

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21592524
研究課題名（和文）	BMP-2 と骨髄未分化幹細胞移植法を用いた広範囲顎顔面骨欠損修復への試み
研究課題名（英文）	The evaluation of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) with autogenous bone marrow for the jaw defect.
研究代表者	
植野 高章 (UENO TAKAAKI)	
大阪医科大学・医学部・教授	
研究者番号：	60252996

研究成果の概要（和文）：骨再生医療は顎顔面領域の外科手術後の機能回復において重要な研究課題の一つである。申請者らは、これまで一貫して骨再生医療の臨床応用化を目的として、骨膜・骨髄などから採取した骨形成細胞移植や骨形成因子 IGFs や BMP-2 を応用した骨再生研究を行い、これらの有効性を報告し、臨床応用化を推進してきた。そして、これらの再生医療により形成された骨が複雑な構造を持つ顎顔面領域で長期的な三次元形態を維持するためには、骨形成の初期段階での微小血管網の構築が不可欠である事を示唆してきた。この研究では、申請者らが使用してきた骨欠損モデルを用いて骨髄移植が、微小血管網の誘導・構築が形成骨の長期形態安定にどのように影響を与えるのかをマイクロCTと組織形態学手法を用いて行った。

研究成果の概要（英文）：We investigated the osteogenic potential of a combination graft of autogenous bone marrow and bone morphogenetic protein (=BMP-2) in the rat calvarial defect. The newly formed bone was studied histologically and radiographically and compared with BMP-2 graft. Sixty days after grafting, the combination graft of autogenous bone marrow and BMP-2 showed new bone formation and no resorption of newly formed bone in the defect. The BMP-2 grafted in the defect showed bone formation and formed bone was resorbed at the edge of the defect. Total bone formation of the combination of autogenous bone marrow and BMP-2 was obviously increased compared with BMP-2 graft. This result suggested that the newly formed vascularization was important event to increase and keep the volume of newly formed bone in the defect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生・成長因子・マイクロCT・血管誘導

## 1. 研究開始当初の背景

骨再生医療は顎顔面領域の外科手術後の機能回復において重要な研究課題の一つである。申請者らは、これまで一貫して骨再生医療の臨床応用化を目的として、骨膜・骨髄などから採取した骨形成細胞移植や**骨形成因子 IGFs** や **BMP-2** を応用した骨再生研究を行い、これらの有効性を報告し、臨床応用化を推進してきた。そして、これらの再生医療により形成された骨が複雑な構造を持つ顎顔面領域で長期的な三次元形態を維持するためには、骨形成の初期段階での微小血管網の構築が不可欠である事を示唆してきた。この研究では、申請者らが使用してきた骨欠損モデルを用いて微小血管網の誘導・構築が形成骨の長期形態安定にどのように影響を与えるのかを微小構造学的、組織形態学手法を用いて解明する。

## 2. 研究の目的

近年、顎顔面領域骨欠損への再生医療として、成長因子 recombinant human Bone morphogenetic protein-2 (以下 BMP-2)を用いた再生治療が欧米を中心に臨床応用化され、口蓋裂・インプラント前外科治療(サイナスリフト、歯槽堤造成術)などへの有効性が報告され始めている。申請者らも、米国顎顔面研究施設(カルフォルニア大学ロサンジェルス校歯学部)と共同で rhBMP-2 や Vascular Endothelial Growth Factors (以下 VEGFs) を用いた骨再生療法の臨床研究プロジェクトを推進(H19年度文部科学省研究推進経費採択)し、臨床応用における有用性を X 線学的、組織学的に評価し報告してきた(2008年 Boston, 2009年 San Diego, 2011年 Washington D.C. Academy of Osseointegrationにて共同報告)。BMP-2などの成長因子を用いる顎骨再生療法は従来の自家骨移植法に比べて、骨採取のための二次的外科部位をとまわらないために生体への侵襲がきわめて少ない、また人工骨などに比較しても BMP-2 は骨誘導能を持つために、修復部位での高い骨形成能が期待され、効率的に骨再生機構を制御する事が可能になれば、骨再建の範囲に限界がないことが大きな特徴である。このように BMP-2 再生療法は、今後ますます適応の拡大が期待される実用的な治療法の一つとして国際的にも医科、歯科を問わず注目の高い研究分野となっている。しかしながら、BMP-2 を用いた多くの研究報告が骨形成の有効性は示しているものの、長期的な経過や広範囲な欠損をより安定して骨形成を誘導する骨再生医療は顎顔

