

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19570197

研究課題名（和文） マウス四肢切断部でのBMPによる骨形成誘導

研究課題名（英文） Induction of bone formation with BMP in amputated mouse limbs

研究代表者 井出 宏之（IDE HIROYUKI）

東北大学・大学院生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：70022704

研究成果の概要：有尾両生類では切断された四肢の完全な再生が起こるのに対し、マウスなど哺乳類では四肢の再生はほとんど起こらない。指先の切断部で再生が見られるのと、より基部側の切断部で、軟骨の肥大が起こり、それが骨化するだけであった。本研究の結果、新生仔マウス四肢の切断後に新しく軟骨形成や骨化を起こすには **BMP-7** または **BMP-2** が必要で、これら **BMP** の濃度に依存して、骨パターンに類似の構造が形成されることが明らかになった。軟骨形成は切断部で広く起こり、急速に細胞塊を作り、骨化してゆくと考えられる。一方、**BMP** は主に切り株とは独立の構造を誘導し、これは軟骨形成を経て作られた。**BMP** の適当な濃度、キャリアー（徐放剤）を選択することによって、さらに他の成長因子を加えることによって、四肢の骨パターンに近いものが形成された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：四肢の再生、マウス、骨形成タンパク、骨パターン、繊維芽細胞成長因子

1. 研究開始当初の背景

イモリ、サンショウウオのような有尾両生類では、四肢をどのようなレベルで切断しても完全な再生が起こるのに対し、哺乳類や鳥類では四肢の再生はほとんど起こらない。たとえばマウスやヒトでは、指先で再生が見られるのみで、関節を越えての再生は起こらない。もしヒトで、有尾両生類でみられる完全な四肢再生を起こすことが出来れば、再生医

療の大きな進歩となる。このことを目指して、マウスを中心に哺乳類で多くの研究がなされてきたが、指先端部で再生が起こること、*Msx* 遺伝子の発現が指先の再生能に関係していること以外にマウスでの四肢再生の知見は少なく、研究はなかなか進まなかった。四肢の切断後、切断部が真皮に覆われて、再生に必要な傷上皮形成は起こらず、先端方向への伸長も進まず、まして軸に関連したパター

ン、分岐分節等はまったく見られなかった。

2. 研究の目的

発生再生を問わず、四肢のパターン形成にもっとも必要な組織は骨である。四肢では、骨は軟骨を経て作られる。そこで、骨形成を誘導するタンパク質、BMP をマウス四肢の切断部に入れることで新しく軟骨や骨を作る事を試みた。その結果、四肢切断後、BMP を含んだゼラチンゲルを、切断部に投与することによって、切り株と結合した、あるいは遊離した骨を作ることが出来た。これを足がかりにして、BMP 濃度、キャリアー、FGF 等、他の成長因子の同時投与などを主に新生仔マウスの四肢切断部に行なうことによって、四肢の基部—先端部軸、前後軸、背腹軸に沿ったパターンを作る、更に関節を作ることをめざして研究をいった。これらは成体マウスでの再生を目指し、さらに原理的には同様と考えられるヒトの事故や治療のために切断された四肢の再生を目指すものである。

3. 研究の方法

マウス新生仔を麻酔して、片側の前肢を、前腕部を中心にさまざまなレベルで切断し、切り株の内部の骨を一部除去することによって、BMP 等の細胞成長因子を作用させるための空間を作った。この空間は軟骨/骨形成のための空間にもなる。BMP 等の成長因子はさまざまな性質（酸性、塩基性、架橋度）を持ったゼラチンのゲルにしみこませて添加した。ゼラチンは、5%—20%の水溶液を45度で溶解後、直径2mmのアルミニウム管に入れ、0度で固化、棒で押し出すことによって、ゼラチンロッドとして得、乾燥後、切断して使用した。ゼラチン投与後、傷口を、フィブリンクロットで閉じ、仔マウスはそのまま母親に育てさせた。10日—20日後に、手術した側の四肢を切り出し、アルコール固定、除脂後に、アルシアンブルーで軟骨を、アリザリンレッドで骨を染色し、水酸化カリウム、グリセリン処理で透徹した。一部のサンプルはホルマリン固定、包埋して切片を作り、II型コラーゲン、オステオカルシン、インディアンヘジホッグ等の抗体を用いて、免疫染色を行った。

