

令和 4 年 6 月 15 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：2020～2021

課題番号：20K23110

研究課題名(和文) 光遺伝子操作技術を応用したBMP-2の新規機能・骨髄形成能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of bone marrow formation ability of BMP-2 by photogene manipulation technology

研究代表者

田仲 由希恵 (TANAKA, YUKIE)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20884836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨の主要な役割として、造血が知られている。しかし、rhBMP-2により形成された骨が造血器官として機能しているかは不明である。そこで本研究では、BMP-2誘導骨の細胞構成や造血機能を詳細に検討した。組織学的、フローサイトメトリー解析の結果、BMP-2誘導骨には、大腿骨と同様、類洞構造を有し、骨芽細胞や破骨細胞のみならず、造血幹細胞や様々なprogenitor細胞が存在していた。また、BMP-2異所性骨に存在する造血幹細胞は、造血機能を有していることを、骨髄移植実験にて確認した。以上の結果より、BMP-2は生理機能を有した骨髄を形成することが可能な蛋白質あることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BMP-2の強力な骨形成能は周知の事実であるが、骨髄形成能という新たな機能を見出し、そのメカニズムを解明する研究は世界的にも皆無であり、本研究は学術的独自性が非常に高いと考える。また、骨髄ニッチ形成細胞の一つであるCAR細胞がMSCとしての機能を持ち合わせており、MSC移植が免疫疾患治療として臨床応用されていることから考えると、CAR細胞の動員・誘導のメカニズムを明らかにすることは、骨免疫学と骨髄生物学を融合した新たなCAR細胞生物学やそれに基づく治療法を創造することに貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Hematopoiesis is known to be a major role of bone. However, it is unclear whether BMP-2-induced bone has functions as a hematopoietic organ. In this study, we investigated the details of cellular composition and hematopoietic function of BMP-2-induced bone. Histological and flow cytometric analysis revealed that BMP-2-induced bone had a sinusoidal structure similar to that of the femur and contained not only osteoblasts and osteoclasts but also hematopoietic stem cells and various progenitor cells. In addition, hematopoietic stem cells in BMP-2-induced bone were confirmed to have hematopoietic function by bone marrow transplantation experiments. These results indicate that BMP-2 is a protein that can form bone marrow with physiological functions.

研究分野：骨再生

キーワード：BMP-2 骨髄形成 細胞トラッキング技術 オプトジェネティク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

BMP-2 は強力な骨形成能を有していることから広く研究が進められており、すでに世界的に骨再生を目的とした臨床応用が開始されている。申請者の研究グループも、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 (BMP-2)を開発し、前臨床試験として、大型動物に対する BMP-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*, 2014)。一方、これらの研究の一環として行った実験で、「BMP-2 を長管骨の骨髓腔内に作用させた場合には、骨髓腔内に多数の骨髓細胞の増殖を認めるとともに、明らかな海綿骨や皮質骨の吸収を認め骨髓腔がいかにも拡大したかのような像が観察される」ことを世界で初めて発見した (*JBMR*, 2019)。今回申請者らは、この骨髓における BMP-2 の骨吸収作用と「BMP-2 により形成される異所性骨 (以下、BMP-2 誘導骨) の内部には、骨髓腔と類似した骨髓様空洞が形成され、骨髓細胞様の細胞で満たされるという事実を踏まえ、BMP-2 が骨芽細胞分化能に加えて、骨髓細胞増殖能や骨髓幹細胞ニッチ形成能を有しているのではないかという仮説を立て、以下の実験を実施してきた。

骨髓の最も主要な機能である造血機能は、造血幹細胞と CAR 細胞 (CXCL12 というケモカインを多く分泌する間葉系細胞) が造血幹細胞ニッチを形成することで営まれる。つまり、骨髓の形成・維持には CAR 細胞が必要不可欠である (*Nature*, 2014)。そこで、CAR 細胞が GFP (緑色蛍光タンパク質) にて可視化された *Cxcl12*-GFP マウスを用いて、BMP-2 誘導骨の内部に CAR 細胞を含む骨髓様組織が形成されるか検討し、CAR 細胞は、大腿骨や脛骨などの長管骨に多数存在するが、マウス背部皮下や顎骨には存在しない。また、抜歯窩創傷治癒過程において CAR 細胞は誘導されないことを確認した。

これらの結果は、BMP-2 が CAR 細胞を形態学的に内包した造血幹細胞ニッチを異所性に形成する可能性を強く裏付けるものである。しかし、BMP-2 投与により形成された異所性誘導骨に認められる CAR 細胞は正常な骨髓と同様に造血幹細胞ニッチの機能を有しているのか？、BMP-2 により誘導された異所性誘導骨に存在する CAR 細胞はどのようなメカニズムにより誘導されるのか (骨髓に存在する CAR 細胞が遠隔動員されたのか？、移植局所に存在する細胞が BMP-2 により CAR 細胞へ分化誘導されたのか？) は、未だ不明である。

