

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792109

研究課題名(和文) BMP-2を用いた骨再生療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Bone Reconstruction treatment with BMP-2

研究代表者

舘 慶太(Keita, Tachi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90585671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Bone morphogenetic protein (BMP)は皮下や筋肉内に埋入すると異所性の骨化物を誘導する能力があり、骨の再建に有用と考えられてきた。しかし臨床的に必要な骨量を誘導するには活性が弱く大量のBMPを用いるため、申請者らはTransforming growth factor- β (TGF- β)がBMP-2の誘導した異所性の骨化物形成を強力に促進することを見いだした。BMP-2とTGF- β を同時添加したものはBMP-2単独と比較してDel-1の発現が低くなっていた。TGF- β の骨再生促進はDel-1の発現を抑え破骨細胞分化を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic bone formation. However, the detailed mechanisms of ectopic bone formation have not been fully understood. We examined the effects of TGF- β on bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic bone formation using a mouse experimental model. Del-1 mRNA expression levels in ectopic bone tissues at 5 days after implantation induced by BMP-2 + TGF- β was lower than that by BMP-2 alone. Enhancement of Bone formation by TGF- β was suggested that suppresses osteoclast differentiation via suppresses expression of Del-1.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨再生 BMP-2 TGF-BETA1 骨再生療法 骨芽細胞 破骨細胞 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

1) 歯科治療における骨増生の必要性

現在の歯科医療では歯科インプラント等が急速に発展し、治療プランも多彩になってきている。その反面、歯科治療の問題点も明確になってきており、その一つが骨再建技術である。歯周病等による骨吸収や骨欠損は歯科インプラント埋入や補綴治療を困難にする。このため現在はβTCP等の骨補填材で骨増生を試みているが生着が悪く、長期的な予後も十分な結果を残しているとはいえない。そのため、優れた骨再建技術の開発が望まれている。

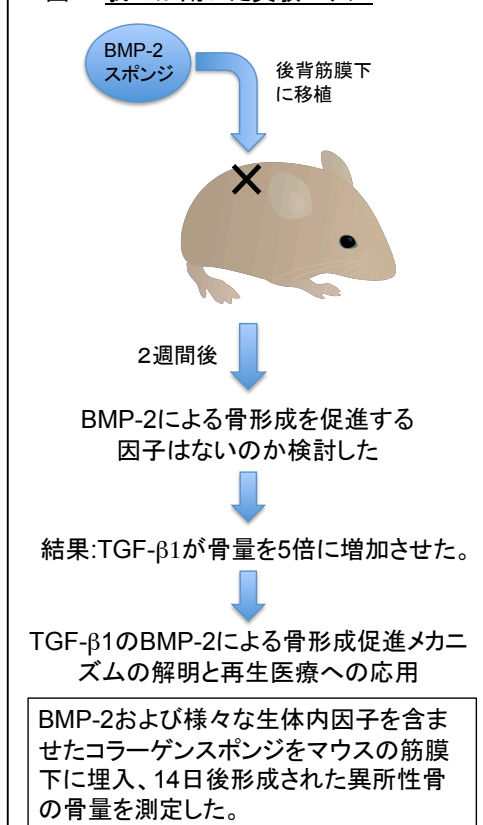
2) 再生医療における BMP の利用と問題点

Bone morphogenetic protein (BMP) は 1965 年 Urist により発見され [Urist, M. R. et al. *Science* 150(689):893-899 (1965)]、骨形成能を有しており、皮下や筋肉内に埋入することにより、異所性の骨化物を誘導する。このことから臨床で骨欠損の再建等に応用できると期待されてきた。しかし、実際に臨床応用した報告はあるが [Boden, S. D. et al. *Spine* 25(3):376-381 (2000)]、臨床的に必要な骨量を誘導するには、BMP の生体内活性が弱く大量の BMP を必要とするため、経済面や副作用等が臨床応用の障害になっている。したがって、BMP の作用を増強する因子を見いだすことができれば、これらの課題を克服できると考えられる。

3) 我々が見いだした解決策

その為、申請者らは独自の方法により BMP の骨形成作用を促進する因子を探索した。その結果 TGF-β1 が BMP-2 の骨形成を大きく促進することが明らかとなった。(図 1)

図1 我々が用いた実験モデル



2. 研究の目的

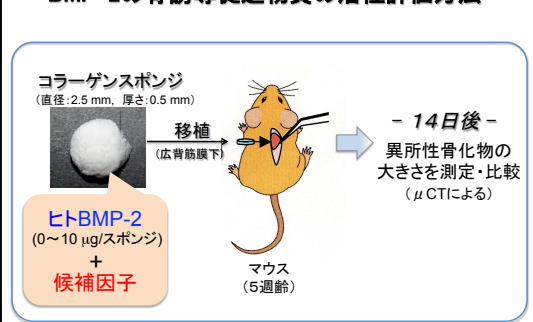
本研究の目的は TGF-β1 と BMP-2 を併用することにより BMP の生体内活性を高め、骨の欠損を再建する新しい治療を確立することである。

