加して培養した場合、ラットではイヌの約 2 倍反応が強く、生体における種の差を *in vitro* で再現し得た。遺伝子発現を PCR にて検討したところ、ラットでのみ BMP4 の発現が見られ、この発現の差がベースラインでの ALP 活性の差に寄与している可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：BMP、骨形成速度、加齢、動物種

1. 研究開始当初の背景

骨損傷（骨折、骨欠損、骨壊死など）の修復反応は局所的な骨新生と新生骨の remodeling による力学的強度の回復である。この反応（修復速度）は幼年期には早く、加齢につれて遅延してくることは

古くから知られた事実である。つまり高齢者では骨修復に長時間を要することになる。また生物界では進化にともなって骨再生能力が低下することが知られている。

我々はマウス、ラビット、イヌ、サル

などを用い、骨形成蛋白 (Bone Morphogenetic Protein; 以下BMP) の骨形成作用を検討してきた。その過程の中で、BMPに対する応答性が動物種間で大きく異なることが明らかになった。例えば、マウスでは5 μ gのBMPを用いても3週間で完全な骨形成が誘導されるのに対し、ラビットではその10倍量を用いて約6週間、イヌでは20倍量、サルでは50倍量と約6週間の期間を要する。さらにヒトで臨床的に用いられているBMP量はマウスで用いられる量の50倍にのぼり、時間的にも2ヶ月以上を要する。骨折修復に必要な期間もおおよそ同様の差が認められる (Biomaterials 27:4934 2006, Clinical Orthopaedics and Related Research 395:110 2002)。もちろん、これらの動物種では体重や寿命などが異なるが、それだけではBMP必要量や骨形成速度の差を説明できず、BMP抑制因子も含めた骨形成速度を規定するメカニズムの存在が示唆される。そのメカニズムを解明することが、骨再生を効率化するためには非常に重要であると考えた。

2. 研究の目的

骨修復・骨新生の反応速度を制御している機序を解明し、骨再生の画期的な治療法の開発につなげることを目的とした。すなわち骨形成速度の種差を細胞レベルの実験にてモデル化し、分子生物学的手法を用いてそのメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) In vitroにおけるBMPsに対する反応性の動物種差の再現

イヌ及びラットの骨髄由来の培養細胞を用いて、リコンビナントヒトBMP-2 (rhBMP-2) を添加した際の反応性として、骨形成能を評価する。具体的にはアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性について、rhBMP-2の用量依存的・経時的な変化を捕らえる。ALP活性に関してはDNA量もしくはタンパク量で標準化した値で評価する。rhBMP-2に対して、いずれの細胞も十分な骨芽細胞分化をきたさない場合には、培養条件を、アスコルビン酸・ β グリセロリン酸を含んだ、骨芽細胞分化誘導培地に変更し再検討を行なう。

(2) 骨形成関連遺伝子及びBMP細胞外抑制因子の遺伝子発現の評価

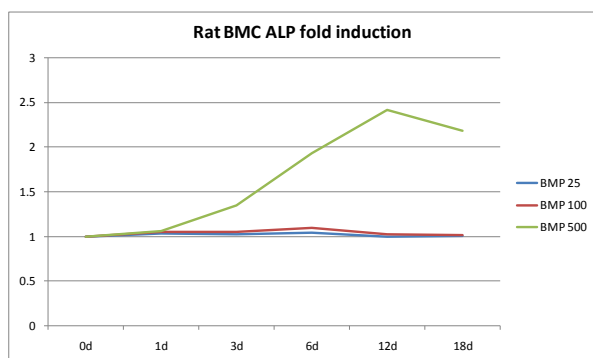
BMPsに対する動物種差を認めた場合に、BMPsの反応が不良な細胞については遺伝子発現レベルにおいて①BMPシグナルに関連する骨形成誘導遺伝子の発現低下、②BMP細胞外抑制因子 (NogginやGremlinなど) の発現上昇、などが考えられる。そこで、今までにmRNAの遺伝子配列が既知である遺伝子群について、各動物由来細胞に対してrhBMP-2 (上記ALP活性測定により決定された用量) を投与し、経時的にRNAを回収。遺伝子発現量をRT-PCR法を用いて評価する。特にイヌに関しては遺伝子配列が未解明の分子も数多く存在するため、そのような分子についてはマウス、ラット、ヒトでの配列を参考にして、各種で保存された部分を用いてprimerを作成する。