2. 研究の目的

本申請研究では、BMP-2 による骨髓形成メカニズムを紐解き、それを逆手にとった骨髓内での骨再生研究へと繋げる。具体的には細胞トラッキング技術を応用し、BMP-2 誘導骨に形成される骨髓様組織が実際に造血機能を営んでいるかを立証する。さらに、BMP-2 による CAR 細胞の動員元を明らかにすることで、BMP-2 がどのようなメカニズムで CAR 細胞を制御し骨髓を形成するのかそのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) すべての動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認のもと実施した。骨髓ニッチ形成細胞であり骨髓間葉系幹細胞としても知られる *Cxcl12* Abundant Reticular cell (CAR 細胞) を可視化した *Cxcl12*-GFP マウスおよび野生型マウスの背部皮下に、BMP-2/ -TCP 複合体 (BMP-2 複合体) を移植した。4 週間後に形成された BMP-2 誘導骨を回収し、組織学的解析、フローサイトメトリー解析により、BMP-2 誘導骨に含まれる細胞構成を長管骨と比較した。

下に、抗体の組み合わせを示す。LSK (Lin^- , Sca1^+ , c-kit^+), multipotent progenitor (MPP: Lin^- , Sca1^+ , c-kit^+ , CD48^- , CD150^-), hematopoietic stem cell (HSC: Lin^- , Sca1^+ , c-kit^+ , CD48^- , CD150^+), common lymphoid progenitor (CLP: Lin^- , Sca1^{low} , $\text{c-kit}^{\text{low}}$, FLT3^+ , IL7Ra^+), common myeloid progenitor (CMP: Lin^- , $\text{Sca1}^{-/\text{low}}$, c-kit^+ , Fcgr^{low} , CD34^+),

granulocyte/monocyte progenitor (GMP: Lin⁻, Sca1⁻, c-kit⁺, FcgR⁺, CD34⁺), megakaryocyte/erythrocyte progenitor (MEP: Lin⁻, Sca1⁻, c-kit⁺, FcgR⁻, CD34⁺), B cells (B220⁺), PrePro B cells (B220⁺, IgM⁻, CD24⁻, CD43⁺), Pro B cells (B220⁺, IgM⁻, CD24⁺, CD43⁺), Pre B cells (B220⁺, IgM⁻, CD24⁺, CD43⁻), T cells (CD3⁺, CD45⁺), NK cells (NK1.1⁺, CD3⁻), Myeloid (CD11b⁺, Ly6G/C⁺) and Erythrocyte (Ter119⁺, CD45⁻).

(2) BMP-2誘導骨が造血機能を有しているかを検討するため、致死量の放射線照射を行った野生型マウスに全身GFPマウスで作製したBMP-2誘導骨由来細胞を経静脈移植し、生存分析を行った。

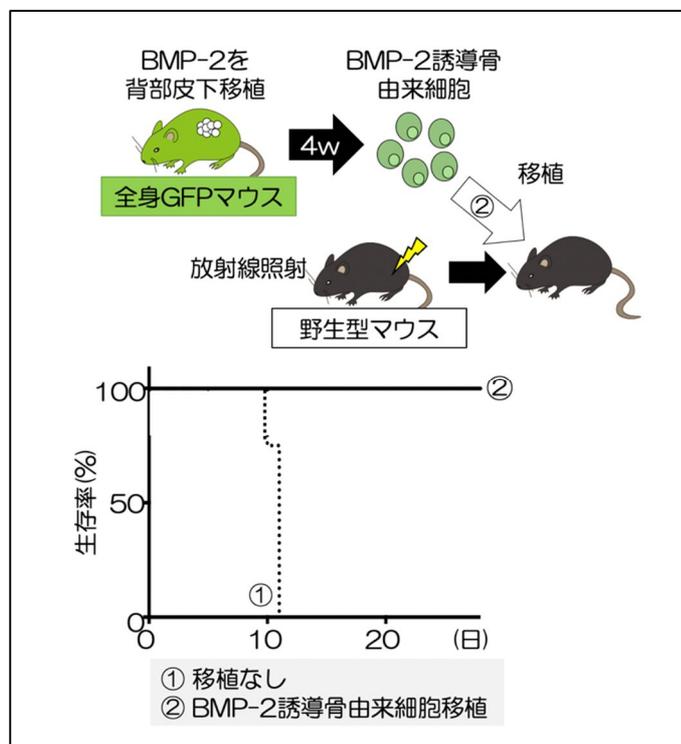
(3) BMP-2 誘導骨に含まれる CAR 細胞の起源を検討するため、パラバイオシス手術により *Cxcl12*-GFP マウスと血液循環を共有した野生型マウスの背部皮下に、BMP-2 複合体を移植した (遠隔動員モデル)。また、*Cxcl12*-GFP マウス脂肪組織から単離した *Cxcl12*-GFP 陰性間葉細胞を BMP-2 複合体と混和し、野生型マウスの背部皮下に移植した (局所分化モデル)。移植 2 週後に、それぞれの BMP-2 誘導骨について、GFP 陽性 CAR 細胞の有無を FCM にて解析した。

