

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19592078
研究課題名 (和文) 骨トランスポート法による頭蓋骨欠損の再建新生骨に発現する BMP の局在と経時変化
研究課題名 (英文) Immunohistochemical Expression of Bone Morphogenetic Protein during Reconstruction of Skull Defect by Transport Distraction Osteogenesis
研究代表者 本多 孝之 (HONDA TAKAYUKI) 岩手医科大学・医学部・助教 研究者番号：30275549

研究成果の概要：

本研究では頭蓋骨の骨トランスポート法による再建新生骨における BMP-2、-4、-7 の発現部位と時間的な発現量の変化を明らかにすることを目的としてウサギでの実験を行った。BMP は当初延長により移動した骨断端に現れる骨芽細胞に陽性となり、徐々にその数が増加した。また、その 2 週間後より延長部の線維組織内に現れる紡錘形細胞に陽性細胞が現れ、骨化の進行とともに陽性細胞が増加した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学、骨トランスポート法、BMP

1. 研究開始当初の背景

頭蓋骨欠損の再建には人工物、自家骨を利用した再建方法が現在一般的である。しかし、特に大きな欠損を再建しようとする場合、自家骨の採取には限りがあることから、人工物による再建に頼らざるを得ない。

骨延長法は骨切りした 2 つの骨の間隙を徐々に拡大することによりその間隙に骨新生を促す方法である。骨延長法の手技は 1950

年代に Illizalov らにより四肢の長管骨で一般化され、広く用いられており、頭蓋顎顔面外科領域では 1992 年の McCarthy らの下顎骨低形成への臨床応用以来、画期的な方法として導入され、急速に普及している。現在では上顎や頭蓋骨の変形治療に応用されるようになってきた。しかしその骨形成機序に関しては未だ完全には解明されていない。

骨トランスポート法は骨延長法の応用で、欠損した骨の再建を延長部に形成される新

生骨で賄おうとする方法である。欠損の再建を自家骨で donor site の犠牲なしに行うことができる点で画期的な方法である。現在、長管骨や下顎骨への応用例は報告されているが、未だ頭蓋骨に対しては外固定式 device を用いたいくつかの実験的研究があるのみである。我々は過去の研究で内固定型骨延長装置による骨トランスポート法によりウサギの頭蓋骨再建が可能であることを示した。

Bone Morphologic Protein (以下 BMP) は 1965 年に Urist がその存在を提唱し、1980 年代に分離・精製された蛋白で正常骨芽細胞系細胞によって産生・分泌される。現在、BMP-2 から 15 までの 14 種類が同定されこのうち BMP-2, -4, -6, -7, -9 が骨形成促進作用を有することが知られている。

下顎骨における骨延長中の BMP 発現に関しては Campisi らが 2002 年にウサギで報告したのをはじめとして、ブタ、ラットなどでの実験報告が近年まで各種報告されている。

従来、ウサギ下顎骨の骨延長における BMP の発現については各種の研究報告がみられるが、頭蓋骨での骨トランスポート法における実験的研究の報告はみられない。

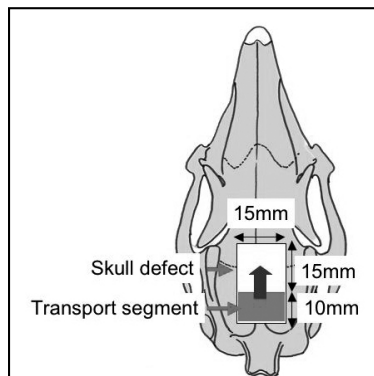
2. 研究の目的

本研究ではウサギ頭蓋骨の骨トランスポート法における再建において新生骨の BMP 発現部位と時間的な発現量の変化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウサギ頭蓋骨欠損に対する内固定型延長装置を用いた骨トランスポート法による再建法

体重およそ 3kg の成熟した日本白色家兎を使用し、ネブタール静脈内投与による全身麻酔下に頭蓋骨に 15x15mm の骨欠損を作成する。この欠損に対して骨欠損後方に 10x15mm の骨切りを行い、これをトランスポート骨片として内固定型骨延長装置 (TRACK 1.5mm, Martin 社製) を装着する。術後 3 日間の latency period をおき、以後 0.5mm/日 でトランスポート骨片を骨欠損方向へ移動する (30 日間)。4 週間の consolidation period により骨欠損の修復が完了する。



(2) 再建新生骨に対する BMP (Bone morphologic protein) の免疫染色

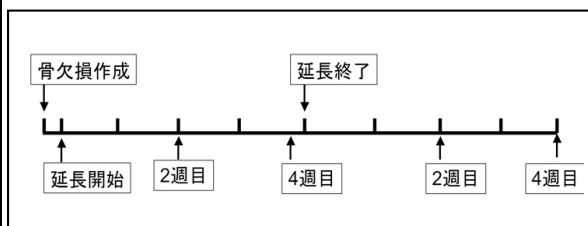
骨延長開始後 2、4 週目、延長終了後 2、4 週目でそれぞれ 2 匹ずつネブタールの過剰投与により屠殺し、再建頭蓋骨をし、それぞれ BMP-2, -4, -7 による免疫染色を行う。