3. 研究の方法

1) 組織塊を構成する細胞の詳細な変化を検討する

BMP-2 や TGF-β1 を含ませたコラーゲンスポンジをマウスの後背筋膜下に埋入し、組織塊形成を時系列的に観察していき、各時期の組織塊の組織切片による組織解析、RT-PCR 法を用いた遺伝子解析等で構成細胞の種類や骨芽細胞や破骨細胞等の分化を検討する。

BMP-2の骨誘導促進物質の活性評価方法



2) Developmental endothelial locus-1(Del-1)と破骨細胞分化の関連性の検討

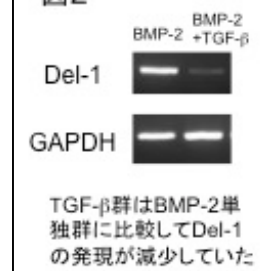
破骨細胞前駆細胞の RAW267.4 を用いて破骨細胞分化と Del-1 の発現の関連性を検討する。

4. 研究成果

1) 組織塊を構成する細胞の詳細な変化を検討する

BMP-2 や TGF-β1 をマウスの後背筋膜下に埋入し、組織塊形成を 1-7 日まで時系列的に観察していき、5 日目の組織塊の組織解析、遺伝子解析等で構成細胞の種類や分化を検討した。RT-PCR 法を用いて解析した結果、埋入 5 日目の遺伝子解析した結果、細胞外基質 Developmental endothelial locus-1(Del-1)の発現が確認された。しかし TGF-β1 を含ませた群の方は発現量が少なかった。(図 2)

図2



2) Del-1 と破骨細胞分化の関連性の検討

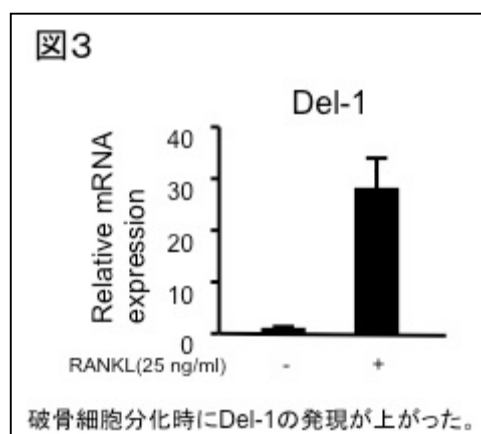
Del-1 は Hidai らによって 1998 年に発見され (C. Hidai et al., *Genes Dev.* 12, 21, 1998)、血管内皮細胞が産生する細胞外基質タンパクである。Del-1 の機能としては白血球表面の

接着分子 LFA-1(lymphocyte function-associated antigen) と血管内皮細胞の発現する ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)の結合を阻害する事によって白血球の血管外遊走を阻害する事で知られている。また胎児期の頭部形成にも関連しているという報告もあり注目されている。

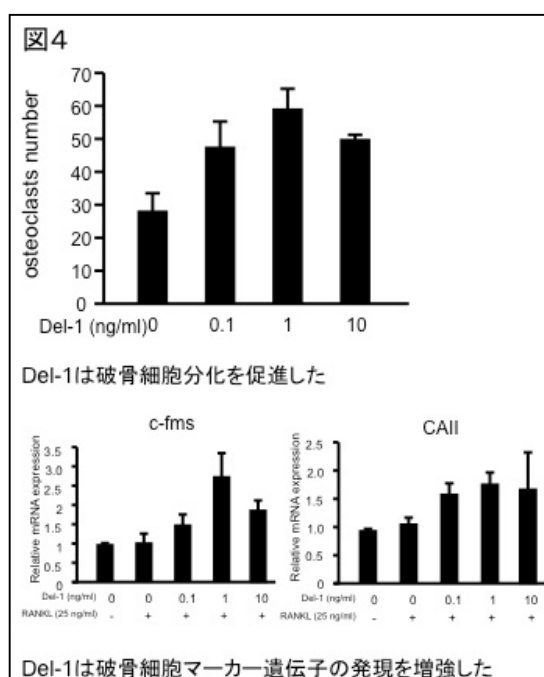
近年 Del-1 と加齢変化による歯周病の関連性を示す報告があった。しかし Del-1 と骨代謝との直接的な関わりは明らかにされていない。そこで我々は骨芽細胞と破骨細胞と Del-1 の関連性調べた。

