

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 8月27日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591954

研究課題名（和文）：自家骨移植による局所的骨再生メカニズムの解明

研究科題名（英文）：Local mechanism of new bone formation in bone grafting-interaction between cells in the graft and cells in host-

研究代表者 中村 博亮 (NAKAMURA HIROAKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60227931

研究成果の概要（和文）：GFP ラットと同系 wild-type ラット間で同系骨移植を行い骨形成メカニズムの検討を行った。移植骨（大腿骨 5mm 長）を液体窒素処理後に移植したものを対照群、無処置を実験群とした。実験群の移植骨内には異所性新生骨形成が認められたが対照群では認められず、蛍光免疫染色で骨芽細胞の由来は、移植後早期はドナー由来で、以降はほぼすべてホストの由来であった。Real time RT-PCR 法により BMP-4 の発現は実験群にのみ認められ、in situ hybridization 法では、移植後早期は移植骨内の細胞において、中期には移植骨内およびホスト由来の細胞ともに BMP-4 の発現が認められた。移植後早期には移植骨内の細胞が存在しないと異所性新生骨を作らないのみならず、周辺からの細胞の動員も生じないことが明らかになり、BMP による細胞動員が関与する可能性が示唆された。将来の合理的かつより有効な骨移植法開発へと発展させる手がかりになりうると考える。

研究成果の概要（英文）：Although autogenous bone grafting is currently available treatment, local mechanism of new bone formation has not been analyzed clearly. The aim of this study was to examine the relationship between cells in the graft and host for new bone formation. We used GFP transgenic rats and wild-type rats, and ectopic isograft model that harvested femur was transplanted into back muscles between these kinds of rats was established. Grafts were divided into two groups, without treatment (experimental group) and treated by liquid nitrogen (control group). Specimens were examined by immunohistochemistry for origin of osteoblast and osteoclast, real time RT-PCR, and in situ hybridization for temporal and spatial expression of BMP signaling. Ectopic new bone formation was found in the medullary canal at day 7 after grafting, and remodeling was followed in experimental group. No bone formation was found in control group. At day 7, osteoblasts were mainly originated from graft. Osteoblasts originated from host increased at day 14, and almost all of the osteoblasts were replaced by host at day 42. Transient increase of BMP-4, BMPRIA, 2, and noggin mRNA was found in experimental group, but only BMPRIA and 2 mRNA in control group. BMP-4 mRNA was expressed in graft cells at day 7 and in both graft and host cells at day 14. Collectively our results indicated the possibility for the first time that cells in graft induced host cells to bone formation by expressing BMP-4 mRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	1,000,000	4,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：自家骨移植、細胞の起源、Green Fluorescent Protein、骨形成蛋白、骨芽細胞、破骨細胞、新生骨

1. 研究開始当初の背景

自家骨移植は現在でも局所の骨形成促進のために広く行われている治療法である。しかし、自家移植骨後に移植骨に含まれる細胞の骨形成促進過程での役割については、1960年代に形態学的手法による古典的研究以後解明が途絶えている。当時は移植骨に含まれている赤色骨髄内に骨形成に関与する細胞が含まれていることがみとめられており、赤色骨髄を含む骨移植を推奨する根拠となっている。当時の研究技術の限界から、移植骨内の細胞が移植後に骨形成促進制御分子（例えば骨形成蛋白 [bone morphogenetic protein, BMP] や BMP 受容体, noggin など）の遺伝子発現亢進があるかどうかは不明である。そのような疑問への解答は現在の生命科学の研究技術が進歩によって可能となっていると思われる。それらを明らかにできれば臨床的には1) 脂肪骨髄を有する骨移植の妥当性、2) 移植骨での遺伝子発現制御分子導入による骨形成の促進法の開発、などが可能となると思われ、骨移植をより効率よく骨修復を行うことが可能であると考えられる。本研究の目的は現在の進んだ研究技術を応用して、自家骨移植部位での骨形成に関与する細胞(骨髄間葉系細胞、骨芽細胞、軟骨細胞など)の増殖分化に関わる分子生物学的変化や移植後の運命などについて検索して、骨移植部位での骨形成促進機序を解明するとともに、将来の合理的かつより有効な骨移植法開発へと発展させる手がかりを得ることである。

