

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03842

研究課題名(和文) 骨髄微小環境における骨形成・吸収メカニズムの分子基盤の解明と治療戦略

研究課題名(英文) The clarification of bone formation and absorption mechanism in the bone marrow microenvironment

研究代表者

大野 充昭 (Ono, Mitsuaki)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：60613156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：組織再生において、BMP-2は、その非常に強力な骨芽細胞分化誘導能、異所性骨形成能により広く研究が進められ、すでに世界的に臨床応用が開始されている。一方、我々は、BMP-2は骨髄内において骨形成を抑制することを明らかにしてきた。しかし、BMP-2による骨形成抑制メカニズムは未だ不明である。そこで、BMP-2によって形成される骨を詳細に解析した。1細胞解析の結果、BMP-2誘導骨には、造血機能を有した骨髄が形成されていることが明らかとなった。以上の結果より、BMP-2は臓器としての骨髄形成能を有するため、骨髄内ではその空間確保のために、骨形成が抑制された可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BMP-2が臨床応用され、10数年が経過し、その有効性と共に様々な副作用が報告されるようになった。その一つが、BMP-2による骨溶解/吸収作用である。また、Jeppsonらは、BMP-2をラット大腿骨周囲に移植した場合、骨形成を抑制する事を報告しており(Acta Orthop Scand, 1999)、臨床医、基礎研究者共にBMP-2の骨吸収作用に長年疑問を抱いていた。そのため、BMP-2による骨髄での骨吸収メカニズムが明らかになれば、その機能を抑制する中和抗体や活性化することができる因子を同定し、新たな治療法の開発に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：BMP-2 has been widely studied for its potent ability to induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation, and is already in clinical use worldwide. On the other hand, we have shown that BMP-2 inhibits bone formation in the bone marrow. However, the mechanism by which BMP-2 suppresses bone formation remains unclear. Therefore, we analyzed the detail of BMP-2 induced bone. Single cell RNA-seq analysis revealed that BMP-2-induced bone formed bone marrow with hematopoietic function. These results suggest that BMP-2 has the ability to regenerate bone marrow as an organ, and may suppress bone formation in the bone marrow in order to reserve space for hematopoiesis.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：BMP-2 骨形成 骨吸収 1細胞解析

1. 研究開始当初の背景

骨組織再生において、BMP-2 は、その非常に強力な骨芽細胞分化誘導能、異所性骨形成能により広く研究が進められ、すでに世界的で臨床応用が開始されている。口腔インプラント治療においても、人工歯根埋入部位の骨造成や、骨髓腔内での人工歯根の骨接触率を向上させるために、本因子の応用が試みられている。申請者らもこれまでに、大腸菌発現系で作製した遺伝子組換えヒト BMP-2 を世界に先駆けて開発し、その前臨床試験として、大型動物における BMP-2 の劇的な有効性を実証し、現在臨床応用に向け、PMDA との相談に基づく医師主導型治験の準備を進めている (Ono et al., *Cells Tissues Organs* 2013, 2014)。一方、人工歯根の骨接触率向上を期待して、BMP-2 処理した人工歯根を顎骨骨髓内に埋植する実験を実施したところ、BMP-2 処理した人工歯根周囲では骨形成が抑制されるという、大変興味深い結果を得た。また、マウス大腿骨に実験的な欠損を生じさせ、BMP-2 徐放性スポンジを欠損部に作用させた実験モデルにおいても、骨髓外では著しい骨形成が観察されたが、骨髓内ではむしろ海綿骨の明らかな吸収が引き起こされていた。すなわち、骨髓由来間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させ、骨基質形成を促進するという *in vitro* で実証された BMP-2 の機能が、骨髓内においては何らかの機序により抑制されていると考えるのが妥当であろう。

