

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 5月29日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890184

研究課題名（和文）骨形成促進因子を用いた骨再建技術の確立

研究課題名（英文）Confirmed Bone Reconstruction treatment with Bone Formation Stimulatory Factor

研究代表者

館 慶太（TACHI KEITA）

昭和大学 歯学部 助教

研究者番号：90585671

研究成果の概要（和文）：Bone morphogenetic protein (BMP)は皮下や筋肉内に埋入すると異所性の骨化物を誘導する能力があり、骨の再建に有用と考えられてきた。しかし臨床的に必要な骨量を誘導するには活性が弱く大量のBMPを用いるため、コスト面等の問題が実用化の大きな障壁となっている。すでに申請者らはTransforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)がBMP-2の誘導した異所性の骨化物形成を強力に促進することを見いだした。本研究の目的はTGF- β 1とBMP-2を併用することによりBMPの生体内活性を高め、骨の欠損を再建する新しい治療を確立することである。

研究成果の概要（英文）：Bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic bone formation. However, the detailed mechanisms of ectopic bone formation have not been fully understood. Since transforming growth factor (TGF) β is known to regulate bone metabolism, we examined the effects of TGF β on bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic bone formation using a mouse experimental model. The purpose of this research is to establish Bone Reconstruction treatment with BMP-2 and TGF- β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：再生医学, BMP-2, TGF- β , 骨芽細胞, 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) BMPの特徴

Bone morphogenetic protein (BMP)は1965年Uristにより発見され現在までに13種類のBMPのcDNAがクローニングされている。BMPは未分化間葉系細胞を骨芽細胞、軟骨細胞に分化させる能力があり、骨形成能を有することも示されていることから、臨床応用

が期待されている。

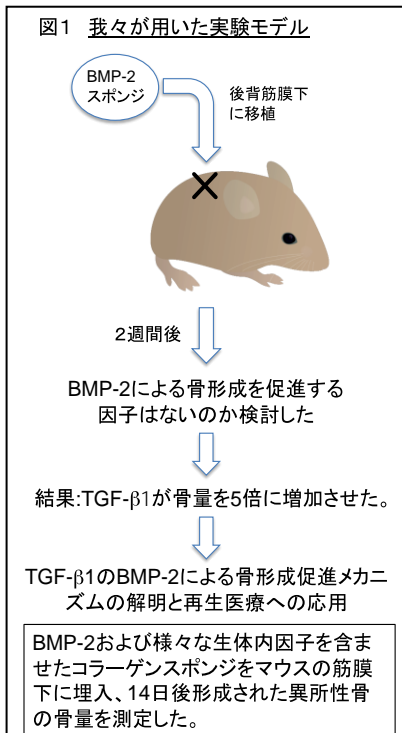
(2) 再生医療におけるBMPの利用と問題点

Bone morphogenetic protein (BMP)は1965年Uristにより発見され[Urist, M. R. et al. Science 150(689):893-899 (1965)]、骨形成能を有しており、皮下や筋肉内に埋入することにより、異所性の骨化物を誘導する。このこと

から臨床で骨欠損の再建等に応用できると期待されてきた。しかし、実際に臨床応用した報告はあるが [Boden, S. D. et al. Spine 25(3):376-381 (2000)], 臨床的に必要な骨量を誘導するには、BMP の生体内活性が弱く大量の BMP を必要とするため、経済面や副作用等が臨床応用の障害になっている。したがって、BMP の作用を増強する因子を見いだすことができれば、これらの課題を克服できると考えられる。

(3) 我々が見いだした解決策

その為、申請者らは独自の方法により BMP の骨形成作用を促進する因子を探索した。その結果 TGF-β1 が BMP-2 の骨形成を大きく促進することが明らかとなった。(図1)



2. 研究の目的

本研究の目的は TGF-β1 と BMP-2 を併用することにより BMP の生体内活性を高め、骨の欠損を再建する新しい治療を確立することである。

3. 研究の方法

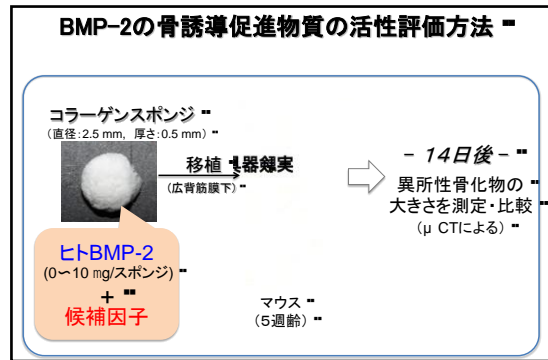
(1)組織塊を構成する細胞の詳細な変化を検討する

BMP-2 や TGF-β1 を含ませたコラーゲンスポンジをマウスの後背筋膜下に埋入し、組織塊形成を 1-7 日まで時系列的に観察していき、各時期の組織塊の組織切片による組織解析、RT-PCR 法を用いた遺伝子解析等で構成細胞の種類や骨芽細胞や破骨細胞等の分化を検討する。

(2)BMP-2 と TGFβ1 以外の組み合わせの検

討

TGF-β1 以外にも BMP-2 による骨形成を促進する物質は estradiol, Activin, parathyroid hormone(PTH), 活性型ビタミン D₃, Heparin, fibroblast growth factor(FGF)-23,等いくつか報告されている。そこでそれらを BMP-2 とともにコラーゲンスポンジに含ませ異所性骨を誘導させ、より効率よく骨形成がおこる条件をマイクロ CT 用いて骨量を量り比較検討する。



4. 研究成果

(1) 組織塊を構成する細胞の詳細な変化を検討する

BMP-2 や TGF-β1 をマウスの後背筋膜下に埋入し、組織塊形成を 1-7 日まで時系列的に観察していき、各時期の組織塊の組織解析、遺伝子解析等で構成細胞の種類や分化を検討した。RTPCR 法を用いて解析した結果、埋入 2,3,5,7 日目の遺伝子解析した結果、骨芽細胞マーカーである osterix、osteocalcin 等の発現が確認され、それらの発現は径時的に発現が増強していった。軟骨細胞マーカーである collagen X、aggrecan、破骨細胞マーカーである calcitonin receptor, cathepsin K の発現も同様に確認された。またすべてのマーカーにおいて TGF-β1 を含ませた群の方が、発現が早期に確認され発現量も大きかった。(図 2)

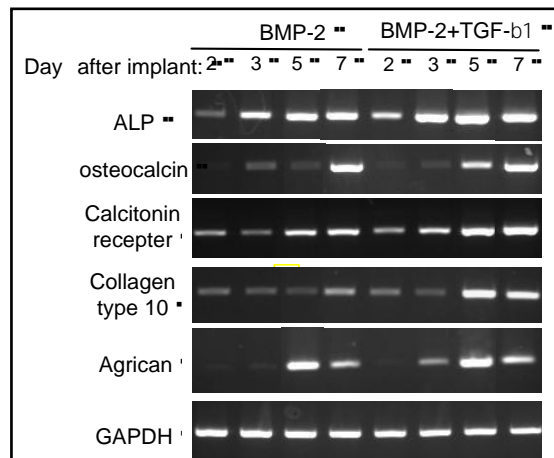


図2

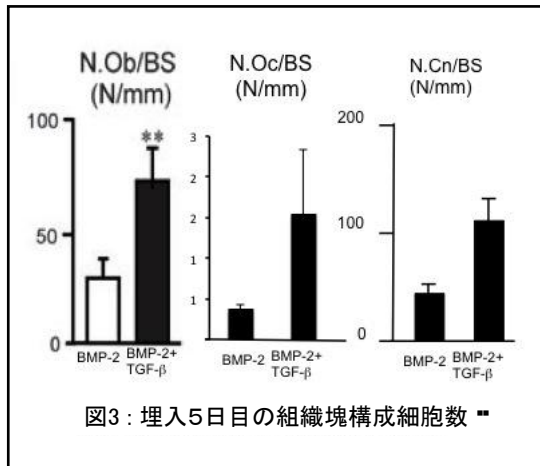


図3：埋入5日目の組織塊構成細胞数

また組織解析においてにおいても遺伝子解析の内容を指示する結果となった。これらの解析結果から BMP-2 を含ませたコラーゲンスポンジをマウスに埋入した2日目から組織塊形成が顕著になりその組織塊を構成する細胞成分として骨代謝に関わる骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞の存在が組織レベル、遺伝子レベルで確認された。そしてそれらはすべて TGF-β を含ませた群が細胞数が多いことがわかった。(図3)