骨芽細胞用細胞の MC 3T3 E1 細胞を Del-1 で 1,3,5 日刺激し、RT-PCR を行い骨芽細胞マーカーの発現を確認したが骨芽細胞分化には影響を及ぼさなかった。

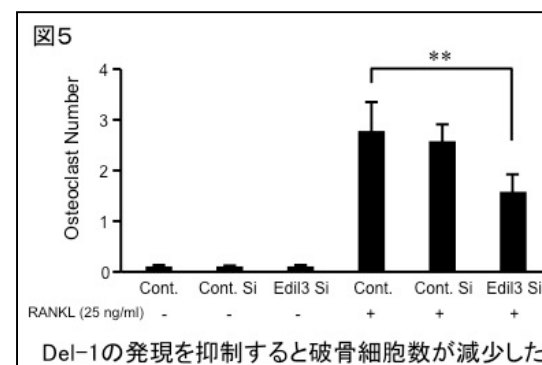
またマウスマクロファージ様破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を RANKL で刺激し、破骨細胞に分化させたところ、刺激前と比較して Del-1 の mRNA の発現が著しく上昇していた。(図 3)



そこで RAW264.7 細胞に RANKL で刺激すると同時に Del-1 を加えて刺激したところ、濃度依存的に破骨細胞形成を促進した。Del-1 で刺激した RAW264.7 細胞は破骨細胞分化マーカーも上昇していた。(図 4)



SiRNA によって Del-1 の発現を抑制した RAW 細胞に RANKL 刺激したところ破骨細胞数は減少していた(図 5)。



また Del-1 で刺激した RAW264.7 細胞は IL-17A の mRNA 発現が減少している事がわかり、Del-1 とともに IL-17A を加え破骨細胞分化させたところ Del-1 の破骨細胞分化促進作用が抑制された。IL-17A を破骨細胞前駆細胞に直接刺激すると破骨細胞分化を抑制するという報告がある。つまりこのことにより Del-1 の破骨細胞促進作用は IL-17A を抑制することによって破骨細胞分化を促進していることが示唆された。TGF- β の異所性骨形成促進作用はこれらの経路も関わっている可能性が示唆された。

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 1 件)

(1) Yamano S, Haku K, Yamanaka T, Dai J, Takayama T, Shohara R, Tachi K, Ishioka M, Hanatani S, Karunagaran S, Wada K, Moursi AM. The effect of a bioactive collagen membrane releasing PDGF or GDF-5 on bone regeneration. *Bioaterials*. (査読：有) 2014 Mar;35(8):2446-53.

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 松本光史, 舘 慶太, 馬場一美
骨形成誘導因子 BMP-2 の臨床応用を目的とした基礎的研究
第 44 回日本インプラント学会学術大会・抄録集, p257, 2014
(第 44 回日本インプラント学会学術大会, 東京, 2014 年 9 月)

(2) 松本光史, 高見正道, 舘慶太, 馬場一美, 上條竜太郎
TGF- β 1 と菌体が BMP-2 の異所性骨形成誘導作用に及ぼす影響
第 67 回日本口腔科学学会学術大会プログラム, 2013
(第 67 回 NPO 法人日本口腔科学学会学術大会, 宇都宮, 2013 年 5 月)

(3) Matsumoto A, Takami M, Tachi K, Baba K, Kamijo R:

Effects of TGF- β 1 and LPS on BMP-2-induced ectopic bone formation

Supplement to IBMS BoneKEy (IBMS-JSBMR 2013 Meeting abstract), volume 10 May 2013 p.s98,

(2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, Japan, 28 May- 1 June 2013)

(4) 松本光史, 高見正道, 舘 慶太, 上條竜太郎, 馬場一美

菌体成分が BMP-2 と TGF- β 1 が誘導する異所性骨形成に与える影響とそのメカニズム

公益社団法人日本補綴歯科学会創立 80 周年記念第 122 回学術大会抄録集, p45, 2013

(公益社団法人日本補綴歯科学会創立 80 周年記念第 122 回学術大会, 福岡, 2013 年, 5 月)

(5) 松本光史, 高見正道, 舘 慶太, 上條竜太郎, 馬場一美

菌体成分が BMP-2 の骨形成誘導活性に及ぼす影響とそのメカニズム

第 33 回昭和歯学会総会プログラム, p3, 2013

(第 33 回昭和歯学会総会, 東京, 2013 年, 7 月)

(6) Y. Oshima, F. Iwasa, S. Tanaka, K. Tachi, T. Miyauchi, K. Baba

Enhanced osteoblast function on hydrofluoric-acid treated Ce-TZP/Al₂O₃ nanocomposite

(15th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists , Turin Italy September 18-21,2013) 15th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists Conference Program P.122

〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘 慶太 (TACHI KEITA)

昭和大学・歯科補綴学教室・助教

研究者番号 : 90585671