

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890071

研究課題名（和文） BMP 2 の血管新生に対する役割の解明と BMP 2 産生細胞による新しい骨再生法の開発

研究課題名（英文） Investigation of the angiogenesis role by BMP2 and development of new method of osteogenesis by BMP2 producing cells

研究代表者

松原 秀憲 (MATSUBARA HIDENORI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10507057

研究成果の概要（和文）：

本実験では、血管内皮細胞・平滑筋細胞が骨延長において BMP2 を産生することを初めて示した。骨延長においては、まず周囲の軟部組織で血管新生がおきて、その血管で BMP2 が産生され、骨形成に働くことが示唆された。また骨形成においては、血管由来の BMP2、周囲軟部組織由来の PIGF が大きな役割を占めるのではないかとということも示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We firstly showed that vascular endothelial cells and vascular smooth muscle cells produce BMP2 during distraction osteogenesis. During distraction osteogenesis, angiogenesis occurs at soft tissues around bone at first, which cells produce BMP2. It could promote bone regeneration. And it is showed that BMP2 from vascular cells and PIGF from soft tissue play an important role in bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：医歯薬学・整形外科

キーワード：BMP2、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

日本では、昨今、早期退院、早期社会復帰が求められている。また現在、人類史に例をみないスピードで高齢化社会が進んでおり、今後ますます進むことが予測されている。そのため高齢者においても QOL の維持、向上がますます求められる事になるだろう。その事実、整形外科疾患においては高齢者で多い骨折などの疾患を、いかに早く合併症を少なく治癒させ、元の生活に戻すかが求められるということである。「いかに早く」これが

21 世紀整形外科治療の一番のテーマといっても過言ではない。今回の実験は、その一旦である「いかに早く骨をつくるか」である。現在、これらは再生医療という現代医学のトピックとも関連し、骨をいかに早く作るかということにおいて、世界中では様々な研究が行われている。

これまで骨折に対する骨形成促進法(骨の再生医療)として効果があると報告されている方法には、他の再生医療同様、cell(細胞)、carrier(担体)、protein(蛋白)が挙げられる

(Langer R, Science, 1993)。これら3つの要素は再生医療界では、「triangular concept」と呼ばれている。いずれにおいても、これらを骨折部に投与することで、ある程度の効果が報告されている。骨組織は他の組織と違い、再生医療の3要素加えて、mechanical stress(力学刺激)にも反応する点が特色である。骨の再生医療領域で大切なのは、triangular conceptではなく、それらに力学刺激を加えた「diamond concept」と呼ばれている(Einhorn TA, Injury, 2008)。

我が研究室でも数年来、骨の再生医療について研究を行ってきた。培養骨膜細胞(Tsubota S, J Bone Joint Sur[Br],1999)、bFGF(峰松康二,十全医学雑誌,2002)、超音波(Sakurakichi K, J Orthop Res, 2004)での骨の再生を証明した。次段階としてこれらのcombinationを調べるべく、HydroxiapatiteとBMP(Watanabe K, J Bone Joint Sur[Br],2006)のcombinationで骨の再生医療を示した。渡邊はまた同実験で、骨の再生には、血流も大切であるということを示し、我が教室では血流を加え、骨再生医療の「pentagon concept」と呼んでいる。私も血流、つまり血管新生を促す蛋白質として近年注目を浴びつつあるHepatocyte growth factor(HGF)に注目し骨折治癒を早める事が可能であることを証明した(Matsubara H, CORR, 2008)。

その後、海外特別研究員に採用いただき、2年間アメリカのボストン大学で骨再生の研究を行った。留学中は、骨再生治癒のkey proteinであり、強力な骨再生能力を有するBMP2に注目し研究を行った。BMP2-LacZ miceを使用し、BMP2を産生する細胞のcharacterizationを試みた。in vitroでは、骨誘導培地における骨髄幹細胞培養において、経時的にBMP2の産生細胞が増え、それらはmineralization中の細胞では産生されないことを証明した。つまり骨形成過程における細胞のみがBMP2を産生するというのである。In vivoの実験では、BMP2-LacZ miceを骨折させ、治癒過程において、どの細胞がBMP2を産生するかを調べた。結果は、骨膜周囲の細胞、軟骨細胞、そして注目すべきは血管内皮細胞においてBMP2の発現がみられた。