面領域の外科手術後の機能回復において重要な研究課題の一つである。申請者らは、これまで一貫して骨再生医療の臨床応用化を目的として、骨膜・骨髄などから採取した骨形成細胞移植や骨形成因子 IGFs や BMP-2 を応用した骨再生研究を行い、これらの有効性を報告し、臨床応用化を推進してきた。そして、これらの再生医療により形成された骨が複雑な構造を持つ顎顔面領域で長期的な三次元形態を維持するためには、骨形成の初期段階での微小血管網の構築が不可欠である事を示唆してきた。この研究では、申請者らが使用してきた骨欠損モデルを用いて微小血管網の誘導・構築が形成骨の長期形態安定にどのように影響を与えるのかを微小構造学的、組織形態学手法を用いて解明する。ための微小血管誘導に着目した報告は、きわめて少ないのが実情である。骨髄には、骨を形成する骨芽細胞や血管を形成する血管内皮細胞、骨吸収に関与する破骨細胞などに分化する未分化幹細胞を豊富に含み、形成骨形態維持のリモデリングへの深い関与が示唆されている。申請者らは、過去にラット顎骨骨髄を頭蓋骨の骨欠損部に移植し、活発な血管新生が生じることを報告した。(Acta Histochemica 110, 2010)。また下顎骨や腸骨の骨髄穿刺により採取した骨髄を顎骨の小欠損部に自家骨、骨補填材、コラーゲンと移植することで、顎裂部や顎骨再建後の癒痕化による血行不良な欠損部での骨形成の有効性を報告してきた(第18回欧州顎顔面外科学会モナコ2010)。こうした臨床経験や基礎研究を背景として申請者は、BMP-2 骨再生療法の症例拡大に直結する新規再生医療法として骨髄移植による微小血管誘導療法に着案した。

申請者らは、すでにラット頭蓋骨骨欠損モデルでの、培養骨髄・骨膜細胞移植法(J. Craniomaxillofac. Surg 34, 2009)などによる骨形成過程を $\mu$ CTによる微細骨梁構造解析や組織学的観察、骨形成マーカーRunx2、血管形成因子 Vascular Endothelial Growth Factors (=VEGFs)などを用いた免疫組織学的手法で詳細に観察し報告してきた(研究業績参照)。また米国カルフォルニア大学 BMP-2 プロジェクトチームの中心メンバーとしてヒト顎骨で BMP-2 から形成された骨の組織学的、微細構造学的解析を行なうなど、BMP-2 を中心とした骨形成研究に幅広い知識と経験を持つ。この申請課題では、広範囲骨欠損部のような、骨断端部や、欠損部に供

給される血液循環からでは、十分に幹細胞が供給されない症例への BMP-2 など成長因子応用医療の展開を、ラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いる。特に BMP-2 投与下に自己増殖・分化能を持つ骨髄幹細胞が周囲環境から供給される幹細胞と連携しながら微小血管網形成を行なう過程を、細胞の増殖・分化のレベルで観察する事を解明する。さらにその過程で、組織再生の三次元立体制御に密接に関与するとされる細胞外基質タンパクのオステオポンチン、血管形成因子 VEGF、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの発現様式と骨形成の解明を予備的に行なう。

この研究では、ラットの頭蓋骨骨欠損モデル(Ueno et al. Annals Plast Surg. 2005)を用いて、第一段階として、骨髄移植から新生血管が誘導される群と誘導されない群を比較し、形成後の骨の形態保持能がなされるかを評価する。評価方法は、過去にわれわれが使用した手法として、1) 骨の三次元的評価法としてマイクロ CT を、2) 骨欠損部の骨形成過程の評価には、摘出直後の組織を凍結非脱灰切片作製からの組織学的、免疫組織学的、酵素化学組織学的手法を用いて、骨髄細胞の骨形成細胞、破骨細胞、血管内皮細胞などへの増殖・分化を評価する。そしてこれらの結果を応用し第二段階として骨成長因子を用いた骨形成モデルへの新生血管誘導が長期的な骨形態安定に及ぼす効果を、第一段階と同じ手法を用いて行う。

### 3. 研究の方法

#### 【実験概略】

ラット広範囲骨欠損モデルに、自家骨髄細胞と BMP-2 を複合的に移植を行ない、その骨形成過程を X 線学的、微細構造学的、免疫組織、酵素組織、組織学的手法で観察し BMP-2、骨髄単独群との比較を以下の項目と組織で検証した。