口腔インプラント治療は、骨髓に人工歯根を埋め込み、人工歯根の回りに骨を形成することを是とするから、この BMP-2 の抑制反応は、歯科臨床において重大な問題となる。このままでは、人工歯根の回りに骨再生を目的とした BMP-2 の応用はできず、むしろ骨髓内に BMP-2 が填入されないように注意を喚起する必要さえある。したがって、骨髓内において BMP-2 の働きが抑制されるメカニズムを解き明かし、むしろ内因性の BMP-2 が効率的に作用し、骨髓腔に増骨反応が起こるよう研究を推進することは、口腔インプラントを活用する補綴歯科専門医として欠くことのできない知識を提供することになる。

これらの臨床的背景、現在の問題点を踏まえ、骨髓腔内における BMP-2 骨誘導抑制メカニズムが、骨髓組織との相互作用に起因するという仮説を立て研究を進め、下記の研究成果を報告してきた (Nguyen, Ono et al, *Journal of Bone and Mineral Research*, 2018, 及び申請者ら未発表データ)。

BMP-2 は、骨髓を多く含む長幹骨骨髓内では骨形成を抑制したが、骨髓をほとんど含まない頭蓋骨や、骨髓を機械的に除去した長幹骨骨髓内では骨形成を促進した。

間葉系幹細胞 (CXCL12-GFP マウス) や骨芽細胞 (Col1a1-GFP マウス) が可視化された遺伝子改変 マウスを用いて BMP-2 の骨髓内投与が及ぼす影響を検討したところ、長管骨骨髓内環境においては間葉系幹細胞の骨芽細胞分化が BMP-2 投与により抑制された。

骨芽細胞に BMP-2 および長管骨骨髓液を添加すると、BMP-2 によって誘導された骨芽細胞分化は骨髓液添加により完全に抑制された。

長管骨骨髓液を液成分と細胞成分に分離し、同様の実験を行ったところ、液成分のみを加えても BMP-2 による骨芽細胞分化抑制は観察されず、細胞成分を加えた時のみ観察された。

以上の研究成果を総合すると、骨髓内に BMP-2 を投与することにより骨髓細胞が何らかのメカニズムで、直接間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を抑制するという非常に魅力的な作業仮説を導くことができる。しかし、どの骨髓細胞が本抑制作用に関与しているのか、またどのようなメカニズムで多段階の分化を示す間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を抑制しているのかは未だ不明である。

2. 研究の目的

BMP-2 を応用した骨補填材は、有効な骨再生療法を提供するとして大変期待されている。一方、我々は、骨髓腔内に BMP-2 を投与すると逆に骨形成が抑制され、骨髓腔が拡大するという大変興味深い知見を得た。本申請研究では、骨髓細胞のシングルセル解析にて、BMP-2 投与による骨形成抑制・骨髓腔拡大に関わっている細胞を抽出し、これら候補細胞が BMP-2 投与下で骨髓ニッチや骨髓腔の維持にどのように関わっているのか、その制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) BMP-2 が骨髄内・外の骨芽細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞に及ぼす影響を検討するため、以下の2つのモデルに BMP-2 を移植し、移植 5, 14 日目に組織を回収し、micro-CT を用いた X 線学的解析、および組織学的解析を行った。

マウス大腿骨骨髄内移植モデル

遺伝子改変マウス (*Col1a1*-GFP Tg マウス, *Trap*-Tomato マウス, *Cxcl12*-GFP マウス) の大腿骨骨欠損作製部位周囲の骨膜を完全に除去した後、25G の注射針を用いて骨欠損を作製し、BMP-2 を含んだコラーゲングールの凍結乾燥体 (BMP-2 凍結乾燥体) を骨髄内に移植した。