また TGF-β1 を含ませた群の方がそれらの細胞の増殖能、分化が進んでいた。

(2) BMP-2 と TGFβ1 以外の組み合わせの検討

Heparin, fibroblast growth factor-23, Activin 等 BMP-2 の異所性骨形成を促進する因子と BMP-2, TGF-β1 のあらゆる組み合わせをコラーゲンスポンジに含ませたものをマウスの後背筋膜下に埋入。14日後形成された異所性骨を解析し、より効率のいい骨誘導が起こる条件を検討した結果どの因子もあまり促進作用は認められなかった。(図4)

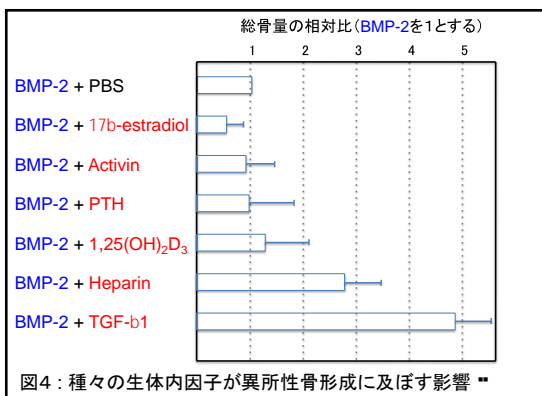


図4：種々の生体内因子が異所性骨形成に及ぼす影響

しかし FGF-23 では TGF-β同様に骨形成促進作用がみられた。(図5)

今後は FGF-23 の骨形成誘導機序も検討していく。

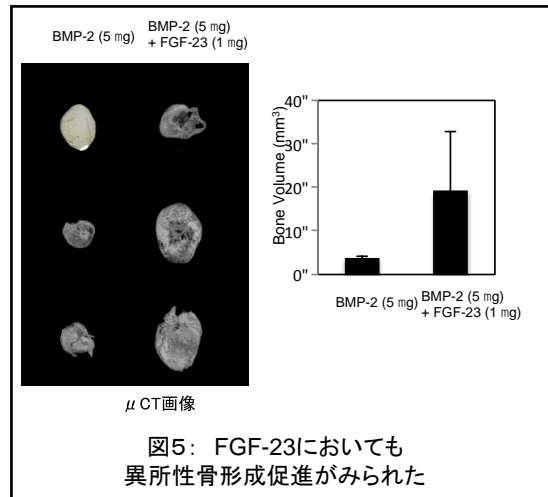


図5：FGF-23においても異所性骨形成促進がみられた

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3件)

(1) Tachi K, Takami M, Zhao B, Mochizuki A, Yamada A, Miyamoto Y, Inoue T, Baba K, and Kamijo R. Bone morphogenetic protein 2 enhances osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF-κB ligand expression in osteoblast. Cell Tissue Res. (査読：有) 2010 342(2):213-20, (2010)

(2) Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, and Kamijo R. Enhancement of bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation by transforming growth factor β. Tissue Eng Part A. (査読：有) 17(5-6):597-606, (2010)

(3) Miyamoto A, Takami M, Matsumoto A, Mochizuki A, Yamada T, Tachi K, Shibuya I, Nakamachi T, Shioda S, Baba K, Inoue T, Miyamoto Y, Yim M, Kamijo R. R848, a toll-like receptor 7 agonist, inhibits osteoclast differentiation but not survival or bone-resorbing function of mature osteoclasts. Cytotechnology. (査読：有) 2012 Feb 23.

[学会発表] (計2件)

(1) 舘慶太, 高見正道, 本田義知, 望月文子, 井上富雄, 鈴木 治, 上條竜太郎, 馬場一美. TGF-BETA1 は BMP の骨誘導活性を強力に促進する.

第 119 回日本補綴歯科学会学術大会, 2010 年 6 月, 東京

(2) 舘慶太
TGF-βは異所性骨形成を強力に促進する.
第9回松本ボーンフォーラム, 2010 年 5 月, 長野

(3) 舘 慶太, 高見正道, 佐藤 華, 本田義知,
新谷 悟, 鈴木 治, 馬場一美, 上條竜太郎:
TGF- β 1 は BMP-2 による骨形成を強力に促
進する.

第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン
学会学術集会, 2010 年 6 月, 北九州

〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘 慶太 (TACHI KEITA)

昭和大学・歯学部助教

研究者番号 : 90585671