①形成される骨量と骨質(微細海綿骨梁構造、微細血管構造)

②観察の初期、中期、後期において発現する骨関連マーカーの発現時期と局在。

③骨欠損部における骨芽細胞へ分化する細胞の動態(欠損部断端、中心部など部位)

④骨欠損部への骨への血管形成の時期と局在

⑤形成骨の三次元形態制御に深く関与する細胞外基質(Extracellular Matrix = ECM)の形成

#### 【広範囲の骨欠損作製】

過去にわれわれが行なったラット骨欠損モ

デルを基本的に用いた(Ueno et al., Annals of Plast Surg. 54, 2005)。つまり7週齢 Sprague Dawley ラット(雌)を使用した。過去に BMP-2 を用いた研究で、骨断端と硬膜、骨膜から活発な骨形成は見られるが、欠損は完全に骨治癒しない横径 10mm 前後径 15mm の頭蓋骨骨欠損モデルを広範囲骨欠損モデルとして用いた。作製方法は、ネンブータル全身麻酔下に、ラット頭蓋部に前後的に切開を加え頭蓋骨表面を明示し、注水下に歯科用ラウンドバーで図のごとく広範囲骨欠損を作製した。

#### 【移植方法】

骨髄採取: Ueno et al.らの報告(Ueno T, et al, Acta Histochemica 110, 2007)に従い行なった。すなわち全身麻酔下に脛骨内側に外科用メスで皮切を加え、脛骨骨面を明示した。歯科用ラウンドバーにて皮質骨を窓開けし、0.1ml ツベルクリン針にて骨髄を採取し移植材として用いた。BMP-2 の準備: rhBMP-2 (INFUSE®)を用いた。

まず、添付のコラーゲンシートに BMP-2 液を注射針で均一に散布し、15 分間 Activated させ、移植準備とした。

#### 【グループ分類と観察組織の摘出】

移植材料によって以下の4群に分類した。(各群 20 匹)。

Group1: 骨欠損部に、脛骨から採取した骨髄/BMP-2 複合移植した。

Group2: 骨欠損部に、BMP-2 のみ移植した。

Group3: 骨欠損部に、脛骨から採取した骨髄を移植した。

Group4: 骨欠損部に、非移植とする。

移植手術後に、10, 20, 30, 60 日後にネンブータル注入下に安楽死させ、組織を摘出する。摘出組織は、4%中性ホルマリン液で3日間浸漬固定後、リン酸緩衝液で洗浄し以下の観察を行なった。

#### 【マイクロ CT による形成骨の定量解析】

マイクロ CT (Scam X mate-A080, Comscan techno. Japan) を、撮影条件: 管電流 0.1mA, 管電圧 60kV で、1 枚あたり 10  $\mu$ m スライス、200 枚のスライス断層画像から 3 次元画像構築し観察した。

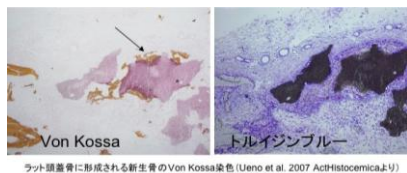
#### [非脱灰切片作製法]

切片は、4% carboxymethyl cellulose (CMC) gel (Fintec, Japan)にて、n-hexen(-75°C)で凍結切片を作製する。作製された凍結切片は、クライオスタット (Leica CM3500) を用いて -25°C で作業を行う。面出し後に、Polyvinylidene chloride film (Cryogluce Type2C, Finetec)にて表面を覆い、5  $\mu$ m の非脱灰切片をタングステンカーバイドバー

(Jung TC-65; Leica, Germany)で作製した。低温乾燥後に

- 1) Von Kossa 染色法にて欠損部の新生骨
  - 2) Runx2 抗体免疫染色  
(Medical&BiologicLaboratories, Nagoya, Japan) により骨芽細胞の染色
  - 3) ALP 抗体染色キットにて骨形成細胞活性を染色
  - 4) VEGF 抗体 (Neo marker, CA, USA)
  - 5) CD34 抗体 (Neo marker, CA, USA)
- 血管形成因子と形成血管の局在を表示した。

