

令和 元年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05524

研究課題名(和文) BMP-2の環境選択的骨誘導/抑制メカニズムの解明・応用に基づく骨再生療法の開発

研究課題名(英文) The development of bone regeneration therapy based on the clarification of mechanism of BMP-2 induced bone formation and resorption

研究代表者

大野 充昭(Ono, Mitsuaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60613156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：BMP-2は骨形成を強力に誘導する成長因子として知られている。しかし、我々は、本研究において、骨形成を含むBMP-2の効果は骨髄内において著しく抑制され、本抑制効果は、骨髄細胞が直接骨芽細胞に作用することで生じていることを明らかにした。本研究成果は、BMP-2の臨床応用において、BMP-2の副作用その作用機序の一部を明らかにした大変重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでBMP-2は最も強力に骨形成を促進する因子として広く認識されてきたが、我々は骨髄内においてBMP-2は骨形成を抑制することを明らかにした。これは、骨髄内には骨髄外とは異なった骨代謝機構が存在することを強く示唆しており、このメカニズムを解き明かすことは、大理石病や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ると考える。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) is widely known as a potent growth factor that promotes bone formation. However, in this experiment, we revealed that the effect of BMP-2 in inducing bone formation is remarkably repressed by marrow cells via direct cell-cell contact with osteoblasts; this opens new perspectives on the clarification of the side-effects associated with BMP-2 application.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨形成 骨吸収 BMP-2 骨髄環境下

1. 研究開始当初の背景

骨組織再生において、骨形成タンパク質(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。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(rhBMP-2)を開発し、その前臨床試験として、大型動物に対するrhBMP-2含有骨補填材を用いた上顎洞底挙上術などでその劇的な有効性を実証してきた (*Cells Tissues Organs* 2013, 2014)。一方、人工歯根の骨接触率を向上させるため、rhBMP-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、rhBMP-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(図1)。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の機能は、骨髓内において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。

この抑制反応は、歯科臨床においても重大な問題となる。なぜなら、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である。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、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進めることは、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。さらに、この骨誘導抑制メカニズムが明らかとなれば、逆に骨髓腔が狭小化する疾患である大理石病の治療にも応用が可能となるかもしれない。

2. 研究の目的

これらの臨床的背景、現在の問題点を踏まえ、本研究では、骨髓腔内におけるBMP-2の効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) BMP-2による口腔インプラント体の早期オステオインテグレーション獲得を目的に、rhBMP-2を表面にコーティングしたインプラント体をイヌの下顎骨に埋入し解析した。具体的には、成犬(TOYO ビーグル、雌)に対して全身麻酔、局所麻酔下にて下顎両側第2、4小臼歯を抜歯した後、抜歯直後(抜歯即時埋入モデル)および3ヶ月後(待機埋入モデル)に抜歯部位に対してrhBMP-2溶液(10 µg/µL)に3分間浸漬したインプラント体を埋入した。インプラント体埋入14日後に下顎骨を回収し、組織学的解析を行うとともに、インプラント体の除去に要したトルク値の測定を行った。また、対照群のインプラント体は埋入前に蒸留水に浸漬した。
- (2) BMP-2が骨髓内・外の骨形成に及ぼす影響を検討するため、以下の2つのモデルにrhBMP-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HE染色による組織学的解析を行った。
マウス大腿骨骨髓内移植モデル: 野生型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、rhBMP-2を含んだコラーゲンの凍結乾燥体(rhBMP-2凍結乾燥体)を骨髓内に移植した。
マウス頭蓋骨骨欠損部移植モデル: 野生型マウスの頭蓋骨に直径2mmのBiopsy punchを用いて骨欠損を作製し、rhBMP-2凍結乾燥体を移植した。
- (3) 骨芽細胞が可視化された遺伝子改変マウス(*Col1a1*-GFP Tgマウス)を用いて実験2)と同様の実験を行った。
- (4) 骨髓細胞がBMP-2誘導性骨形成に与える影響を*in vivo*にて検討するため、通常のマウス大腿骨、歯科用リーマーを用いて骨髓を除去したマウス大腿骨、他のマウスの背部皮下に移植した通常のマウス大腿骨、他のマウスの背部皮下に移植した歯科用リーマーを用いて骨髓を除去したマウス大腿骨のそれぞれの骨髓内にrhBMP-2凍結乾燥体を移植した。移

植後 14 日目の組織を回収し，X 線学的解析を行うとともに，骨髓細胞数をフローサイトメーター (FCM) にてカウントした。

- (5) 骨髓細胞が rhBMP-2 誘導性骨芽細胞分化に与える影響を *in vitro* において検討するため，ルシフェラーゼ遺伝子上流に BMP 応答性配列を有する C2C12 細胞 (C2C12-BMP response element (BRE) 細胞) および骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞) を用いて *in vitro* において検討した。初めに C2C12-BRE 細胞および MC3T3-E1 細胞を骨髓細胞と共培養下にて BMP-2 刺激し，BMP-2 誘導性骨芽細胞分化に与える影響を，それぞれ BRE に対するルシフェラーゼ活性およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色にて解析した。また，骨髓を細胞成分と液性成分に分離し同様の実験を実施するとともに，骨髓細胞の直接的もしくは間接的作用かを検討するため，チャンバーを用いて共培養し，同様の実験を実施した。対照として，末梢血より採取した血液細胞を用いた。