また骨形成を行う細胞をあきらかにするため、真皮をトリプシン、コラゲナーゼで分離し、分離細胞をフィブリンゲルに埋め込んで、四肢切断部に挿入した。5—7日後に、四肢を取り出して上記と同様の染色を行い、骨形成を調べた。

4. 研究成果

(1) マウス新生仔の四肢を前腕部で切断すると4,5日で切断部に軟骨の肥厚が起こり、

骨化する。肥厚は生後約10日で弱くなり、成体マウスでは起こらない。この前腕部レベルでは、先端部への伸長や再生はまったく起こらない。

(2) この切断部に BMP-7 を含むゼラチン塊を植えつくと、軟骨形成が起こりやがて骨化した。骨化の程度は添加された BMP 7 の量に依存した (図1)。

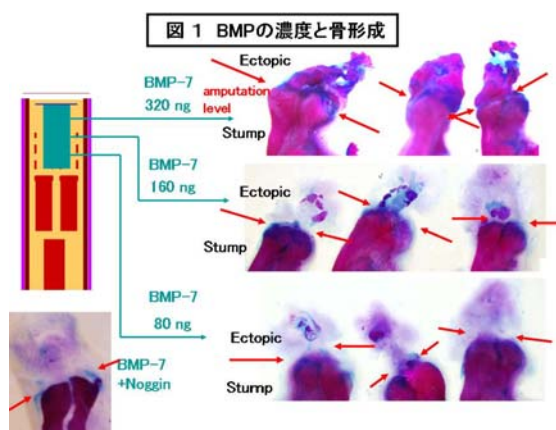


図1の説明 BMPの濃度と骨形成

BMP を多量に添加した場合は、骨パターンの形成が見られ、量の減少とともに、パターンは見えなくなった。また BMP 量が多い場合も BMP 阻害剤 Noggin を加えることによって、骨形成は抑えられた。

(3) 同様な骨形成誘導は BMP-2 を添加した際にも見られた。BMP-4 も骨形成に重要だが、誘導はみられなかった。

(4) 軟骨形成、骨形成は、II型コラーゲンの形成、インディアンヘジホッグの形成、オステオカルシンの形成によって、抗体染色で確認された。

(5) 形成された骨の切片を作って観察すると、骨の内部には赤血球が見られ、骨髄形成と考えられた。

(6) アルシアンブルー染色によって、軟骨形成を追跡すると、BMP 処理後3—4日で切断部全体で軟骨形成が始まり、7日ぐらいまでに、集まって軟骨部ができ、さらに骨化することが明らかになった。

(7) 骨形成は BMP 添加後、12—15日目にその大きさが最大となり、後に減少した。その後24日では骨片となっていたが、単なる骨の塊ではなく、明らかにパターン構造が

見られた。

(8) キャリアーとして用いたゼラチンの形状によって、骨形態は大きく変わった。ゼラチンは、グルタルアルデヒド処理で分子間架橋を作らせると、分解されにくくなり、少量の BMP を長期間放出できるようになる。このような高架橋度ゼラチンを作って、BMP を染み込ませて投与すると、軟骨形成、骨形成の活性は上昇するが、一方ゼラチンが分解され難いために、中心部に残り、パターン形成が阻害されるようになった。

(9) 成体マウスの前腕部を同様に切断し、BMP をゼラチンに染み込ませて添加した場合も、軟骨形成、骨形成が見られた。ただしパターンとしては不十分で、明確なパターンをみるにはより多量の BMP の添加が必要と考えられた。