4. 研究成果

(1) 組織学的解析の結果、BMP-2 誘導骨は大腿骨同様、骨髓腔様の管腔構造を呈し、骨芽細胞、破骨細胞、骨膜、血管が存在することを確認した。また、フローサイトメトリー解析の結果、LSK, MPP, HSC, CLP, CMP, GMP, MEP, B cells, PrePro B cells, Pro B cells, Pre B cells, T cells, NK cells, Myeloid, Erythrocyte などの大腿骨骨髓内に存在する細胞が、BMP-2 誘導骨内にも存在することを確認した。

(2) 致死量の放射線照射したマウスは放射線照射11日目にはすべて死亡した。しかし、GFP陽性BMP-2誘導骨由来細胞を移植すると、これらのマウスはすべて生存できた。また、フローサイトメトリー解析を行った結果、ほぼすべての骨髓細胞はGFP陽性細胞に置換されていた (右図)。

以上の結果より、BMP-2誘導骨内には、造血機能を有した造血幹細胞が存在することが明らかとなった。



(3) パラバイオシス手術により *Cxcl12*-GFP マウスと血液循環を共有した野生型マウスの背部皮下に、BMP-2 複合体を移植した。その結果、BMP-2 誘導骨には GFP 陽性 CAR 細胞は観察されなかった。しかし、脂肪に存在する *Cxcl12*-GFP 陰性間葉細胞を BMP-2 複合体と混和し、野生型マウスの背部皮下に移植を行うと、BMP-2 誘導骨には GFP 陽性 CAR 細胞が多数観察された。以上の結果より、BMP-2 は、局所の間葉細胞を骨髓ニッチ形成細胞へと分化誘導することで、造血機能を有した骨・骨髓組織を形成することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Yukie, Aung Kyaw Thu, Ono Mitsuaki, Mikai Akihiro, Dang Anh Tuan, Hara Emilio Satoshi, Tosa Ikue, Ishibashi Kei, Ono-Kimura Aya, Nawachi Kumiko, Kuboki Takuo, Oohashi Toshitaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Suppression of Bone Necrosis around Tooth Extraction Socket in a MRONJ-like Mouse Model by E-rhBMP-2 Containing Artificial Bone Graft Administration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12823 ~ 12823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nosho Shuji, Ono Mitsuaki, Komori Taishi, Mikai Akihiro, Tosa Ikue, Ishibashi Kei, Tanaka Yukie, Kimura-Ono Aya, Hara Emilio S, Oohashi Toshitaka, Kuboki Takuo	4. 巻 66
2. 論文標題 Preclinical bioequivalence study of E.coli-derived rhBMP-2/ -TCP and autogenous bone in a canine guided-bone regeneration model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 124 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/jpr.JPR_D_20_00226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田仲由希恵, 三海晃弘, 大野充昭, 土佐郁恵, 納所秋二, 大野 彩, 窪木拓男, 大橋俊孝
2. 発表標題 MRONJ様病変誘発モデルマウスの抜歯窩へのE-rhBMP-2含有骨補填剤移植が抜歯窩周囲骨の骨壊死を抑制する.
3. 学会等名 第51回公益社団法人 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三海晃弘, 大野充昭, 土佐郁恵, 納所秋二, 大野 彩, 縄稚久美子, 田仲由希恵, 大橋俊孝, 窪木拓男
2. 発表標題 薬剤関連顎骨壊死様モデルマウスにおけるE-rhBMP-2の治療効果の検討.
3. 学会等名 令和3年度公益社団法人日本補綴歯科学会第130回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, 土佐郁恵, 石橋 啓, 三海晃弘, 田仲由希恵, 大野 彩, 小盛大志, 前川賢治, 大橋俊孝, 窪木拓男
2. 発表標題 骨髄細胞がBMP-2, FGF-2の骨形成能に与える影響の検討.
3. 学会等名 令和3年度公益社団法人日本補綴歯科学会第130回学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関