4. 研究成果

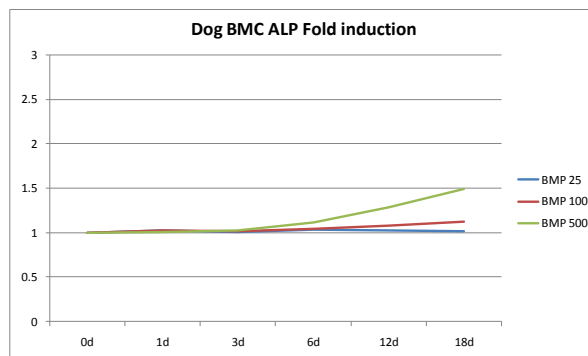
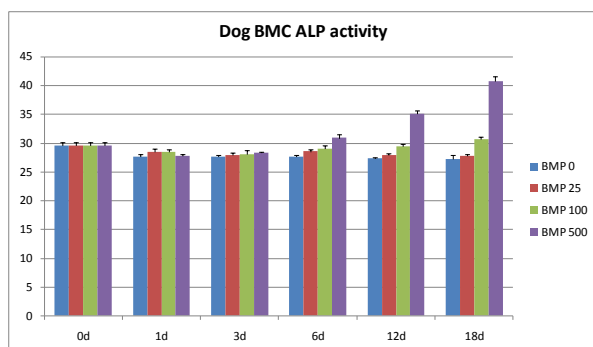
(1) In vitroにおけるBMPsに対する反応性の

動物種差の再現

ラット及びイヌの寿命から換算してラットは Wistar rat 8 週齢を、イヌはビーグル犬 12 ヶ月齢のものを選択し、大腿骨ならびに上腕骨より骨髓細胞を採取、培養を行った。ラットの骨髓細胞は何台継代しても増殖能が保たれるのに対して、イヌの細胞では継代回数が増加するにつれて増殖能の低下が認められたため、ALP測定に際しては継代が3回までのものを使用した。ラット骨髓細胞ではBMP添加後3日目より高濃度BMP添加群にてALP活性の上昇が認められ、12日目で最高値を呈していた。BMP 500ng/mlの濃度では添加後、12日目でコントロールに比べ約2.5倍のALP活性の上昇が認められた。



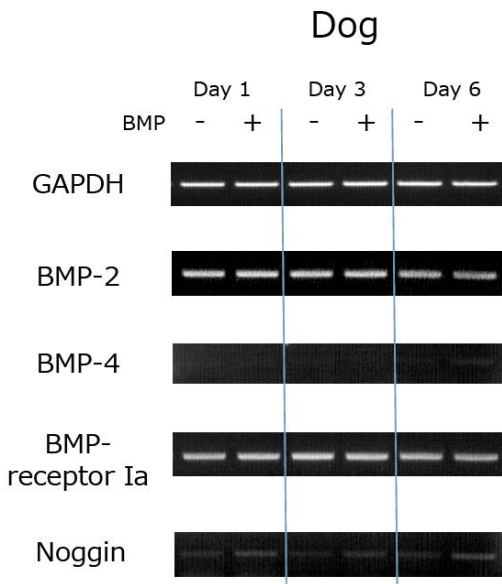
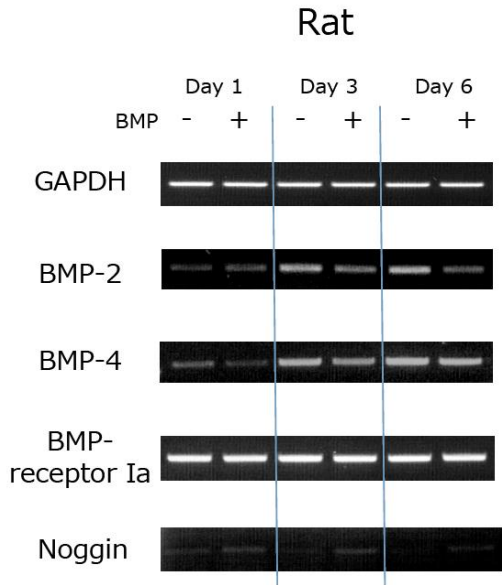
一方イヌでは高濃度BMP群においても6日以降からALP活性が上昇し、18日目で最高値を呈したが、コントロールの1.5倍程度であった。