2. 研究の目的

自家骨移植は現在でも骨形成促進のために広く行われている治療法であるがそのメカニズムの詳細は不明である。1960年代に古典的な手法で、近年では Rosa 26A マウスを使用したモデルや性差を利用したモデルを利用して自家骨移植における骨形成メカニズムの解明が行われ、移植骨由来の細胞が異所性骨形成に貢献することは明らかにされたが、移植骨内の細胞が移植後に骨形成促進制御分子の遺伝子を発現するかどうかや、移

植骨に含まれる細胞による骨形成以外に移植母床の細胞が骨移植後の局所的骨形成へ関与しているかどうかの詳細は明らかではない。そこで、今回我々は移植骨による移植性骨形成メカニズムを解析するため、green fluorescent protein transgenic (GFP) ラットと同系の wild-type ラットの間で同系骨移植を行い異所性骨形成メカニズムの検討を行った。

3. 研究の方法

8週齢オスの GFP ラットと同系の wild-type ラットを使用した。大腿骨骨幹部を切除し 5mm の長さに採形し、相互の背筋筋膜下に移植した。これは GFP ラットから wild-type ラットへ、および wild-type ラットから GFP ラットへの両方の移植を行った。移植骨を液体窒素に浸した後に移植したものを対照群とし、移植骨になんら処置を行っていないものを実験群とした。移植後 1,4,7,14,21,32,42 日後に標本を採取し、固定および脱灰処置を行った後に、H-E、トルイジンブルー、TRAP 染色を用いて移植骨を観察した。新生骨の形成面積、および新生骨周囲の骨芽細胞数および破骨細胞数を骨形態計測法にて評価した。次に、GFP とオステオカルシン(Oc)と DAPI で3重に蛍光免疫染色を行い、新生骨を形成する Oc 陽性細胞(骨芽細胞)の由来を検討した。移植骨内の骨形成制御因子の発現量を検討するため、移植骨をホモジナイズし、real time reverse transcription polymerase chain reaction 法 (RT-PCR) を用いて経時的な BMP-4, BMPR1A, BMPR2, Noggin の発現の検討を行った。また骨形成制御因子発現の局在性を検討するため in situ hybridization 法 (ISH) を用い、BMP-4, BMPR1A, 2, Noggin の発現を検討した。

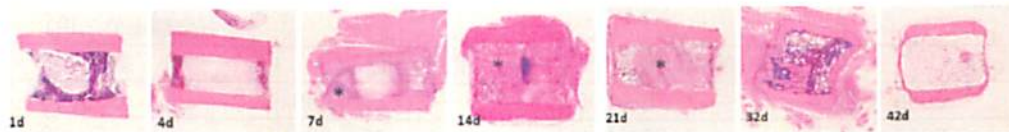


図1. 実験群における異所性同系骨移植の経過 (*: 新生骨)