骨形成系のマーカーと信じられてきたBMP2だが、近年BMP2が腫瘍の血管新生や心血管疾患肺高血圧症にかかわっているという報告が相次いでいる。またBMP2が血管新生を促進するという論文も近年散見される(Perez VA, J Cell Biol,2011)(Teichert-Kuliszewska K, Circ Res, 2006)。このように、BMP2が血管新生と密接な関係があるという事実は、骨治癒においても血管新生が大きな役割を持っている

ことが示唆され、また血管内皮細胞においてBMP2の発現が見られた実験結果を強く裏付ける。この流れをくみ本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、血管新生と骨治癒過程の関係をBMP2の発現と絡めて、より明確に解明し、それらを骨治癒促進の治療に用いる事を目的とした。血管新生と骨形成の関係をより明確にみる事ができるマウス骨延長モデルを使用する(骨延長を行う事で、多くの血管新生が見られるため)。本研究では、in vitroでBMP2産生細胞のcharacterizationをflowcytometryにて行い、その結果を受けて、BMP2産生細胞を特異的にcell sortingし、in vivoで骨折部にそれらの細胞を投与することで、劇的に骨治癒を促進させることができるかも検討予定である。

3. 研究の方法

平成23年度: in vitro

(1)BMP2産生細胞のより詳細なcharacterization

①骨髄幹細胞培養 BMP-LacZ miceを使用する。マウスを屠殺後、両下肢を股関節で離断する。骨髄内をPBSでflushし骨髄細胞を採取し、 α -MEM培地で培養を行う。Day6より骨誘導培地に変換する。Day10, 16で細胞を採取し、flowcytometryでBMP2産生細胞をcharacterizationする。Mesenchymal Stem Cell, Endothelial Progenitor Cell, Hepatopoietic Progenitor Cellの抗体マーカーを用いてCharacterizationする。これはDDAOGという基質を加える事で、 β -galactosidaseをFACSで検出可能にする技術を使用する。DDAOG(λ ex 465nm λ em 608nm)+ β -galactosidase \rightarrow DDAO(λ ex 646nm λ em 659nm) (Tung CH, Cancer Res, 2004)。

(2)in vivo 骨治癒と血管新生との関係の検討

①骨延長モデルの作製

手術で、大腿外側に約2cmの皮切を行い、大腿骨を展開する。筋肉を骨膜をいためないように剥離後、歯科用創外固定器を遠位、近位それぞれ2本のワイヤーで固定する。骨軸と垂直に骨切りを行う。術後7日の待機期間の後、1日0.15mm \times 10日で延長を開始する(図3)。Time pointはday0(コントロール), 7(延長前), 10(延長開始3日後), 17(延長終了後), 20(延長終了3日後), 31(延長終了2週後)で屠殺し、組織標本、RNAの抽出、あるいは後述する血管造影法で骨・血流を評価する。

②組織評価

BMP2-LacZマウスを使用する。上述のtime

point で組織採取後、X-gal 染色を行い、どの細胞が BMP2 を産生しているのかを同定する。細胞の同定が困難な場合には、免疫染色で細胞の characterization を行う。予備実験より血管や骨関係細胞での産生が予期されるので、CD31、 α -SMA、LYVE1 などの抗体で、どの細胞が産生しているのかをより詳しく検討する。

③Realtime PCR

wild type マウスを使用する。上述の time point で延長部の骨、周囲筋肉の組織採取後、RNA を抽出し、Real time PCR で血管、骨マーカーRNA の発現を検討する。

④血管描出及び、uCT での評価

マウスを屠殺の後、開胸を行い、左心室より 23G の翼状針を挿入する。ホルマリンで還流固定の後、X 線描出可能な硬化剤を還流させる。uCT 撮影の後、EDTA 溶液で 2 週間脱灰を行う。再び uCT 撮影(血管だけが描出可能)。それら 2 つのデータをコンピューターのソフトウェア上で編集し、骨、血管を別の色で再構築させる。この技術はアメリカ留学中に獲得した技術で、独創性の高い世界で唯一の技術である

