

骨粗鬆症が BMP-2 の骨形成反応に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

【緒言】

これまで、様々な成長因子を歯周組織再生療法に応用する研究が行われてきている。なかでも、bone morphogenetic protein (BMP)-2 は骨芽細胞に対する強力な分化誘導作用や骨誘導能を有することが明らかになっており、歯槽骨の再生への有効性を示す研究報告がされている。しかし、主にその応用対象は健常動物である。最近になって糖尿病ラットに対する応用研究も報告されたが、骨粗鬆症への応用を目指した研究報告は全くない。

骨粗鬆症は骨密度測定器等の診断機器の普及により、骨折や腰痛等を発症していない無症状の患者についても診断できるようになり、現在、日本の総人口の 10% 弱にあたるおよそ 1000 万もの人が骨粗鬆症と診断され、自覚症状のない予備軍を含めると 2000 万人に達するとの調査報告がある。このことより、歯科治療を受ける患者の中にも骨粗鬆症患者が存在することが考えられるため、臨床応用に備えて骨粗鬆症における BMP-2 の作用を知ることは重要である。

Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) ノックアウトマウスは、破骨細胞形成抑制因子 OCIF を形成しないため、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる破骨細胞分化誘導因子 osteoclast differentiation factor (ODF) を阻害せず、破骨細胞の形成が無秩序に行われるように遺伝子制御されたマウスで、骨粗鬆症モデルとして広く用いられている。

本研究の目的は、BMP-2 による骨形成反応に骨粗鬆症が及ぼす影響を病理組織学的観察および組織計測によって明らかにすることである。

【材料と方法】

実験動物には、骨粗鬆症群として 5 週齢(メス、体重約 20g)の OCIF ノックアウトマウス/Jcl homo を 50 匹と、正常群として近親交配系マウス C57BL/6N を 50 匹用いた。BMP には、リコンビナントヒト BMP-2 を用い、担体には、アテロコラーゲンをを用いた。

移植手術は、マウスに全身麻酔を行った後、両眼上部を結ぶ線と頭蓋正中線部の交点を目安に BMP-2 を加えたアテロコラーゲン 1ml をツベルクリン用針付注射筒を用いて骨膜下へ注入を行った。BMP-2 配合量は両群ともに各々 0, 1, 5, 10, 15 μ g/ml とし、それぞれ配合量毎に 10 匹の合計 100 匹を用いた。

BMP-2 を注入したあと 5 週の観察期間終了後に、BMP-2 および担体を注入した部位を周辺組織を含めて摘出し、10% 緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定を行い、プランク-リクロ法で脱灰し、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、頭蓋正中部矢状断で厚さ 6 μ m の連続切片標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し、光学顕微鏡を用いて BMP-2 による骨形成反応を病理組織学的に観察した。組織計測は担体注入部の中央部付近の標本を 1 枚抽出し、画像をパーソナルコンピュータに取り込み画像

解析ソフト Scion Image を用いて、新生骨(骨梁・骨髄を含む、残存した担体は除外)量および骨密度について計測した。骨密度は、新生骨に占める骨梁および皮質骨の割合とした。なお、各計測値の統計学的有意差検定には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て同ガイドラインに従って行った。

【結果】

1. 臨床的観察

5 週の観察期間中、全ての骨粗鬆症群と正常群に異常を認めなかった。

2. 病理組織学的観察

BMP-2 濃度を 0 および $1 \mu\text{g/ml}$ で注入した場合、正常群および骨粗鬆症群において新生骨をほとんど認めなかった。移植した担体は既存骨上に境界明瞭に認められ、内部への細胞浸潤はわずかに認められる程度だった。既存骨の破壊は認めなかった。いずれの群でも炎症性細胞は認められなかった。

BMP-2 濃度が $5 \mu\text{g/ml}$ の場合、両群とも炎症性細胞は認めなかった。正常群においては新生骨を認めなかったが、骨粗鬆症群においては多くの新生骨を認めた。この大部分では既存骨との境界が連続しており、骨梁に乏しく骨髄組織が豊富な海綿骨を薄い皮質骨が取り囲んでいた。