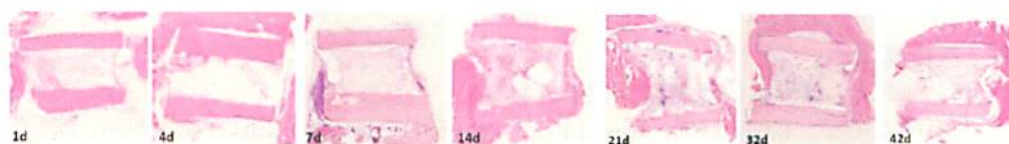


図2. 液体窒素処理を行った対照群における異所性同系骨移植の経過。新生骨の形成はない。

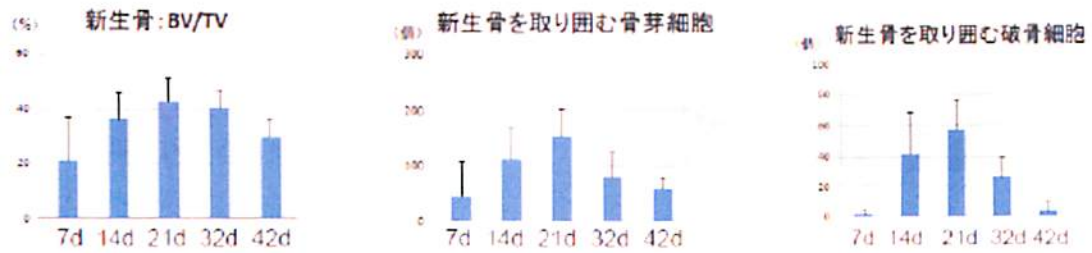


図 3

4. 研究成果

実験群の経過は GFP ラットから wild-type ラットへ、wild-type ラットから GFP ラットとも同様の経過をたどった。移植骨内には移植後 7 日より異所性の新生骨形成が認められた (図 1)。新生骨の形成部位は、移植骨両断端の内骨膜側に起こり、時間が経過するにつれて骨髄中央部へと進んでいった。移植後 32 日になると、移植骨両端は完全に新生骨で覆われるようになり、42 日後には移植骨が小さくなり、移植骨内部は脂肪髄に置換された。これに対し、対照群では移植後 14 日より周囲の筋肉組織が移植骨の骨髄に進入する様子が観察されたが、42 日後まで新生骨形成は

認められなかった (図 2)。骨形態計測法 (図 3) では、新生骨の面積は移植後 7 日目より起こり、21 日後をピークに縮小した。骨芽細胞数は新生骨形成面積と同様のパターンを示し、移植後 21 日目をピークに減少した。破骨細胞数は骨芽細胞数と同様の経過を示し、移植後 14 日目より過剰に出現しその後 21、32 日後をピークに減少していった。免疫染色による骨芽細胞の由来の検討においては、移植後 7、14 日目の新生骨周囲の骨芽細胞はドナー由来であり、21 日目以降はほぼすべての骨芽細胞はホストの由来であった (図 4)。また破骨細胞は、14 日目よりはほぼすべてがホスト由来であった (図 5)。

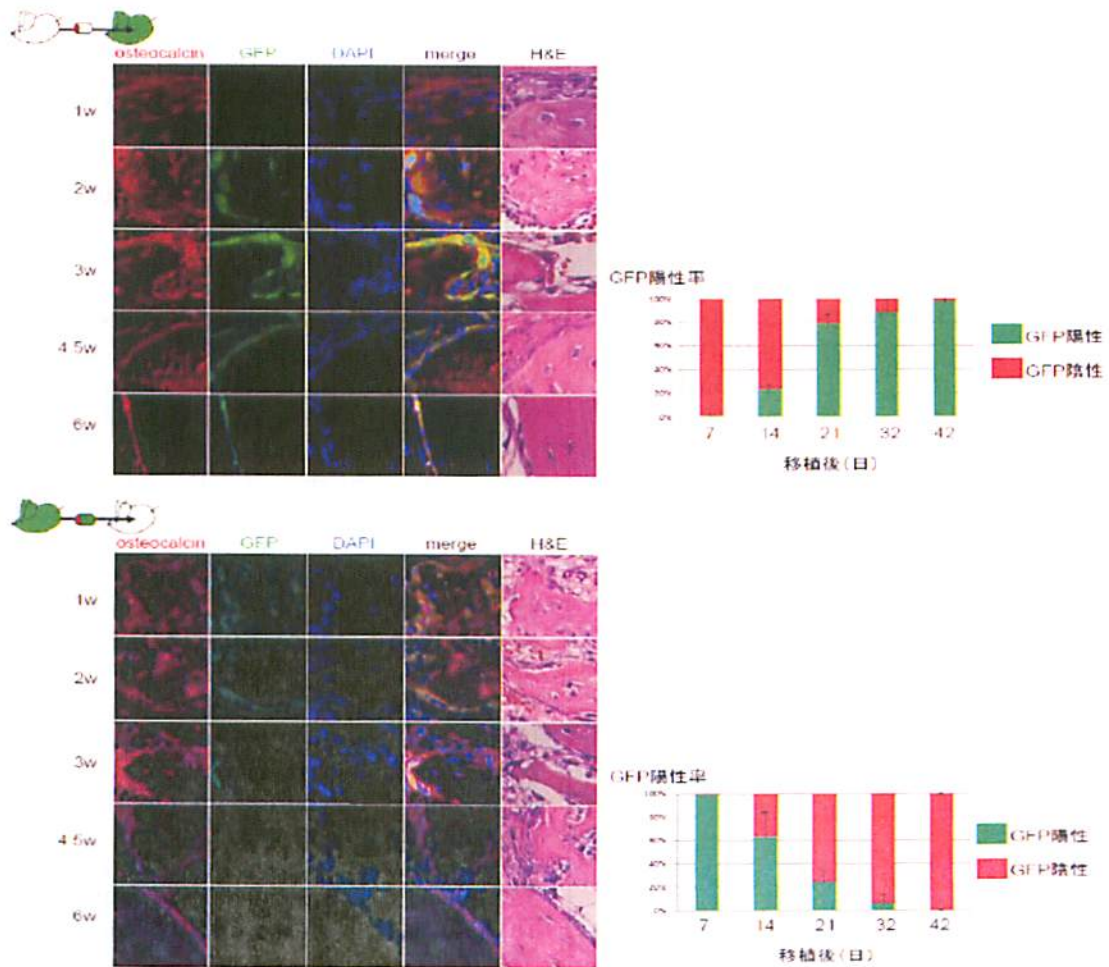


図 4



図 5

Real time RT-PCR 法を用いた骨形成制御因子の発現は、BMP-4 と Noggin の発現は実験群にのみ認められた (図 6)。それぞれ移植後 7 日目より 21 日目まで発現の亢進が認められた。それに対して、BMP-4 および BMP-2 は、実験群および対照群でともに一過性の発現亢進が認められた。ISH 法では、実験群では移植後 7 日目には移植骨内の細胞において BMP-4 の発現が認められ、14 日目には移植骨内の細胞および宿主由来の細胞ともに BMP-4 の発現が認められた (図 7)。それに対して対照群では BMP-4 の発現は認められなかった。移植骨に液体窒素処理を加えた対照群において移植骨内に新生骨形成が全期間を通じて認められなかったことより、移植後早期には移植骨内の細胞が存在しないと異所性新生骨を作らないのみならず、周辺からの細胞の動員も生じないことが明らかになった。本研究で移植骨内の細胞において移植後 7 日目に BMP-4 の発現が認められたにもかかわらず対照群では BMP-4 の発現が認められなかったことから、BMP による細胞動員が関与する可能性が示唆された。

以上本研究は、移植後早期は移植骨内の細胞が中心となり骨形成を担い、移植骨内の細胞が BMP-4 を発現することにより宿主からの細胞を動員することにより骨形成を推進するという自家骨移植部位での骨形成促進機序を解明した。今後、将来の合理的かつより有効な骨移植法開発へと発展させる手がかりになりうると考える。

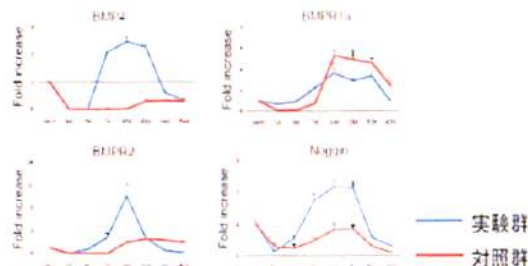


図 6

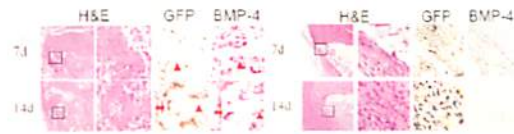


図 7 (左 : 実験群、右 : 対照群)

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 20 件)

① Radiographic Evaluation of Segmental Motion of Scoliotic Wedging Segment in Degenerative Lumbar Scoliosis. Yasuda H, Matsumura A, Terai H, Toyoda H, Suzuki A, Dozono S, Nakamura H. J Spinal Disord Tech. 2012 Feb 21. 査読あり

② Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Ikada Y, Nakamura H. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Mar 2;419(1):130-5. 査読あり

③ Asymmetric Degeneration of Paravertebral Muscles in Patients with Degenerative Lumbar Scoliosis. Shafaq N, Suzuki A, Matsumura A, Terai H, Toyoda H, Yasuda H, Ibrahim M, Nakamura H. Spine (Phila Pa 1976). 2012 Feb 8. 査読あり

④ Repair of critical long bone defects using frozen bone allografts coated with an rhBMP-2-retaining paste. Yasuda H, Yano K, Wakitani S, Matsumoto T, Nakamura H, Takaoka K. J Orthop Sci. 2012 Jan 21. 査読あり

⑤ Conventional or navigated total knee arthroplasty affects sagittal component alignment. Sugama R, Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Takaoka K, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012 Jan 20. 査読あり

⑥ Efficacy of interspinous process lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered with a synthetic polymer and β -tricalcium phosphate in a rabbit model. Matsumoto T, Toyoda H, Dohzono S, Yasuda H, Wakitani S, Nakamura H, Takaoka K. Eur Spine J. 2011 Dec 28. 査読あり

⑦ Prognostic factors for patients with solitary bone metastasis. Hoshi M,

Takada J, Ieguchi M, Takahashi S, Nakamura H. *Int J Clin Oncol*. 2011 Dec 17. 査読あり

⑧Gastrocnemius contracture caused by traumatic injury without fracture: a case report. Takigami J, Hashimoto Y, Yamasaki S, Hara Y, Nishikino S, Nakamura H. *Foot Ankle Int*. 2011 Dec;32(12):1152-4. 査読あり

⑨Prognostic Factors for Reduction of Activities of Daily Living Following Osteoporotic Vertebral Fractures. Matsumoto T, Hoshino M, Tsujio T, Terai H, Namikawa T, Matsumura A, Kato M, Toyoda H, Suzuki A, Takayama K, Takaoka K, Nakamura H. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Dec 12. 査読あり

⑩Partial laceration of the flexor tendon as an unusual cause of trigger finger. Okano T, Hidaka N, Nakamura H. *J Plast Surg Hand Surg*. 2011 Sep;45(4-5):248-51. 査読あり

⑪Mid-term clinical results of alumina medial pivot total knee arthroplasty. Iida T, Minoda Y, Kadoya Y, Matsui Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Nakamura H. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011 Nov 5. 査読あり

⑫Navigation-assisted surgery for bone and soft tissue tumors with bony extension. Ieguchi M, Hoshi M, Takada J, Hidaka N, Nakamura H. *Clin Orthop Relat Res*. 2012 Jan;470(1):275-83. 査読あり

⑬Prolonged airway obstruction after posterior occipitocervical fusion: a case report and literature review. Morita M, Nobuta M, Naruse H, Nakamura H. *Adv Orthop*. 2011;2011:791923. 査読あり

⑭A ganglion within the ulnar nerve and communication with the distal radioulnar joint via an articular branch: case report. Okada M, Sakaguchi K, Oebisu N, Takamatsu K, Nakamura H. *J Hand Surg Am*. 2011 Dec;36(12):2024-6. 査読あり

⑮Local delivery of siRNA using a biodegradable polymer application to enhance BMP-induced bone formation. Manaka T, Suzuki A, Takayama K, Imai Y, Nakamura H, Takaoka K. *Biomaterials*. 2011 Dec;32(36):9642-8. 査読あり

⑯Early biological fixation of porous implant coated with paste-retaining recombinant bone morphogenetic protein

2. Fukunaga K, Minoda Y, Iwakiri K, Iwaki H, Nakamura H, Takaoka K. *J Arthroplasty*. 2012 Jan;27(1):143-149.e1. 査読あり

⑰ ACL reconstruction using bone-tendon-bone graft engineered from the semitendinosus tendon by injection of recombinant BMP-2 in a rabbit model. Hashimoto Y, Naka Y, Fukunaga K, Nakamura H, Takaoka K. *J Orthop Res*. 2011 Dec;29(12):1923-30. 査読あり

⑱ Clinical outcomes of primary skin closure with Y-V and Z-plasties for Dupuytren's contracture: use of one-stage skin closure. Uemura T, Kazuki K, Egi T, Yoneda M, Takamatsu K, Nakamura H. *J Plast Surg Hand Surg*. 2010 Dec;44(6):306-10. 査読あり

⑲ Cellularity and cartilage matrix increased in hypertrophied ligamentum flavum: histopathological analysis focusing on the mechanical stress and bone morphogenetic protein signaling. Shafaq N, Suzuki A, Terai H, Wakitani S, Nakamura H. *J Spinal Disord Tech*. 2012 Apr;25(2):107-15. 査読あり

⑳ Characteristic radiographic or magnetic resonance images of fresh osteoporotic vertebral fractures predicting potential risk for nonunion: a prospective multicenter study. Tsujio T, Nakamura H, Terai H, Hoshino M, Namikawa T, Matsumura A, Kato M, Suzuki A, Takayama K, Fukushima W, Kondo K, Hirota Y, Takaoka K. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Jul 1;36(15):1229-35. 査読あり

[学会発表] (計4件)

① The prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) in the patients with spinal disorders. H Toyoda, H Terai, K Yamada, A Suzuki, S Dozono, T Matsumoto, H Yasuda, S Takahashi, K Tsukiyama, H Nakamura. International Society for the Study of the Lumbar Spine 39th Annual Meeting. 2011/6/14-6/18. Gurthenberg, Sweden.

② The prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) in the patients with spinal disorders. H Toyoda, H Terai, K Yamada, A Suzuki, S Dozono, T Matsumoto, H Yasuda, S Takahashi, K Tsukiyama, H Nakamura. The 8th Combined Congress of the Spine and Pediatric Sections, Asia Pacific Orthopaedic Association. 2011/6/1-6/4.

Gifu city. Japan.

③ Quantitative Assessment of Cervical Myelopathy by a Stabilometer. H Toyoda, Y Date, N Akamatsu, T Nakatsuchi, H Terai, A Suzuki, S Dozono, S Takahashi, H Nakamura. The 8th Combined Congress of the Spine and Pediatric Sections, Asia Pacific Orthopaedic Association. 2011/6/1-6/4. Gifu city. Japan.

④ The prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) in the patients with spinal disorders. H Toyoda, H Terai, K Yamada, A Suzuki, S Dozono, T Matsumoto, H Yasuda, S Takahashi, K Tsukiyama, H Nakamura. The 18th International Meeting on Advanced Spine Techniques. 2011/7/13-7/16. Copenhagen, Denmark.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 博亮 (Nakamura Hiroaki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60227931

(2) 研究分担者

寺井 秀富 (TERAI HIDETOMI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20382046
豊田 宏光 (TOYODA HIROMITSU)
大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号：50514238

(3) 連携研究者

矢野公一 (YANO KOICHI)
大阪労災病院・整形外科