平成 24 年度 : in vivo

(1)BMP2 産生細胞投与による骨形成促進の検討

①骨折モデルの作製

マウス大腿骨に当科で開発した骨折装置を用い、骨幹部に横骨折を作成する。Isofluren で吸入麻酔を行う。膝関節を展開し、頸部より 23G 針を経髄的に挿入する。装置に大腿骨を固定し、220g のおもりを 195mm の高さより落下させ骨折を作成する。

②BMP2 産生細胞の採取

別のマウスより、屠殺後、骨髓細胞を採取し、前年度の実験で同定した BMP2 産生細胞を、抗体を用いて cell sorting machine で分離採取する。

③BMP2 産生細胞の投与

マウスを 4 群に分ける。①コントロールモデル群(この後何もしない)。②上記で分離した細胞を day2 に投与する群 ③day5 に投与する群 ④day 10 に投与群。術後 day5、10、15、20 で評価を行う。計 80 匹(4 群×20)。

④評価

組織、Real-time PCR、uCT、力学試験で評価を行う。治癒課程のどこがどう早くなったのかを評価する。

⑤統計 ANOVA 検定で real time PCR、uCT、力学強度試験の結果を評価する。

4. 研究成果

組織、レントゲンにおいて、マウス大腿骨でも骨延長が可能であることを確認した。Micro CT では、骨と血管の形成を 3D で別々

に描出可能であった。血管の形成は、周囲軟部組織でより旺盛であり、大血管、小血管の順序で形成されていた。BMP2 LacZ マウスを用いた骨延長では、術後 10 日に、gap 部の軟骨細胞の一部、gap に近い host 骨の表面に BMP2 陽性細胞が見られた。興味深い事に、gap 部およびその周囲軟部組織の血管に BMP2 陽性細胞が見られた。術後 20 日には、gap 部の骨細胞、軟骨細胞、周囲軟部組織を含め多くの血管において BMP2 陽性細胞が見られた。術後 31 日には、BMP2 陽性細胞は、劇的に減少し周囲軟部組織に一部陽性細胞を認めるのみであった。BMP2 陽性細胞は、大血管、中血管、毛細血管のどの大きさの血管においても認められた。また動脈、静脈のどちらにも BMP2 陽性細胞を認めた。BMP2 陽性細胞は、 α -SMA、CD31 でも陽性であり、LYVE1 は陰性であった。つまり、血管において BMP2 は、血管平滑筋、血管内皮細胞において産生されていた。リンパ管内皮では産生されていなかった。Real time PCR では、PIGF が延長仮骨内での発現の上昇を認めたが周囲軟部組織では発現の上昇は認めなかった。またリンパ系のマーカーの発現も認めなかった。

一方、骨髓幹細胞における BMP2 産生細胞の characterization の実験だが、flowcytometry はうまくいったが、DDAOG 基質を用いた実験がうまくいかず、characterization には至らなかった。そのため、BMP2 産生細胞を投与し、骨再生促進させるという実験は行う事ができなかった。うまくいかない原因を精査したが解明には至らなかった。今後再試験の機会が与えられれば引き続き行って行きたい。

本実験では、血管内皮細胞・平滑筋細胞が骨延長において BMP2 を産生することを初めて示した。これは新しく独創的であると考えられる。骨延長においては、まず周囲血管で BMP2 が産生され、骨形成に働くことが示唆された。また骨形成においては、血管由来の BMP2、周囲軟部組織由来の PIGF が大きな役割を占めるのではないかとということも示唆された。

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 2 件)

① Matsubara H, Hogan DE, Morgan EF, Mortlock DP, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. 査読有, 51, 2012, 1168-180

DOI: 10.1016/j.bone.2012.02.017.

〔学会発表〕（計 2 件）

①松原秀憲，マウス大腿骨骨延長モデルにおける Micro CT を用いた血管・骨描出法，日本整形外科学会基礎学術集会，2012 年 10 月 27 日，名古屋国際会議場（愛知県）

②松原秀憲，骨延長術における血管内皮細胞・血管平滑筋細胞による BMP2 の産生，日本整形外科学会基礎学術集会，2012 年 10 月 27 日，名古屋国際会議場（愛知県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 秀憲 (MATSUBARA HIDENORI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10507057

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし