

氏名	納所 秋二
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6373号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Distinct Osteogenic Potentials of BMP-2 and FGF-2 in Extramedullary and Medullary Microenvironments (骨髄環境が BMP-2 および FGF-2 の骨形成能に与える影響の検討)
論文審査委員	久保田 聡 教授 上岡 寛 教授 岡田 正弘 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年, *Bone morphogenetic protein-2* (BMP-2)は欧米において骨再生療法の分野で臨床応用がなされている。また, 本邦において *Fibroblast growth factor-2* (FGF-2)が歯槽骨を含む歯周組織再生において臨床応用され始めた。このような臨床的背景から, 我々は BMP-2 と FGF-2 が骨形成に与える影響を検討してきた。そして, BMP-2 の骨形成作用が骨髄環境において抑制されるが, FGF-2 は骨髄内において海綿骨の骨形成が促進されることを過去に報告しており, これら両成長因子の作用は骨髄環境において異なる可能性が強く推測される。しかし, 骨髄組織が両成長因子の骨形成能に与える影響は未だ不明な点が多い。そこで本研究では, 骨髄の乏しい頭蓋骨と骨髄の豊富な大腿骨骨髄内における BMP-2 と FGF-2 の骨形成能を比較検討した。さらに, BMP-2 と FGF-2 が骨髄内に存在する細胞に及ぼす影響を詳細に検討した。

【方法】

大腸菌由来発現系 rhBMP-2 (オステオファーマ, BMP-2), rhFGF-2 (フィブラストスプレー, 科研製薬株式会社, FGF-2)を 30 μ L のアテロコラーゲン (IPC-50, 高研株式会社)と混合し, 凍結乾燥体を作製した。また, 対照群には蒸留水とアテロコラーゲンを用いて作製した凍結乾燥体を用いた。

- 1) 野生型マウスの頭蓋骨に作製した骨欠損部および大腿骨骨髄内に BMP-2 (10 μ g)および FGF-2 (1 μ g, 10 μ g)の凍結乾燥体をそれぞれ移植した。移植 14 日後に組織を回収し, micro-computed tomography (micro-CT)解析ならびにヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による組織学的解析を行った。
- 2) 野生型マウスの大腿骨, 骨髄を歯科用リーマーにて除去した大腿骨, 他のマウスの背部皮下へ移植した大腿骨, 骨髄を除去したのち他のマウスの背部皮下へ移植した大腿骨の骨髄内にそれぞれ FGF-2 (10 μ g)の凍結乾燥体を移植した。移植 14 日後に組織を回収し micro-CT 解析を行った。
- 3) 骨芽細胞・破骨細胞が可視化された *Col1a1-GFP/TRAP-tdTomato* マウスの頭蓋骨骨欠損部ならびに大腿骨骨髄内に BMP-2 (10 μ g)および FGF-2 (1 μ g, 10 μ g)の凍結乾燥体をそれぞれ移植した。移植 5, 14 日後に組織を回収し, 非脱灰凍結組織切片を作製し, 蛍光顕微鏡を用いて骨芽細胞と破骨細胞の動態を観察した。
- 4) 野生型マウスの頭蓋骨骨欠損部ならびに大腿骨骨髄中に BMP-2 (10 μ g)および FGF-2 (10 μ g)の凍結乾燥体をそれぞれ移植した。移植 5, 14 日後に組織を回収し凍結切片を作製し, エンドムチンに対する免

疫染色を行った。また、大腿骨骨髓中の CD31⁺/CD45⁻血管内皮細胞、造血幹細胞、Bリンパ球、Tリンパ球などの造血系細胞、レプチン受容体陽性間葉系幹細胞に対してフローサイトメトリー (FCM)解析を行った。

