

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463050

研究課題名(和文) BMP-2の環境選択的な骨誘導/抑制メカニズムの解明および適応症の探索

研究課題名(英文) The mechanism identification of environmental selective bone induction/suppression of BMP-2

研究代表者

縄稚 久美子 (Nawachi, Kumiko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10379787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：BMP-2は骨欠損、骨関連疾患の治療薬として、広く臨床応用されている。しかし、我々は、BMP-2の骨髄腔内において骨形成を抑制するという既存の報告と相反する大変興味深い結果を得てきた。そこで、本研究では、環境選択的な骨誘導/抑制メカニズムを解明し、BMP-2を応用したより確実に予見性の高い骨造成法を開発を目的とし研究を進めた。マウス実験において、骨髄の有無がBMP-2の骨形成能と大きく関わっていることが明らかとなった。更に、大型動物モデルを用い適応症を検討した結果、直接BMP-2が骨髄に作用しない、ソケットリフト、ソケットプリザベーション等の術式に最適であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) has been widely used to treat bone defects or bone-associated diseases in human. However, recently our research group found that rhBMP-2 inhibited bone formation in the bone marrow space. The purpose of this research was to elucidate the mechanism of environmental selective bone induction/suppression of BMP-2. In the mice model, BMP-2 could not induce the bone formation in the bone marrow rich environment. Moreover, large animal model experiments revealed that rhBMP-2 were suitable for operative procedure in the bone marrow poor environment, such as socket lift and socket preservation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨形成 BMP-2 骨髄 口腔インプラント オッセオインテグレーション

## 1. 研究開始当初の背景

トランスフォーミング増殖因子-(TGF- $\beta$ )スーパーファミリーに属する骨形成タンパク質(BMP)-2はその組織特異的な活性により背腹軸決定、四肢骨格パターン形成、幹細胞の維持といった多くの生命現象に関与していることが知られている。中でも BMP-2 の強力な骨誘導作用は、次世代の骨造成法として期待され、骨折や骨欠損の治療法として試みられている。実際に、アメリカではチャイニーズハムスター由来の細胞から精製したリコンビナントヒト BMP-2 (rhBMP-2) をアテロコラーゲンと複合させた骨補填材( INFUSE<sup>®</sup>, Medtronic, USA) が FDA により認可され、歯科領域で臨床応用も開始されている。

このような背景のもと、口腔インプラント体周囲の骨増生や早期オッセオインテグレーション獲得を目的とした、rhBMP-2 応用骨造成療法の開発が試みられ、Sachse らは rhBMP-2 によってインプラント体周囲の局所的な骨増生を促進することを報告している (Bone, 2005)。一方で、Schilephake らは、インプラント体周囲の骨増生に rhBMP-2 は関与しないという報告 (Clin. Oral. Implants Res., 2005) や、rhBMP-2 を応用することにより、インプラント体と顎骨の結合強度の指標となるインプラント体除去トルク値が低下するといった報告 (Clin. Oral Investig., 2004) もあり、rhBMP-2 の骨髄腔内でのインプラント体周囲の骨形成やオッセオインテグレーション獲得に対する影響については未だコンセンサスが得られていない。

ところで、頭蓋骨と大腿骨の相違の1つとして、発生の違いによって生じた骨髄組織の有無が挙げられ、骨髄組織を多く含む部位もしくは骨髄内へ直接 rhBMP-2 を作用させることは、骨形成に負の影響を与える可能性が示唆された。そこで、rhBMP-2 の口腔インプラント治療の適応を探るため、骨髄組織とほとんど接することのないブタを用いたソケットリフトモデルを用いて検討を行なった。その結果、rhBMP-2 群では上顎洞底が挙上されてできたスペースに強力に新生骨が再生された。一方、オステオインテグレーション早期獲得を目的に、rhBMP-2 を骨髄腔内に投与し、インプラント体をイヌ顎骨に埋入した。その結果、推測通り、2 週後のインプラント

除去トルク値は rhBMP-2 投与群では有意に低下していた。つまり、これらの結果は、rhBMP-2 が骨髄腔内・外で相反する機能を有すること示唆している。

## 2. 研究の目的

本申請研究は rhBMP-2 が骨髄腔内・外で相反する機能を持つというこれまでの我々の研究背景のもと、

- (1) 免疫組織学的、分子生物学的手法により、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多面的に明らかにする。
- (2) rhBMP-2 の臨床適応の拡大を目的に、rhBMP-2 を応用した新しい骨造成術の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) マウス大腿骨骨髄内環境の相違による rhBMP-2 の効果の検討

マウス大腿骨に 23G 針で窩洞を作製し、rhBMP-2 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。また、マウスを屠殺後、大腿骨を回収し、膝関節から歯科用切削器具を用いて骨髄を機械的に除去し洗浄した。その後、除去した骨髄の再生を阻害するため、rhBMP-2 ペレットを移植した大腿骨を他のマウスの背部皮下に移植した (骨髄完全除去モデル)。移植後 14 日後に屠殺、大腿骨を回収し、マイクロ CT にて海綿骨の骨量変化を評価した。

また、骨髄内の総細胞数、B 細胞、T 細胞数を FACS を用いて解析を行った。

- (2) ラット頭蓋骨における BMP-2 の骨形成能の検討

ラット頭蓋骨に直径 6.4 mm の全層欠損を作製し rhBMP-2 溶液 (濃度 0, 1, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) に 4 週で 24 時間浸漬した rhBMP-2/PLGA メンブレンを骨欠損部に設置した。術後 16 週で回収し、骨形態学的、組織学的に検討を行った。

