

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25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23890123
 研究課題名（和文） BMP-2の骨髄環境下における骨髄ニッチ形成・骨形成抑制メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Investigation of the mechanisms involving BMP-2-induced inhibition of bone formation or niche formation at the bone marrow microenvironment.
 研究代表者
 縄稚 久美子（NAWACHI KUMIKO）
 岡山大学・岡山大学病院・助教
 研究者番号：10379787

研究成果の概要（和文）：

本研究は、BMP-2が骨髄腔内・外で相反する機能を持つという背景のもと、BMP-2の骨髄腔内の骨代謝環境に与える影響および分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。BMP-2のマウス大腿骨骨髄腔内における骨形成を抑制するという、これまでの報告とは全く異なる結果を骨形態学的、分子生物学的に明らかにした。現在までに、このメカニズムの解明のため、ネガティブフィードバック機構や、免疫学の観点からアプローチを行い、興味深いデータを得た。

研究成果の概要（英文）：

BMP-2 is widely known as an osteogenic inducer, but conflicting results are related to its function inside the bone marrow space. This study aimed to clarify the molecular mechanisms and impact of BMP-2 on bone metabolism environment of the bone marrow space. Of great interest, we found that BMP-2 inhibits bone formation in bone marrow space. To date, in an attempt to elucidate this mechanism, we are focusing on BMP-2 negative feedback regulation as well as on cellular and molecular interactions from an immunological perspective.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：1: BMP-2, 2: 骨髄, 3: 血球系細胞

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、骨芽細胞による基質の添加と破骨細胞による吸収を繰り返すリモデリング活性の高い組織である。これら骨芽細胞は間葉系幹細胞に、破骨細胞は造血幹細胞にそれぞれ由来し、骨形成、吸収のメカニズムを解明するにはこれらの幹細胞のすべてが存在

する骨髄環境の理解が必要不可欠である。これまでに Bone morphogenetic protein (BMP)-2 は骨芽細胞の分化を促進し、破骨細胞の増殖を促進することが数多くの研究報告で明らかにされている。すなわち、BMP-2 は骨芽細胞と破骨細胞の双方に作用し、骨代謝を制御していると考えられている。しかし

ながら、その時間・空間的な解析を詳細に行った研究報告はなされていない。さらに、骨芽細胞は、破骨細胞の前駆細胞である造血幹細胞に対して、カドヘリンを介した骨髄内ニッチを形成し、造血幹細胞の維持に関与していることが明らかになっている。これらの事実、BMP-2 は骨芽細胞や破骨細胞に直接的に働くだけではなく、造血幹細胞ニッチを構成する骨芽細胞に作用することで間接的にはあるが造血幹細胞、ひいては骨髄環境へ強い影響を持つ可能性を示唆している。しかしながら、BMP-2 が骨代謝や骨髄環境へ与える影響は明らかにされていない。

今回、我々は、BMP-2 が骨髄内の骨代謝環境に与える影響を明らかにするため、マウス大腿骨に皮質骨欠損を作製した後に、骨髄内に BMP-2 を局所投与し、骨髄内の骨形成状況を骨形態学的に解析を行ってきた。その結果、BMP-2 はこれまでの報告通り骨髄外の皮質骨周囲には多量の骨形成誘導が観察されたものの、骨髄内においては明らかに骨形成が抑制された。これは、造血を司る間葉系幹細胞と造血幹細胞が形成する独特な骨髄ニッチが骨髄腔に存在し、造血に必要な十分な空間を確保するため、BMP アンタゴニストなどによるネガティブフィードバックが働いていることが推測される。

共同研究者であるドイツ Wurzburg 大学の Sebald 教授は BMP タンパクのアミノ酸配列を部分的に変異をさせることで、BMP アンタゴニストの機能を抑制する事のできる BMP 変異体の作製に成功した。つまり、BMP とこの BMP 変異体を同時に作用させると、BMP 変異体が BMP 刺激により発現が促進された BMP アンタゴニストと結合し、その機能を抑制することで、BMP が BMP アンタゴニストの影響を受けることなく機能するというシステムである。そこで、この BMP 変異体を用い、BMP-2 シグナルのネガティブフィードバックを制御することで、骨髄腔内では骨基質に豊富に存在する BMP により旺盛な骨形成が誘導できないかと考えた。

2. 研究の目的

骨形成誘導作用の観点において、BMP-2 が骨髄腔の内外で異なる影響を持つというこれまでの我々の研究背景のもと、BMP-2 の局所投与が骨髄腔内の骨代謝環境に与える影響およびその分子メカニズムを解明することを目的とした。さらに、前述の BMP 変異体を応用することで、BMP アンタゴニストのシグナルを抑制し、骨髄腔内の骨基質に豊富に存在する BMP-2 により旺盛な骨形成が誘導されるかを検討することとした。