(10) BMP 添加と同時に、GFP マウスの四肢真皮を移植すると、移植された GFP マウスの組織で骨化がみられ、真皮またはその中の細胞が骨化に参加したものと考えられた。しかし他の結合組織も骨化に参加した可能性はある。

(11) 手首、または掌部で前肢を切断し、とう骨、尺骨の先端半分を切り取り、できた空間へ、長いゼラチンロッドに BMP を染み込ませたものを移植すると、基部-先端部軸に沿った長い領域で軟骨形成、骨形成がみられた。切り株側と同様に、2本の骨が形成されたもの、先端部に小さな骨の塊を多数有するもの等、四肢のパターンを示唆する構造が見られた。

(12) 手首レベルで切断し、BMP-7 を加えると比較的小さな骨が出来るのに対し、前腕部を切断して加えると、とう骨、尺骨に似た大きな骨が形成された。これは基部-先端部軸に対応した骨形成が起こった事を示唆する(図2)。

図2 BMP添加箇所による骨パターンの変化

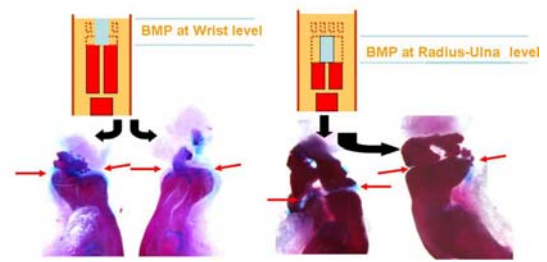


図2の説明 BMP の添加箇所による骨パターンの変化

BMP-7 を手首レベルに加えると小型の骨が形成されるのに対し、とう骨、尺骨レベルに加えるととう骨、尺骨に似た大型の骨が形成された。このことは、形成された骨が、間充織由来のものであるにもかかわらず、位置かを持っている可能性を示唆している。

(13) 基部-先端部軸方向の伸長は十分でなかった。そこで、この伸長に関係すると考えられる FGF-8 を添加して、切断部を先端部方向に伸長させ、そのあとで BMP-7 を加えた。その結果、先端方向への伸長と、伸長した部分での骨形成が見られたが、基部側では骨形成は起こらず、すでに BMP に対する反応能が失われていることが示唆された。BMP に対する反応能を維持しつつ、伸長させることが課題として残った。

(14) 形成された骨には間隔の空いたものもあり、形態的に関節に近いものも見られた。しかし、これらは染色の後で始めて観察されるもので、関節マーカーによる検出には至らなかった。

(15) 解離し、再凝集させた真皮細胞で、アリザリンレッド陽性の細胞が多数見られ、オステオカルシンにも陽性であった。しかしアルシアンブルー陰性で、II型コラーゲンの発現も弱いので、軟骨形成を経ない骨形成が起こっていると考えられる。

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) 全て査読あり。

①Tamura, K. Yonei-Tamura, S, Yano T., Ide,

__ The autopod: its formation during limb development. Develop. Growth Differ. 50, 177-187 (2008)

②Masaki, H., Ide, H. Regeneration potency of mouse limbs. Develop. Growth Differ. 49, 89-98 (2007)

③Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Sagai T., Shiroishi, T., Kobayashi, H., Sasaki, H., Ide, H., Tamura, K. Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. Develop. Biol. 312, 171-182 (2007)

[学会発表] (計 3件)

① Hiroyuki Ide BMP therapy. Regeneration of forearm (DARPA meeting, San Antonio, U.S.A. April 17, 2009)

②Hiroyuki Ide BMP and regeneration of forelimb elements (DARPA meeting, U.S.A., October 20, 2008)

③井出宏之、正木英樹、佐藤伸、薬師寺那由他 マウス四肢の再生能 日本動物学会 78回大会 (2007年9月25日)

[図書] (計 1件)

井出宏之 四肢のパターン形成 (発生 浅島誠、武田洋幸編) 培風館 157-188(2007)

[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

井出 宏之 (IDE HIROYUKI)

東北大学・大学院生命科学研究科・名誉教授

研究者番号:70022704

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者