- (3) rhBMP-2 のミニソケットリフトモデルにおける骨形成能の検討

ミニブタの上顎洞粘膜を挙上し、rhBMP-2 溶液 (濃度 0, 0.1, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  を 100  $\mu\text{l}$ ) を混和した  $\beta$ -TCP 0.1g を挙上したスペースに

充填し、インプラント体を埋入した。8 週後に共振周波数解析装置を用いて骨結合を客観的に評価した。さらに、組織を回収し挙上されたスペースやインプラント周囲の骨再生量に関して組織学的に検討した。

#### (4) rhBMP-2 のソケットプリザベーションモデルにおける骨形成能の検討

ビーグル犬の下顎小白歯を抜歯後、抜歯窩に rhBMP-2 溶液(濃度 0、0.1、1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  を 100  $\mu\text{l}$ )を混和した  $\beta$ -TCP を充填し、歯肉を緊密に縫合した。移植 2 週後に組織を回収し組織学的に骨形成能を検討した。

### 4 . 研究成果

#### (1) マウス大腿骨骨髓内環境の相違による rhBMP-2 の効果の検討

マウス大腿骨に rhBMP-2 を投与すると rhBMP-2 非移植群と比較し、海綿骨量は有意に低下した。一方、骨髓完全除去モデルにおいて、rhBMP-2 の移植により骨髓腔内の海綿骨量は有意に増大した。また、FACS 解析の結果、骨髓内の細胞数は骨髓完全除去モデルにおいて極端に減少しており、B 細胞、T 細胞数も明らかに減少していた。

本結果より、骨髓細胞もしくは骨髄細胞が分泌するサイトカインの何かが rhBMP-2 による骨形成を抑制している可能性が示唆された。

#### (2) ラット頭蓋骨における BMP-2 の骨形成能の検討

rhBMP-2 移植群では、rhBMP-2 非移植群と比較し、骨欠損部位に新生骨が観察され、5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  群において、完全に骨欠損は閉鎖され、既存骨よりも明らかに骨幅が厚くなっている像が観察された。この結果から、骨髄が少ない部位においては、BMP-2 は骨形成を積極的に促すことが明らかとなった。

#### (3) rhBMP-2 のミニソケットリフトモデルにおける骨形成能の検討

共振周波数解析装置を用いて、rhBMP-2 がインプラント体の骨結合能に与える影響を客観的に評価した。その結果、対照群と比較し rhBMP-2 群において、骨結合能が上昇する傾向を認めた。また、組織学的解析の結果、rhBMP-2 非移植群では、挙上されたスペース

に再生骨は認められなかったが、rhBMP-2 0.1、1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  群では、上顎洞粘膜が挙上されたスペースは新生骨にて満たされていた。

本結果から、rhBMP-2 を用いた骨再生療法において、ソケットリフトは適応症の一つであることが示唆された。

#### (4) rhBMP-2 のソケットプリザベーションモデルにおける骨形成能の検討

rhBMP-2 移植群では、抜歯窩に新生骨の再生を認め、特に、10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  群では、ソケット内全体が新生骨で満たされている像が観察された。

本結果から、rhBMP-2 を用いた骨再生療法において、ソケットプリザベーションは適応症の一つであることが示唆された。

以上の本申請研究の結果から、rhBMP-2 の骨髓腔内での骨形成制御機構の一部が明らかとなった。また、rhBMP-2 の臨床応用に向けた積極的な骨造成能を持つ rhBMP-2 複合体の開発は、現在の臨床を変える可能性を秘める技術であり、その適応症の一部明らかとなった。今後は、rhBMP-2 の環境選択的な骨誘導/抑制メカニズムの解明を進め、骨代謝研究の発展に寄与したいと考える。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

M. Ono, W. Sonoyama, K. Yamamoto, Y. Oida, K. Akiyama, S. Shinkawa, R. Nakajima, H.T. Pham, E.S. Hara, T. Kuboki. Efficient bone formation in swine socket-lift model using E. coli-derived rhBMP-2 adsorbed in  $\beta$ -TCP. Cell Tissues Organs. 査読有 Vol. 199, 2014, 249-255.

HM. Khattab, M. Ono, W. Sonoyama, Y. Oida, S. Shinkawa, Y. Yoshioka, K. Maekawa, Y. Tabata, K. Sugama, W. Sebal, T. Kuboki. The BMP2 antagonist inhibitor L51P enhances the osteogenic potential of BMP2 by simultaneous and delayed synergism. Bone. 査読有 Vol. 18. 2014. 165-173.

M. Ono, W. Sonoyama, K. Nema, E.S. Hara, Y. Oida, H.T. Pham, K. Yamamoto, K. Hirota, K. Sugama, W. Sebal, T. Kuboki.

Regeneration of calvarial defects with Escherichia coli -derived rhBMP-2 adsorbed in PLGA membrane. Cell Tissues Organs. 査読有 Vol. 198, 2013, 367-376.

〔学会発表〕(計2件)

植田淳二. BMP-2 は骨髄空内では骨形成を促進しない. 第一回日本骨免疫学会. 沖縄. 2015.7.1.

笈田育尚. 上顎洞底挙上術における大腸菌由来 BMP-2/ -TCP 複合体の有効性の検討. 平成 25 年度 日本補綴歯科学会中国・四国支部総会・学術大会. 高知. 2013.8.31.

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 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

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

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)  
岡山大学・岡山大学病院  
講師  
研究者番号: 40325121

大野 充昭 (ONO MITSUAKI)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
助教  
研究者番号: 60613156

秋山 謙太郎 (AKIYAMA KENTARO)  
岡山大学・岡山大学病院  
講師  
研究者番号: 70423291

新川 重彦 (SHINKAWA SHIGEHICO)  
岡山大学・岡山大学病院  
医員  
研究者番号: 10727465

(3)連携研究者  
該当なし