3. 研究の方法

本報告書に記載する全動物実験は、岡山大

学動物実験倫理委員会承認 (OKU-2011154) のもと行なった。

(1) BMP-2 の局所投与が骨髄腔内の骨代謝環境に与える影響およびその分子メカニズムの解明

① 骨形態学的検討及び組織学的検討

マウス大腿骨に 23G 針で窩洞を作製し、BMP-2 (10 μ g) 含有アテロコラーゲンの凍結乾燥体 (ペレット) を大腿骨内に移植した。移植してから 5, 14 日後に屠殺、大腿骨を回収し、マイクロ CT にて骨形成量ならびに既存の大腿骨皮質骨の変化を経時的に評価した。

上記 CT 解析を行ったサンプルを通法に従って、脱灰、パラフィン包埋した後、ミクロトームを用いて BMP-2 移植部位を含むように連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H. E 染色)、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色 (TRAP 染色)、osteocalcin (OCN) の免疫染色を行った。

② 分子生物学的評価

①と同様に、マウス大腿骨に窩洞を作製し、BMP-2 含有ペレットを大腿骨内に移植した。移植後 5, 14 日に屠殺し、窩洞の中心から中枢側に 1mm、末梢側に 1mm 離れた計 2mm の範囲の大腿骨を採取、RNA を抽出し、骨芽細胞分化マーカーである alkaline phosphatase (*alp*) および osteopontin (*opn*)、破骨細胞分化マーカーである calcitonin receptor (*ctr*) および cathepsin K (*ctsk*) の遺伝子発現についてリアルタイム RT-PCR 法にて比較検討した。

(2) BMP 変異体を用いた骨形態学的検討

①と同様に、マウス大腿骨に窩洞を作製し、BMP-2 および BMP 変異体 (10 μ g) 含有ペレットを大腿骨内に移植した。移植から 14 日後に屠殺、大腿骨を回収し、マイクロ CT にて骨形成量ならびに既存の大腿骨皮質骨の変化を経時的に評価した。

(3) 免疫不全マウスを用いた骨形態学的検討

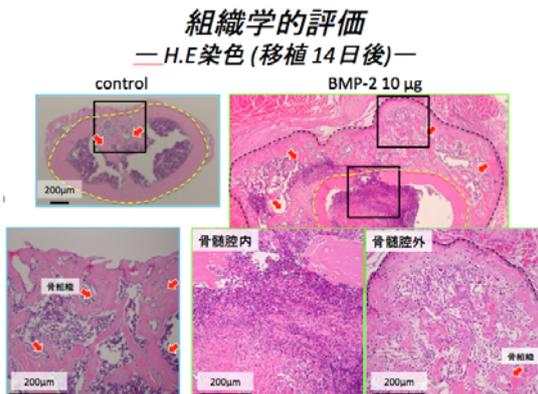
nude マウス (T 細胞欠損)、scid マウス (T 細胞, B 細胞欠損) および NOD scid マウス (T 細胞, B 細胞欠損および NK 細胞機能低下) の大腿骨に 23G 針で窩洞を作製し、BMP-2 (10 μ g) 含有ペレットを大腿骨内に移植した。移植 14 日後に屠殺、大腿骨を回収し、マイクロ CT にて骨形成量ならびに既存の大腿骨皮質骨の変化を経時的に評価した。

4. 研究成果

(1) BMP-2 の局所投与が骨髄腔内の骨代謝環境に与える影響およびその分子メカニズムの解明

BMP-2 移植 5 日後において、海綿骨量は無処置群と比べ BMP-2 を含まないアテロコラーゲンのみ移植した群 (control 群) では増加したが、BMP-2 群では変わらなかった。BMP-2 群は control 群と比べ骨芽細胞・破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現の上昇を認めた。

BMP-2 移植 14 日後において、BMP-2 は周囲皮質骨の外側に於いては強力な骨形成誘導を示したが、骨髓腔内では骨形成は逆に抑制され、皮質骨の菲薄化が認められた (図 1)。



(図 1:ペレット移植 14 日後の H.E 染色像) BMP-2 群は骨芽細胞・破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現が減少した。

以上のことから、BMP-2 は既知の報告通り骨髓腔の外である周囲皮質骨に対しては強力な骨形成を誘導するものの、骨髓腔内に於いては明らかな骨形成抑制作用を示し、骨髓腔の内・外で異なる影響を及ぼす事を骨形態計測学的、組織学的、分子生物学的に確認した。