【結果】

- 1) micro-CT 解析および H-E 染色による組織学的解析の結果、骨髓組織の乏しい頭蓋骨において、BMP-2 移植群は、対照群と比較し有意に骨形成が促進されたが (One-way ANOVA/Turkey, $p < 0.05$), FGF-2 移植群は対照群と同様に骨形成は認められなかった。一方、大腿骨骨髓内では BMP-2 による有意な骨形成の抑制と FGF-2 による有意な骨形成の促進を認めた (One-way ANOVA/Turkey, $p < 0.05$)。
- 2) 骨髓除去、および、他のマウスへの背部皮下に移植した大腿骨に FGF-2 を移植した結果、骨髓細胞数の減少に伴い、FGF-2 誘導性の骨形成は有意に抑制された (One-way ANOVA/Turkey, $p < 0.001$)。
- 3) 頭蓋骨において、BMP-2 移植により COL1A1 陽性骨芽細胞数の増加と骨組織の形成に伴う TRAP 陽性破骨細胞数の増加を認めた。しかし、対照群および FGF-2 移植群では COL1A1 陽性骨芽細胞と TRAP 陽性破骨細胞はほとんど観察されなかった。一方、大腿骨骨髓内において、BMP-2 移植部位周囲に TRAP 陽性破骨細胞数の増加を認めたが、FGF-2 移植部位周囲では COL1A1 陽性骨芽細胞数の増加と骨組織の形成に伴う TRAP 陽性破骨細胞数の増加を認めた。
- 4) 頭蓋骨骨欠損部および大腿骨骨髓内において、BMP-2 移植群および FGF-2 移植群は、対象群と比較し、エンドムチン陽性の血管の数に有意な差は認められなかった。また、大腿骨中の骨髓組織に対する FCM 解析の結果、BMP-2 移植群および FGF-2 移植群は、対照群と比較し、全骨髓細胞数や CD31⁺/CD45⁻血管内皮細胞、造血幹細胞、Bリンパ球、Tリンパ球などの造血系細胞およびレプチン受容体陽性間葉系幹細胞の生細胞数に著明な差は認められなかった (One-way ANOVA/Turkey)。

【結論】

頭蓋骨などの骨髓が乏しい環境下において、BMP-2 は骨芽細胞分化を誘導し、骨形成が促進するが、FGF-2 は骨芽細胞および破骨細胞の分化に影響を与えず、骨形成も促進しないことが明らかとなった。一方、骨髓内などの骨髓が豊富な環境下において、BMP-2 は破骨細胞分化を誘導することで骨吸収を促すが、逆に、FGF-2 は骨芽細胞分化を誘導することで、骨形成を促すことが明らかとなった。以上より、骨再生を目的に BMP-2 や FGF-2 を応用する際、移植部位の骨髓の存在を考慮する必要がある事が示唆された。

論文審査結果の要旨

近年、Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は欧米において骨再生療法で臨床応用されている。また、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) は本邦において歯槽骨を含む歯周組織再生のために臨床応用され始めた。このような背景から学位申請者らのグループは各成長因子が骨形成に与える影響を検討し、BMP-2 は骨髄内で骨形成を抑制すること、および、FGF-2 は骨髄内で海綿骨形成を促進することをそれぞれ報告した。これらは各成長因子の骨形成作用に骨髄が深く影響することを示唆するが、骨髄環境下で各成長因子の骨形成能を比較検討した研究はない。そこで本論文では、骨髄の乏しい頭蓋骨あるいは骨髄の豊富な大腿骨骨髄内に各成長因子を含むゲルを埋植し、各骨形成能を同条件で比較した。さらに、各成長因子が骨髄中に存在する各細胞に及ぼす影響を検討した。

研究結果は、以下の内容であった。

- 野生型マウスおよび *Coll1⁺-GFP/TRAP-tdTomato* マウスにおいて頭蓋骨あるいは大腿骨に骨欠損を作製し、大腸菌による発現系で生産した recombinant human BMP-2 (BMP-2) あるいは FGF-2 (FGF-2) を含むアテロコラーゲンを充填した。その結果、頭蓋骨においては、BMP-2 によって骨芽細胞数が増加して骨形成は促進されたが、FGF-2 によって骨形成は促進されなかった。大腿骨骨髄腔内においては、BMP-2 によって破骨細胞数が増加して骨形成は抑制されたが、FGF-2 によって骨芽細胞数が増加して骨形成は促進された。
- 骨髄細胞が骨形成に及ぼす影響を検討するため、野生型マウスにおいて、(a) 正常な大腿骨（対照群）、(b) 骨髄を除去した大腿骨、(c) 他家マウス背部皮下へ移植した正常な大腿骨、(d) 骨髄を除去したのち他家マウス背部皮下へ移植した大腿骨の各骨欠損部に FGF-2 を投与した。その結果、(c)、(d)において、FGF-2 誘導性の骨形成は有意に抑制された。
- 免疫組織学的解析の結果、埋植 5, 14 日目において各成長因子の投与部位周囲における血管新生に顕著な差は認められなかった。
- 大腿骨骨髄内の骨髄細胞分画を解析した結果、血管内皮細胞やレプチン受容体陽性間葉系細胞、造血幹細胞、その他の骨髄細胞の細胞数に顕著な変化は認められなかった。

以上の結果から、BMP-2 および FGF-2 の骨形成能は骨髄の存在により制御されること、また両成長因子は血管新生や骨髄細胞分画へ大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

本論文はすでに *International Journal of Molecular Sciences*, 第 21 巻, 第 21 号, 7967 (発行年月日: 2020 年 10 月 27 日) に掲載されており、国際的にも評価されている。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。