BMP-2 濃度が 10 および $15 \mu\text{g/ml}$ の場合、正常群でも多くの新生骨を認めた。この新生骨は、骨梁が多く骨髄細胞が少ない海綿骨を厚い皮質骨が取り囲んでいた。骨粗鬆症群で認めた新生骨は、骨梁に乏しく骨髄組織が豊富な海綿骨を薄い皮質骨が取り囲んでいた。両群とも炎症性細胞は認められなかった。

3. 組織計測結果

1) 新生骨量

BMP-2 濃度が 0 および $1 \mu\text{g/ml}$ の場合、正常群・骨粗鬆症群ともにほとんど新生骨を認めなかった。 $5 \mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群は正常群と比較して有意に新生骨量が多かった($p<0.05$)。 $10 \mu\text{g/ml}$ の場合、有意な差は認められなかったが、骨粗鬆症群の方が多い傾向があった。 $15 \mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が有意に新生骨量は多かった($p<0.05$)。

2) 新生骨骨密度

BMP-2 濃度が 0 および $1 \mu\text{g/ml}$ の場合、新生骨量がほとんどないため骨密度に有意差を認めなかった。 $5 \mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が正常群と比較して骨密度は有意に低かった($p<0.05$)。 $10 \mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が骨密度は有意に低かった($p<0.01$)。 $15 \mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が骨密度は有意に低かった($p<0.05$)。

【考察】

BMP-2 による骨形成反応を組織計測によって検討したところ、骨粗鬆症群では正常群より低濃度で骨新生が認められ、そして同じ濃度の部位での比較では骨粗鬆症群が正常群より新生骨量が多かった。このような結果が生じた原因を考えると、骨芽細胞の質と数について差はないと推測されることから、BMP-2 による直接的な骨芽細胞の分化誘導作用の違いだけでは説明が困難である。BMP-2 は骨芽細胞を活性化させるだけでなく、破骨細胞の発現を活性化するという報告、破骨細胞を経由して間接的に骨芽細胞を活性化させるという報告があることから、本実験では、骨粗鬆症群において、OCIF ノックアウトによって破骨細胞が増加あるいは活性が高まっているために、BMP-2 による破骨細胞への作用が正常群に比較して大きく現れ、そして強まった破骨細胞からの刺激で骨芽細胞の作用も促進され、結果として骨量の増加が生じた可能性が考えられる。

また、骨粗鬆症群における新生骨の骨密度が正常群に比べ有意に小さかったこともこの推察と同じこと

を示唆していると考えられる。

本研究の結果から、骨粗鬆症患者に BMP-2 を応用することを考えると、骨新生は期待できるが骨の性状が疎になる可能性が考えられる。そのため、安易な骨粗鬆症患者への応用は難しいと考えられる。

【結論】

以上の結果より、骨粗鬆症では、BMP-2 によって新生骨量は増加するものの、骨密度の低い骨が形成されることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

骨粗鬆症が BMP-2 の骨形成反応に及ぼす影響

審査は、主査、副査全員が一堂に会して口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

これまで、様々な成長因子を歯周組織再生療法に応用する研究が行われてきている。なかでも、bone morphogenetic protein (BMP)-2 は骨芽細胞に対する強力な分化誘導作用や骨誘導能を有することが明らかになっており、健常動物について歯槽骨再生への有効性を示す研究報告がされている。最近になって糖尿病ラットに対する応用研究も報告されたが、骨粗鬆症への応用を目指した研究報告は全くない。

診断機器の普及により、日本の総人口の 10% 弱にあたる 1000 万人が骨粗鬆症と診断され、自覚症状のない人を含めると 2000 万人に達する。そのため、歯科治療受診者の中に骨粗鬆症患者が存在することが考えられるため、臨床応用に備えて骨粗鬆症における BMP-2 の作用を知ることは重要である。

Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) ノックアウトマウスは、破骨細胞形成抑制因子 OCIF を形成しないため、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる破骨細胞分化誘導因子を阻害せず、破骨細胞形成が無秩序に行われるように遺伝子制御されたマウスで、骨粗鬆症モデルとして広く用いられている。

本研究の目的は、BMP-2 による骨形成反応に骨粗鬆症が及ぼす影響を病理組織学的観察および組織計測によって明らかにすることである。

実験動物には、5 週齢の OCIF ノックアウトマウス(骨粗鬆症群)、近親交配系マウス(正常群)各 50 匹用いた。BMP にはリコンビナントヒト BMP-2 を用い、担体にはアテロコラーゲンをを用いた。