(2) BMP 変異体を用いた骨形態学的検討

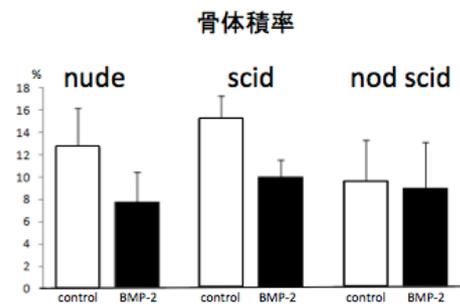
骨髓腔の内・外で異なる結果が得られた理由の 1 つとして、造血を司る造血幹細胞と間葉系幹細胞が形成する独特なニッチが閉鎖された骨髓腔内に存在し、造血に必要な空間を確保するため、BMP アンタゴニストなどによるネガティブフィードバックが働いている可能性があると考えた。そこで BMP アンタゴニストに結合し、その機能を阻害する BMP 変異体を BMP と同時に、マウス大腿骨に移植し、骨形成を骨形態学に検討した。その結果、BMP 変異体は、BMP-2 による海綿骨体積率の減少を抑制することが確認できたが、control 群との比較では、有意に海綿骨体積率が減少した。以上の結果より、BMP アンタゴニストによるネガティブフィードバックよりも重要な因子が存在する可能性が示唆された。

(3) 免疫不全マウスを用いた骨形態学的検討

BMP-2 の骨髓腔内での骨形成抑制作用につ

いて、次に、白血球などの免疫細胞関与の可能性を疑い、T 細胞欠損マウスである nude マウス、T 細胞、B 細胞欠損マウスである scid マウスおよび T 細胞、B 細胞欠損および NK 細胞機能不全マウスである NOD scid マウス大腿骨に BMP-2 含有ペレットを移植した。その結果、nude マウス、scid マウスでは、これまでの結果と同様に、BMP-2 ペレットを骨髓腔内に移植することで骨形成が抑制された。一方、興味深いことに NOD scid マウスでは骨髓腔内における BMP-2 の骨形成抑制効果が確認できなかった (図 2)。

つまり、scid マウスにおいて、BMP-2 による骨形成抑制効果は認められたが、NOD scid マウスにおいてはその効果が認められなかったため、骨髓腔内における BMP-2 の骨形成抑制効果には NK 細胞が関与している可能性が示唆



(図 2:免疫不全マウスへの BMP-2 移植実験) された。そこで現在、我々は NK 細胞の骨髓腔内での局在を免疫組織学的手法を用いて詳細な解析を行なっている。さらには、BMP-2 の NK 細胞に対する効果を明らかにするため、*in vitro* 実験の準備を進めている。

我々は、これまでに、BMP-2 が骨髓腔内では骨形成を抑制するという現象を骨形態学的、組織学的、分子生物学的観点から解析をすすめてきた。そして、そのメカニズムを明らかにするため、BMP 変異体や免疫不全マウスを用いた移植実験を行ってきた。その結果 NOD scid マウスにおいて BMP-2 が骨髓腔内で骨形成を抑制しないという、新しい事実を掴んだ。今後は NK 細胞を含めた免疫系細胞の関与、骨髓腔内の間葉系幹細胞や造血幹細胞などの様々な細胞に与える BMP-2 の影響を詳細に検討していく予定である。

骨髓腔内には骨髓腔外とは異なった骨代謝機構が存在し、このメカニズムを解き明かすことは間違いなく骨代謝研究のブレイクスルーになると考える。また骨は、体を支えるだけでなく、造血臓器としての機能も持ち合わせているため、骨髓環境内の謎を解き明かすことは、線維骨異形成症など難治性骨代謝疾患のみならず、血液・免疫疾患の新たな理解、治療法に画期的な

影響を与え、世界的に大きな注目を集めることは想像に難くない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び¹⁾連携研究者には下線)

[学会発表] (計4件)

- ① 笈田育尚. 大腸菌由来BMP- 2を応用した骨形成能を有する骨補填材の開発. 第33回岡山歯学会総会・学術集会. 岡山. 2012. 11. 25.
- ② 園山 亘. 大腸菌由来BMP- 2を応用した骨再生療法の開発と評価. 第22回日本歯科医学会総会. 大阪. 2012. 11. 9-11.
- ③ 窪木拓男. BMP-2は骨髄腔内では骨形成を促進しない. BS in 直島2012. 岡山. 2012. 9. 8.
- ④ Oida Y. A novel bone formation-inducing GBR membrane containing E. coli-derived rhBMP-2. 90th General Session & Exhibition of the IADR. Iguacu Falls, Brazil. 2012. 6. 21.

[産業財産権]

○ 出願状況(計1件)

名称：人工骨膜

発明者：窪木拓男，園山 亘，大野充昭，笈田育尚，山本克史，中尾 眞，森田 潔

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2011-113498号

出願年月日：平成23年5月20日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

縄稚 久美子 (NAWACHI KUMIKO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：10379787

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

笈田 育尚(OIDA YASUTAKA)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：50625720

園山 亘(SONoyAMA WATARU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40325121

窪木 拓男(KUBOKI TAKUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195