4. 研究成果

- (1) ビーグル抜歯窩即時埋入モデルにおいて，rhBMP-2 コーティングインプラント体埋入群では，対照群と比較しインプラント体周囲に骨形成が誘導されている像が観察された。しかし，待機埋入モデルにおいて，rhBMP-2 コーティングインプラント埋入群では，インプラント体の周囲に骨吸収象を認め，インプラント体の除去トルク値は対照群と比較して有意に低下していた。
- (2) 野生型マウス頭蓋骨骨欠損部に rhBMP-2 凍結乾燥体を移植した結果，これまでの報告通り，対照群と比較し骨形成が促進された。しかし野生型マウス大腿骨骨髓内に rhBMP-2 凍結乾燥体を移植した結果，rhBMP-2 の量に依存し，骨髓内における骨形成が抑制された。
- (3) *Col1a1*-GFP Tg マウスの頭蓋骨欠損部，および大腿骨骨髓腔内に rhBMP-2 凍結乾燥体を移植し蛍光顕微鏡下にて観察を行った。その結果，頭蓋骨欠損部位に移植した rhBMP-2 凍結乾燥体周囲に GFP 陽性の骨芽細胞が対照群と比較し多数観察された。しかし，GFP 陽性の骨芽細胞は大腿骨骨髓腔内に移植された BMP-2 凍結乾燥体周囲にほとんど観察されなかった。
- (4) 骨髓細胞が骨形成に与える影響を *in vivo* にて検討するため，歯科用リーマーにて骨髓を除去した大腿骨，骨髓細胞の再生を阻害するために他のマウス背部皮下に移植した大腿骨，または両処置を施行した大腿骨に rhBMP-2 凍結乾燥体を移植した。FCM 解析の結果，骨髓細胞数は両処置を施行した大腿骨にて最も減少していた。また，興味深い事に，骨髓内の骨髓細胞数が低下するに従い，骨髓腔内の骨形成が促された。
- (5) 骨髓細胞と共培養している C2C12-BRE 細胞および MC3T3-E1 細胞を，BMP-2 にて刺激した。その結果，BMP-2 誘導性のルシフェラーゼ活性は，骨髓細胞数に依存し有意に低下した。また，ALP の染色性も骨髓細胞と共培養することで低下した。また，骨髓を細胞成分と液成分に分離し共培養，または骨髓細胞をチャンバーを介して共培養し，同様の実験を行った。その結果，細胞が直接作用することで，BMP-2 誘導性骨芽細胞分化が抑制されていることが明らかとなった。また，末梢血から採取した細胞では，BMP-2 誘導性骨芽細胞分化は抑制されなかった。

以上より，本研究において，rhBMP-2 は骨髓環境内において骨形成を抑制すること，またその抑制制御メカニズムの一部が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Hara ES, Komori T, Akiyama K, Nguyen HTT, Aung KT, Pham HT, Tosa I, Takarada T, Matsuo K, Mizoguchi T, Oohashi T, Kuboki T. (2019) Bone marrow cells inhibit BMP-2-induced osteoblast activity in the marrow environment. *J Bone Miner Res.* 3, 327-332, doi: 10.1002/jbmr.3598, 2019 (査読有).

Komori T, Ono M, Hara ES, Ueda J, Nguyen HTT, Nguyen HT, Yonezawa T, Maeba T, Ono A, Takarada T, Momota R, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T, Type IV collagen 6 chain is a regulator of keratin 10 in keratinization of oral mucosal epithelium, Scientific Reports, 8, doi:10.1038/s41598-018-21000-0, 2018 (査読有).

〔学会発表〕(計 7 件)

Nguyen HT, Ono M. Bone regeneration therapy using E-coli derived recombinant human BMP-2 and novel function of BMP-2 in marrow environment. The First International Symposium on Immunology and Tissue Regeneration in Okayama / 12th URA International Symposium., 2018.

Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Komori T, Akiyama K, Oohashi T, Kuboki T. Marrow cells inhibits BMP-2-induced bone formation in the marrow. 第 48 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会, 2018.

Nguyen HT, Ono M, Oida Y, Hara ES, Komori T, Akiyama K, Nguyen HTT, Aung KT, Pham HT, Oohashi T, Kuboki T. Novel function of BMP-2 to prohibit bone formation in marrow environment. The American Society of Bone and Mineral Research. , 2018.

小盛大志, 大野充昭, 植田淳二, Nguyen Thi Thu Ha, 前川賢治, 大橋俊孝, 窪木拓男. 基底膜構成分子 Type IV collagen 6 は口腔粘膜上皮の角化を制御する. 第 127 回日本補綴歯科学会学術大会, 2018.

小盛大志, 大野充昭, 植田淳二, Nguyen Thi Thu Ha, 前川賢治, 窪木拓男. 口腔粘膜上皮の角化制御における Collagen 6 の役割. 第 48 回口腔インプラント学会学術大会, 2017.

T. Komori, J. Ueda, M. Ono, W. Sonoyama, ES. Hara, Y. Yoshioka, K. Maekawa and T. Kuboki: Regulation of gingival keratinization by laminin332. 95th General Session & Exhibition of the IADR, 2017.

植田淳二, 大野充昭, 小盛大志, 吉岡祐也, 園山 亘, 前川賢治, 窪木拓男. 口腔粘膜上皮における角化因子の探索. 第 125 回日本補綴歯科学会学術大会, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：窪木 拓男

ローマ字氏名：Kuboki Takuo

所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：00225195

研究分担者氏名：大島 正充
ローマ字氏名：OSHIMA Mamitsu
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00548307

研究分担者氏名：大野 彩
ローマ字氏名：Kimura-Ono Aya
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：20584626

研究分担者氏名：大橋 俊孝
ローマ字氏名：Oohashi Toshitaka
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：50194262

研究分担者氏名：渡辺 亮
ローマ字氏名：WATANABE Akira
所属研究機関名：京都大学
部局名：iPS細胞研究所
職名：特定拠点助教
研究者番号（8桁）：60506765

研究分担者氏名：秋山 謙太郎
ローマ字氏名：AKIYAMA Kentarou
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：70423291

(2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし
ローマ字氏名：該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。