摘出した頭蓋骨を 4% paraformaldehyde で固定。その後脱灰処理し paraffin 包埋する。標本は骨の延長方向に沿って切り出しを行い、切片を作成する。

切片を BMP-2, -4, -7 に対する一次抗体 (goat polyclonal IgG, 1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology Inc.) にて incubate し、ABC 法にて免疫染色を行い、最後に hematoxylin で対比染色する。なお、Santa Cruz Biotechnology Inc. の goat polyclonal IgG は、ウサギの BMP に反応することが過去の報告により示されている。

染色した標本において新生骨のうち新生仮骨、線維性中間層の 2 部分においてそれぞれ骨芽細胞、軟骨様細胞、線維芽細胞様細胞それぞれにおいて BMP の発現を部位別、細胞形態別の発現を経時的な変化とともに観察する。

なお、骨欠損のみ作成した個体をコントロールとし、同様の染色、分析を行う。



4. 研究成果

(1) 免疫染色の結果

- ① 【BMP-2】延長開始2週目より骨断端部に陽性細胞がみられるようになった。延長開始4週目になると新生骨周囲に陽性の骨芽細胞が多くみられるようになった。延長終了後2週目では骨延長部の線維組織内の陽性細胞が目立つようになり、延長終了後4週目ではさらに線維組織内の陽性細胞が目立つようになった。この頃には新生骨は成熟してきており、周辺の骨芽細胞は少なくなった。
- ② 【BMP-4】延長開始4週目頃より骨断端部の陽性細胞がみられるようになった。延長終了後2週目で新生骨周囲の陽性骨芽細胞がみられるようになり、骨延長部の線維組織内にもまばらに陽性細胞がみられるようになった。延長終了後4週目では新生骨周囲の陽性細胞が増加し、線維組織内の陽性細胞も多くみられるようになった。
- ③ 【BMP-7】延長開始後4週目で新生骨周囲に陽性の骨芽細胞が多くみられるようになった。延長終了後2週目で陽性骨芽細胞のほか、骨延長部の線維組織内に陽性細胞がまばらに観察されるようになった。延長終了後4週目では骨の成熟とともに陽性骨芽細胞は少なくなり、線維組織内の陽性細胞が増加した。
- ④ BMP-2, -4, -7いずれにおいても新生骨下に硬膜と連続する線維性組織においては陽性の細胞がみられなかった。

【骨断端部の陽性細胞】

	延長開始後 2週	延長開始後 4週	延長終了後 2週	延長終了後 4週
BMP-2	+	++	+	-
BMP-4	-	+	++	+
BMP-7	-	+	++	+

【骨間隙部にみられる線維組織の陽性細胞】

	延長開始後 2週	延長開始後 4週	延長終了後 2週	延長終了後 4週
BMP-2	-	-	+	++
BMP-4	-	-	+	++
BMP-7	-	-	+	++

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

① BMPの発現部位

BMPはいずれの subtype においても骨断端部や延長による間隙内の線維組織内に発現し、新生骨を取り囲むように発現した。骨形成の旺盛な部位にBMPが先行して発現している

② BMP発現の時間的経過

BMP-2 および-7 においては延長終了後4週目頃より新生骨周囲の陽性細胞が多くみられるようになり、BMP-4ではそれよりやや遅れて延長終了後2週目頃より陽性細胞が目立つようになった。一方、骨延長間隙における線維組織内の陽性細胞はいずれの subtype も延長終了後2週目頃より陽性細胞がみられるようになり、延長終了後4週目でさらに多く発現がみられた。

③ 国内外における位置づけ

今回のわれわれの実験結果は過去のウサギ脛骨¹⁾、下顎骨²⁾における骨延長中のBMP発現の報告と比較し、似た傾向を示した。従ってトランスポート法による骨再建においても基本的なBMPの発現部位や時間的経過は当初骨断端部において発現が始まり、その後骨間隙にみられる線維組織内で起こると考えられる。

また、従来われわれの実験において骨延長により得られた新生骨の下床には硬膜と連続する線維組織が存在していることを示したが、この組織にはBMPの発現はみられず骨形成能は存在しないと考えられた。

1) Rauch F, Lauzier D, Croteau R et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. Bone 27: 453-459, 2000

2) Campisi P, Hamdy RC, Lauzier D. et al. Expression of bone morphologic proteins during mandibular distraction osteogenesis. Plast Reconstr Surg 111: 201-208, 2003

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 孝之 (HONDA TAKAYUKI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：30275549

(2) 研究分担者

宇月 美和 (UDUKI MIWA)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：50305992

(3) 連携研究者

小林 誠一郎 (KOBAYASHI SEIICHIRO)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：00295966