マウス頭骨骨欠損部移植モデル

遺伝子改変マウスの頭蓋骨に直径 2 mm の Biopsy punch を用いて骨欠損を作製し、BMP-2 凍結乾燥体を移植した。

- (2) マウスの骨髄を採取後、死細胞を除去するため、DAPI にて染色後セルソーターにて生細胞を分離し、単一細胞を得て、10X Chromium (10X 社) にてライブラリーを作製し、シーケンスを行った。その後、Seurat 4.0.6.を用いて次元削減し、クラスター解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 遺伝子改変マウスを用いて頭蓋骨の骨芽細胞・破骨細胞・間葉系間幹細胞の動態を解析した。その結果、BMP-2 群において、移植後 5 日目に *Col1a1* 陽性の骨芽細胞数の増加を認め、さらに移植後 14 日目には骨組織の形成とともに TRAP 陽性の破骨細胞数の増加が確認された。しかし、BMP-2 を含まないコラーゲングールの凍結乾燥体を移植した群 (対照群) においては、骨芽細胞、破骨細胞ともに観察されなかった。また、創傷治癒部位には、BMP-2 群、対照群ともに *Cxcl12* 陽性の間葉系幹細胞は移植 5 日目、14 日目ともに観察されなかった。
次に、大腿骨における骨芽細胞・破骨細胞・間葉系間幹細胞の動態を解析した。その結果、対象群と比較して BMP-2 群では凍結乾燥体周囲に TRAP 陽性の破骨細胞数の増加を認めた。しかし、*Col1a1* 陽性の骨芽細胞数は観察されなかった。一方、対照群では、移植後 14 日目には骨組織の形成にともない *Col1a1* 陽性の骨芽細胞と TRAP 陽性の破骨細胞が確認された。また、興味深いことに、移植 5 日後に、対照群では *Cxcl12* 陽性の間葉系幹細胞が凍結乾燥体周囲に多数観察されたが、BMP-2 群ではほとんど観察されなかった。
- (2) 次に、BMP-2 によって誘導される骨が生体の骨と同様、造血機能を有している骨髄として機能しているのか、シングルセル RNA-seq 解析 (scRNA-seq) を行った。具体的には、マウスの背部に皮下に BMP-2 を移植し、異所性に骨形成を誘導した。そして、BMP-2 誘導骨と長管骨骨髄の内の細胞分画を、scRNA-seq にて解析した。その結果、BMP-2 誘導骨と骨髄は類似した細胞分画であること、つまり、BMP-2 誘導骨には、B 細胞や T 細胞、NK 細胞、顆粒球、単球といった白血球のみならず、造血幹細胞や骨髄系幹細胞、リンパ系幹細胞といった未分化な骨髄細胞が存在していた。さらに、BMP-2 によって誘導された異所性骨は、造血機能を有した臓器として機能していることがわかった。つまり、BMP-2 は生理活性を有した骨髄を形成している可能性が強く示唆された。また、対照群と比較し、単球のクラスターに変化が生じていることが明らかとなった。中でも、マクロファージのサブセットに変化が生じていることが明らかとなった。マクロファージが間葉系幹細胞に作用し、骨の恒常性維持に深く関与していることから、今後はマクロファージに焦点をおき、BMP-2 の骨髄における骨形成抑制メカニズム明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nosho Shuji, Tosa Ikue, Ono Mitsuaki, Hara Emilio Satoshi, Ishibashi Kei, Mikai Akihiro, Tanaka Yukie, Kimura-Ono Aya, Komori Taishi, Maekawa Kenji, Kuboki Takuo, Oohashi Toshitaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Distinct Osteogenic Potentials of BMP-2 and FGF-2 in Extramedullary and Medullary Microenvironments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7967-7967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mikai Akihiro, Ono Mitsuaki, Tosa Ikue, Nguyen Ha Thi Thu, Hara Emilio Satoshi, Nosho Shuji, Kimura-Ono Aya, Nawachi Kumiko, Takarada Takeshi, Kuboki Takuo, Oohashi Toshitaka	4. 巻 21
2. 論文標題 BMP-2/ -TCP Local Delivery for Bone Regeneration in MRONJ-Like Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7028-7028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nomura Y, Hara E.S, Yoshioka Y, Nguyen H.T, Nosho S, Komori T, Ishibashi K, Oohashi T, Ono M, Kuboki T.	4. 巻 207
2. 論文標題 DNA Methylation-Based Regulation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Chondrogenic Differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 115-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000502885. Epub 2019 Oct 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Y, Kyaw TA, Ono M, Mikai A, Anh TD, Emilio SH, Tosa I, Ishibashi K, Ono-kimura A, Nawachi K, Kuboki T, Oohashi T	4. 巻 22
2. 論文標題 Suppression of bone necrosis around tooth extraction socket in a MRONJ-like mouse model by E-rhBMP-2 containing artificial bone graft administration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12823-12823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312823.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, 土佐郁恵, 三海晃弘, 石橋 啓, 大野 彩, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 骨髄存在・非存在下にてrhBMP-2, rhFGF-2が骨形成に与える影響の検討