両者の最も大きな違いは、BMPを投与していない状態でのALP活性であり、その差は約10倍であった。BMP投与後12日目におけるBMP 500ng/ml投与時の対コントロール比はラットで2.5倍、イヌで1.2倍であり、BMPに対する反応性としては約2倍異なっていた。コラーゲンを使用したBMPによる異所性骨形成モデルではイヌでの骨形成に必要なBMP量はラットの約20倍であり、これらのALP活性の差によってin vitroで再現し得たと考えられた

(2) 骨形成関連遺伝子及びBMP細胞外抑制因子の遺伝子発現の評価

次に①の実験と同様の条件で培養したイヌならびにラットの骨髓細胞のRNAを回収し、BMPのシグナリングに関わる分子（BMP-2, BMP-4, BMPR-Ia, Noggin）の発現をRT-PCRにて確認した。（次頁図）



Nogginの発現は両者共にBMPの投与により発現の軽度上昇が認められた。BMP receptor IAに関しては両者共にBMPの投与の有無に関わらず、定常状態での発現が認められた。ラットではBMPを添加していない状態でもBMP4の発現が認められるのに対して、イヌではBMP4の発現が認められなかった。この発現の差がベースラインで

のALP活性の差に寄与している可能性が考えられた。またラットではBMP投与により3日目、6日目においてBMP-2、BMP-4共に発現の減少が認められたが、イヌではそのような減少は認められなかった。これらはBMPの投与による負のfeed backの結果と考えられ、BMPのシグナル経路における負のfeed backにも種の差が現れている可能性が示唆された。

各種で差はないが骨形成に関わる重要な分子としてcAMPに着目し、定常状態での活性やBMPに対する反応性の実験を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Matsumura A, Namikawa T, Hashimoto R, Okamoto T, Yanagida I, Noguchi, K, Takami M

Clinical management for spontaneous spinal epidural hematoma: diagnosis and treatment

The Spine J. 2008 (8), 309-14 査読有

2. 前野考史、松村昭、中村博亮、辻尾唯雄、寺井秀富、月山国明、高岡邦夫 硬膜

内外に存在した石灰化を伴った胸椎髄膜腫の1例、 中部日本整形外科災害外科

学会雑誌 2008 (51), 397-99, 査読無

3. 中村博亮、辻尾唯雄、寺井秀富、星野雅俊、松村昭、加藤相勲、鈴木亨暢、高山和士、高岡邦夫 骨粗鬆症性脊椎骨折の病態 骨粗鬆症性椎体骨折後偽関節発生に関与する予後不良因子について 多施設前向きコーホート研究 臨床整形

外科 2008, 43(4) 309-14 査読有

4. Hoshi M, Takami M, Kajikawa M, Teramura K, Okamoto T, Yanagida I, Matsumura A A case of multiple skeletal lesions of brown tumors, mimicking carcinoma metastasis Arch Orthop Trauma Surg 2008 (128) 149-54, 査読有

5. Hoshi M, Takami M, Hashimoto R, Okamoto T, Yanagida I, Matsumura A, Noguchi K Spontaneous regression of osteochondromas Skeletal Radiology 2007 (36), 531-34, 査読有

6. 辻尾唯雄, 中村博亮, 寺井秀富, 松村昭, 星野雅俊, 高岡邦夫 骨粗鬆症性脊椎椎体骨折による遅発性脊髄麻痺に対する手術療法 脳21 2007 10, 178-83, 査読無