移植手術は、全身麻酔下にて、両眼上部を結ぶ線と頭蓋正中線部の交点を目安に BMP-2 を加えたアテロコラーゲン 1ml をツベルクリン用針付注射筒を用いて骨膜下へ注入を行った。BMP-2 配合量は両群ともに 0, 1, 5, 10, 15 μ g/ml とし、それぞれ 10 匹ずつ合計 100 匹を用いた。

5 週の観察期間終了後、被験部位を周辺組織を含めて摘出し、10% 緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定を行い、ブランク-リクロ法で脱灰し、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、頭蓋正中中部矢状断で厚さ 6 μ m の連続切片標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し、光学顕微鏡下で病理組織学的に観察した。組織計測は担体注入部の中央部付近の標本を 1 枚抽出し、画像解析ソフト Scion Image を用いて、新生骨量および骨密度について計測した。なお、各計測値の統計学的有意差検定には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て同ガイドラインに従って行った。

観察期間中、全ての骨粗鬆症群と正常群に異常を認めなかった。

BMP-2 濃度を 0 および $1\mu\text{g/ml}$ で注入した場合、正常群および骨粗鬆症群において新生骨をほとんど認めなかった。移植した担体は既存骨上に境界明瞭に認められ、内部への細胞浸潤はわずかに認められた。既存骨の破壊は認めなかった。いずれの群でも炎症性細胞は認められなかった。

$5\mu\text{g/ml}$ の場合、両群とも炎症性細胞は認めなかった。正常群においては新生骨を認めなかったが、骨粗鬆症群においては多くの新生骨を認めた。大部分は既存骨との境界が連続しており、骨梁に乏しく骨髓組織が豊富な海綿骨を薄い皮質骨が取り囲んでいた。

10 および $15\mu\text{g/ml}$ の場合、正常群でも多くの新生骨を認めた。この新生骨は、骨梁が多く骨髓細胞が少ない海綿骨を厚い皮質骨が取り囲んでいた。骨粗鬆症群で認めた新生骨は、骨梁に乏しく骨髓組織が豊富な海綿骨を薄い皮質骨が取り囲んでいた。両群とも炎症性細胞は認められなかった。

組織計測の結果では BMP-2 濃度が 0 および $1\mu\text{g/ml}$ の場合、正常群・骨粗鬆症群ともにほとんど新生骨を認めなかった。 $5\mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群は正常群と比較して有意に新生骨量が多かった ($p<0.05$)。10 $\mu\text{g/ml}$ の場合、有意な差は認められなかったが、骨粗鬆症群の方が多い傾向があった。15 $\mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が有意に新生骨量は多かった ($p<0.05$)。

骨密度については BMP-2 濃度が 0 および $1\mu\text{g/ml}$ の場合、新生骨量がほとんどないため有意差を認めなかった。 $5\mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が正常群と比較して骨密度は有意に低かった ($p<0.05$)。10 $\mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が骨密度は有意に低かった ($p<0.01$)。15 $\mu\text{g/ml}$ の場合、骨粗鬆症群の方が骨密度は有意に低かった ($p<0.05$)。

BMP-2 による骨形成反応を検討したところ、骨芽細胞の質と数について差はないと推測されることから、BMP-2 による直接的な骨芽細胞の分化誘導作用の違いだけでは説明が困難である。本実験では、骨粗鬆症群において、OCIF ノックアウトによって破骨細胞の活性が高まっているために、BMP-2 による破骨細胞への作用が正常群に比較して大きく現れ、そして強まった破骨細胞からの刺激で骨芽細胞の作用も促進され、結果として骨量増加が生じた可能性が考えられる。

また、骨粗鬆症群における新生骨骨密度が正常群に比べ有意に小さかったこともこの推察と同じことを示唆していると考えられる。

以上の結果より、骨粗鬆症では、BMP-2 によって新生骨量は増加するが骨密度の低い骨が形成されることが示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容および関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項として、

- 1) 骨粗鬆症における骨代謝について
- 2) OCIF ノックアウトマウスの性質について
- 3) 骨粗鬆症治療薬との併用で予想されることについて
- 4) 今後の展望について

などがあった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究は、骨粗鬆症では、BMP-2 によって新生骨量は増加するが骨密度の低い骨が形成されることを示し、今後の臨床研究へもつながる重要な指針を与えたことが評価された。

以上のことから、本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。