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, Ha Nguyen, 笈田育尚, 小盛大志, 秋山謙太郎, 大橋俊孝, 窪木拓男
2. 発表標題 骨髄環境におけるBMP-2誘導性骨形成・骨芽細胞分化抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, Ha Nguyen, 三海晃弘, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 BMP-2, FGF-2が骨髄内・外における骨形成に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三海晃弘, 大野充昭, 納所秋二, 土佐郁恵, 縄稚久美子, 大野 彩, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 マウス薬剤関連性顎骨壊死モデルにおける BMP-2の骨形成能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田仲由希恵 , 大野充昭, 納所秋二 , 石橋 啓, 三海晃弘, 土佐郁恵 , 笈田育尚 , 大野 彩 , 秋山謙太郎 , 大橋俊孝, 入江洋之, 窪木拓男
2. 発表標題 大型動物歯槽骨欠損モデルを用いた大腸菌由来rhBMP-2の骨再生能の検討
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 枝松 緑, 小川美帆, 井出亮太郎, 窪木拓男, 大橋俊孝, 辻 孝, 大野充昭
2. 発表標題 scRNA-Seq解析を応用したマウス歯胚発生メカニズムの解明の試み
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Noshoh, Mitsuaki Ono, Akihiro Mikai, Kumiko Nawachi, Aya Kimura-Ono, Emilio S Hara, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 Bone-inducing effects of rhBMP-2 and rhFGF-2 in bone marrow microenvironment
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Mikai, Mitsuaki Ono, Shuji Noshoh, Ikue Tosa, Emilio S Hara, Aya Kimura-Ono, Kumiko Nawachi, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 BMP-2 local administration for MRONJ-mice induced partial bone regeneration
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ha Thi Thu Nguyen, Mitsuaki Ono, Emilio Satoshi Hara, Taishi Komori, Midori Edamatsu, Tomoko Yonezawa, Aya Kimura-Ono, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 Type XVIII collagen modulates the keratinization of oral mucosa
3. 学会等名 International Association for Dental Research (IADR) 98th General Session and Exhibition and 49th Annual Meeting of the American Association for Dental Research (AADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ha Thi Thu Nguyen, Mitsuaki Ono, Emilio Satoshi Hara, Taishi Komori, Midori Edamatsu, Tomoko Yonezawa, Aya Kimura-Ono, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 A new function of Type XVIII collagen in Basement Membrane of Oral Mucosa: a regulator of Keratinization
3. 学会等名 11th international conference on proteoglycans in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei Ishibashi, Hidemi Torihara, Mitsuaki Ono, Emilio Satoshi Hara, Midori Edamatsu, Tomoko Yonezawa, Shuji Noshio, Ikue Tosa, Takeshi Takarada, Takuo Kuboki, Attila Aszodi, Hiroshi Kamioka, Toshitaka Oohashi
2. 発表標題 Postnatal global deletion of the aggrecan gene impairs endochondral ossification
3. 学会等名 11th international conference on proteoglycans in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	窪木 拓男 (Kuboki Takuo) (00225195)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宝田 剛志 (Takarada Takeshi) (30377428)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	ハラ エミリオ・サトシ (Hara Emilio Satoshi) (40779443)	岡山大学・医歯薬学域・研究准教授 (15301)	
研究分担者	渡辺 亮 (Watanabe Akira) (60506765)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	
研究分担者	秋山 謙太郎 (Akiyama Kentaro) (70423291)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	
研究分担者	浅田 騰 (Asada Noboru) (70803055)	岡山大学・大学病院・研究准教授 (15301)	
研究分担者	枝松 緑 (Edamatsu Midori) (10735343)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	削除：2021年3月4日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------