[学会発表] (計 10 件)

1. Matsumura A, Terai H, Tsujio T, Toyoda H, Suzuki A, Takaoka K, Matsuda H, Nakamura H Long term results of C1-2 posterior fusion with modified Brooks technique for Atlantoaxial subluxation in RA patients 2008 SPINE WEEK 2008.05.26 Geneva, Switzerland

2. 松村 昭, 中村博亮, 堂園 将, 寺井秀富, 辻尾唯雄, 鈴木亨暢, 前野考史, 高山和士, 高岡邦夫, 松田英樹 RA患者のAASに対するBrooks法の中・長期成績 日本整形外科学会 2008.5.24 札幌

3. 松村 昭, 寺井秀富, 辻尾唯雄, 鈴木亨暢, 堂園 将, 小西定彦, 加藤相勲, 前野考史, 中村博亮 中下位腰椎

骨粗鬆症性椎体骨折後圧潰に対するPLIFの治療成績 日本脊椎インストゥルメンテーション学会 2008.10.2 名古屋

4. 松村 昭, 鈴木亨暢, 月山国明, 中村博亮 腰椎変性側弯症に対する顕微鏡視下片側進入両側除圧術の術後画像評価-進入側別での椎間関節温存に与える影響 日本腰痛学会 2008.11.1 東京

5. 松村 昭, 並川 崇, 堂園 将, 寺井秀富, 辻尾唯雄, 鈴木亨暢, 前野考史, 高山和士, 高岡邦夫, 中村博亮 腰椎変性側弯症に対する顕微鏡下片側進入両側除圧術術後画像評価-画像上の侵襲度評価- 日本脊椎脊髄病学会 2008.4.26 東京

6. 松村昭, 並川崇, 寺井秀富, 辻尾唯雄, 星野雅俊, 鈴木亨暢, 高山和士, 高岡邦夫, 中村博亮 腰椎変性側弯症に対する顕微鏡下片側進入両側除圧術の治療成績 第36回日本脊椎脊髄病学会 2007.4.26 金沢

7. 松村昭, 並川崇, 寺井秀富, 辻尾唯雄, 星野雅俊, 鈴木亨暢, 高山和士, 高岡邦夫, 中村博亮 腰椎変性側弯症に対する顕微鏡下片側進入両側除圧術の治療成績 第80回日本整形外科学術総会 2007.5.24 神戸

8. 松村昭, 並川崇, 寺井秀富, 辻尾唯雄, 星野雅俊, 鈴木亨暢, 高山和士, 高岡邦夫, 中村博亮 腰椎変性側弯症に対する顕微鏡下片側進入両側除圧術の治療成績 第109回中部日本整形外災害外科学術集会 2007.10.4 奈良

9. Matsumura A, Namikawa T, Terai

H, Tsujio T, Hoshino M, Suzuki A, Takayama K, Takaoka K, Nakamura H

Clinical results of microscopic bilateral decompression via unilateral approach for degenerative lumbar scoliosis
34th The International Society for the Study of the Lumbar Spine annual meeting

2007.6.10 Hongkong China

10. Matsumura A, Terai H, Tsujio T, Toyoda H, Suzuki A, Takaoka K, Matsuda H, Nakamura H Long term results of C1-2 posterior fixation with modified Brooks technique for atlantoaxial subluxation in RA patients - minimum five years follow-up- 35th Cervical Spine Research Society annual meeting 2007.11.29 San Francisco, California, USA

[図書] (計 1 件)

Matsumura A, Taneichi H, Kaneda K
Quality Medical Publishing, Inc
Intervertebral Fusion-Using Carbon Fiber Reinforced Polymer Implants-
Chapter 15:Load-bearing Capabilities of the Brantigan Interbody Fusion Cage
2007 647 うち 13 ページ

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 昭 (Matsumura Akira)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
研究者番号： 00445036

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

鈴木 亨暢 (Suzuki Akinobu)
大阪市立大学・大学院医学研究科・後期研究
医

研究者番号： 00445016