作製された試料用いてグループ間の比較検証を採取時期によって行なった。骨形成量の比較は Von Kossa 陽性面積を専用解析ソフト (Keyence, BZH1C) を用いて行なう。また移植細胞の骨形成能については Runx2 および ALP 陽性細胞数の定量を専用解析ソフト (ダイナミックセルカウント, BZ8000) を用いて行なった。有意差検定は Mann-Whitney U 検定を用いて行なった。得られた結果から形成された新生骨の長期的な骨量/骨質などについて BMP-2/骨髄細胞により形成された骨が、微細骨梁構造などがどのように変化していくのかを再生部位に初期に発現した血管形成因子 VEGF、細胞外基質 OPN、破骨細胞 TRAP 染色などの局在などと対比し形成骨の長期的な安定のために必要な初期骨形成過程の因子の検索を行なった。

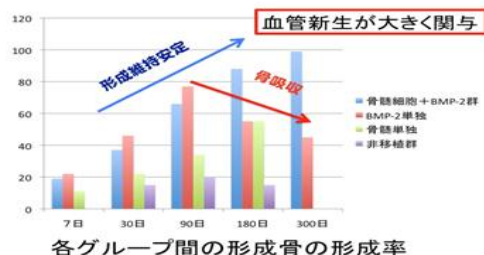


#### 4. 研究成果

移植後 10 日目には GROUP1, GROUP2, GROUP3 においては活発な骨形成様線維芽細胞の出現が見とめられた。GROUP1、2 には、特に細胞数が多く認められた。移植後 20 日目には、GROUP1, Group3 では増殖した細胞が骨形成マーカーALP 陽性 Runx2 陽性を発現し始めた。また骨欠損の中心部には新生骨梁が観察された。また GROUP2 では欠損部中心での新生骨の形成は観察されなかったが、Runx2 陽性線維芽細胞様細胞が骨欠損中心部に観察された。また骨の断端では活発な骨形成細胞が観察された。移植後 30 日目には GROUP1, GROUP3 では骨欠損部全体に新生骨が観察された。マイクロCT、VonKossa 染色による骨形成量の観察では、

骨形成量には有意差が観察されなかった。今後はこの条件設定を本実験に沿った調整基準作成が必要と推察された。

60 日目 GROUP2 においては、骨欠損部全体に骨形成は観察された。骨全体の形成量は GROUP1, 3 に比較して少なかった。GROUP4 では、少量の骨形成が骨欠損断端から観察されたが欠損部に明らかな形成骨は観察されなかった。また GROUP2 において骨の扁平化が観察された。また血管形成因子 VEGF, CD34 陽性細胞は GROUP1, 3 においては欠損部の新生骨内に多く観察された。



#### 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 15 件)

- ① Mari Wakimoto, Matsumura T, Ueno T, Mizukawa N, Iida S. Bone quality and quantity of the anterior maxillary trabecular bone in dental implants sites. Clin. Oral Impl. Res. DOI 10.1111/j.1600-0501.2011.02347.x.2011. 査読有
- ② Tobita T, Nakamura M, Ueno T, Sano K. Sinus augmentation surgery after endoscopic sinus surgery for the treatment of chronic maxillary sinusitis. Implant Dentistry. 20(5). 1-4.2011. 査読有
- ③ Mari Wakimoto, Takaaki Ueno, Tara Aghloo, Peter. K. Moy. Histological evaluation of human alveolar sockets treated with artificial bone substitute material. -A preliminary study-. J Craniofacial Surg. 22. 490-493.2011. 査読有
- ④ Hideto Imura, Tomohiro Yamada, Katsuaki Mishima, Fujisawa H, Kawai H, Azumi Hirata, Noriyuki Sogawa, Takaaki Ueno, Toshio Sugahara. Effect of 2, 3, 7, 8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin suggests abnormal palate development after palatal fusion. Congeit Anom (Kyoto) 50(2). 277-284. 2010. 査読有
- ⑤ Nobuaki Shirasu, Takaaki Ueno, Mari Wakimoto, Toshio Sugahara: Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow

- with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochemica* 112(3)270-277 2010. 査読有
- ⑥ Kazunori Matsubara Eiki Yamachika, **Takaaki Ueno**, Nobuyoshi Mizukawa, Nobuaki Shirasu: Suppressive effects of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid administration on bone resorption. *Osteoporosis International*. 21(8). 1437-1447 2009. 査読有
- ⑦ Eiki Yamachika, Nobuyoshi Mizukawa, **Takaaki Ueno**, Toshio Sugahara: Immobilized recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances the phosphorylation of receptor-activated Smad. *Journal of Biomedical Material Research A*. 88A599-607, 2009. 査読有
- ⑧ Tomohiro Yamada, **Takaaki Ueno**, Norihumi Moritani, Katsuaki Mishima, Azumi Hirata, Tatsushi Matsumura. Primary intraosseous squamous carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*. 37 (8), 448-453, 2009. 査読有
- ⑨ **植野高章**, 太田晃子, 白数信明, 山田朋弘: 超高気孔率ハイドロキシアパタイト (アパセラム AX®) の骨増量術への使用経験. *岡山歯学会雑誌* 28, 65-69, 2009. 査読有
- ⑩ 加納みわ, **植野高章**, 脇本真理, 山田朋弘, 三島克章. 病診連携下に腸骨移植による顎骨増量術と歯科インプラント治療を行なった3症例 —咬合機能を回復後の5年以上経過症例— *岡山歯学会雑誌* 28, 71-74, 2009. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① **植野高章**. 最新の歯槽骨再生医療 成長因子を用いた移植骨採取を伴わない新規医療法の産学連携システム. 高槻市歯科医師会学術総会 (大阪) 2011 年 11 月 17 日
- ② **植野高章**, 太田晃子, 脇本真理. ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおける骨髄移植, 骨膜移植による骨形成の組織学的検討 第 42 回日本口腔インプラント学会学術大会 (名古屋) 2011 年 9 月 18 日
- ③ Mari Wakimoto Tatsushi Matsumura Akiko Ota Takaaki Ueno Nobuyoshi Mizukawa Yoshinobu Yanagi Seiji Iida **Bone quality and quantity of the anterior maxillary trabecular bone in dental implant sites.** the 20th Annual EAO Meeting, which will be held on October 12-15, 2011, Athens.
- ④ **Takaaki Ueno**, Akiko Ota, Mari Wakimoto, Azumi Hirata, Tara Aghaloo, Moy K. Peter: The histological observation of newly formed bone induced by recombinant

- human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). The 26<sup>th</sup> Annual meeting of Academy of Osseointegration. Washington D.C. USA March 3-5, 2011
- ⑤ M. Wakimoto, **Takaaki Ueno**, A. Hirata, S. Iida, T. Aghaloo, P. K. Moy. Histological evaluation of human alveolar sockets treated with artificial bone substitute material (MASTERGRAFT® Granules). The 26<sup>th</sup> Annual meeting of Academy of Osseointegration. Washington D.C. USA March 3-5, 2011.
- ⑥ 近藤浩子, 小林淳一, 吉村仁志, 飛田尚慶, **植野高章**, 佐野和生. 外科的療法おを行ったビスフォスフォネート製剤関連骨壊死 5 症例の検討 第 65 回日本口腔科学会総会 東京 2011 年 4 月 22 日
- ⑦ **植野高章**, 太田晃子, 脇本真理. ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおける骨髄移植, 骨膜移植による骨形成の組織学的検討 第 30 回日本口腔インプラント学会近畿・北陸支部学術大会 (福井) 口演 2010 年 11 月 20 日アオッサ福井
- ⑧ 平田あずみ, 井村英人, 山田朋弘, **植野高章**, 三島克章, 南克浩, 夏目長門, 菅原利夫 Homeobox family *HOXC* 遺伝子は口蓋形成に関与する Localization of the *HOXC* homeobox gene family during palate formation in mice. 第 55 回日本口腔外科学会総会 (東京) 2010 年 10 月 12, 13, 14 日
- ⑨ **植野高章**, 佐野和生, 新田哲也, 中村美喜子, 勝田秀行, 小辻素子, 顎顔面形成外科と歯科インプラントを用いた咬合再建 第 8 回 福井形成外科研究会 (福井) 講演 2009 年 6 月 18 日
- ⑩ Sabina Hameed, Peter K. Moy, **Takaaki Ueno**. A Review of the Effect of Operator experience and Surgical technique on the Incidence of Implant infection for Stage 1 Implant surgery from 4 International Centers. 24th Academy of Osseointegration meeting. San Diego. 2009 年 2 月 28 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 顎顔面インプラント治療のための骨質検査方法

発明者: 植野高章

権利者: 岡山大学

種類: 特許権

番号: 特願 2009-149300

出願年月日：2009年6月9日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植野 高章 (UENO TAKAAKI)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60252996

(2) 研究分担者

山近英樹 (EIKI YAMACHIKA)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：10294422