

総説

BMP発現の支持体依存性と作用増強因子

滝田裕子、久保木芳徳

北海道大学 歯学部 口腔生化学講座 〒060 札幌市北区北13条7丁目

(受理：平成7年12月20日)

はじめに

骨誘導因子 (Bone Morphogenetic Protein : BMP) は、皮下や筋肉などの骨のない部位に適切な担体とともに埋植すると、骨を作りだすタンパク質として注目されてきた。BMPの研究は、1965年に Uristらがウシ骨の0.6M塩酸脱灰後の不溶成分(脱灰骨基質)をラットの皮下に移植すると骨組織ができたことから端を発した¹⁾。その後、BMPの精製が試みられてきたが、タンパク質側からの構造解析は困難を極め、完全精製には至っていない。BMPのアミノ酸配列は遺伝子学的手法を用いて Wozneyらによりはじめて明らかにされた²⁾。その結果、リコンビナントBMPが大量に作られるようになり臨床的応用が期待されている。

この間、BMPの研究は硬組織以外の分野でも進められてきた。アフリカツメガエルの初期胚から、哺乳動物のBMP-2、-4、-7と相同な遺伝子が単離され³⁾、その後、BMP-2、-4はツメガエルの初期発生において腹側中胚葉の誘導にかかわっていることが明らかにされた^{4,5)}。興味深いことにこのツメガエルのrBMP-4をラットの皮下に埋植すると骨が誘導された。このような多機能性をもつBMPを異所性に生体内で機能発現させるには、それにふさわしい環境をそなえた支持体が必要になる。この場合の支持体は単なる薬剤の徐放効果という意味だけではなく、細胞の分化増殖の場としても機能する。

BMPの精製を試みるにあたり、脱灰骨基質を異所性にラットに埋植すると骨が誘導されたことから、Reddiらは脱灰骨基質を4Mグアニジンで抽出した。ところが抽出物またはコラーゲン性残渣 (Insoluble Bone Matrix : IBM) を単独で埋植しても骨は形成されなかった。そこでIBMに4Mグアニジン抽出物を含浸し再構成したところ骨誘導は回復した⁶⁾。

この場合、IBMがBMP画分の支持体の役割を果たしていると考えられる。IBMに部分精製BMPまたはリコンビナントBMP (rBMP) を含浸し、埋植すると多量の骨を誘導することからIBMは優れた支持体であることが確認されている。しかしIBMには数%の未同定混在物質が含まれており、それがBMPとの相乗作用を起こす可能性もありBMP単独の作用を調べる上ではふさわしくない。またIBMは直径0.5 mmの顆粒であるため、組織学的に連続した軟骨・骨組織を観察することが困難である。臨床的にも未知の抗原性物質が含まれている可能性がありその応用が難しい。そこで我々は、IBMに代わる化学的性質が明らかであり幾何学的構造が異なった各種支持体を開発試験した。そのなかで支持体の構造の違いによって軟骨あるいは骨が優先的に形成されるというBMP発現の支持体依存性が確認され、骨から部分精製したBMPに有効な支持体とrBMPに有効な支持体が次第に明らかになった。また各種支持体を検討していくうちに部分精製BMP中にrBMPに対して相乗効果を持つ因子が存在することが示唆されたので、これらについて本稿で論述したい。

BMPの調整

BMPは久保木らの方法により、成牛骨から抽出、精製した⁷⁻⁹⁾。はじめに中足骨の骨幹部皮質骨を液体窒素冷却下で粉碎し、20-60メッシュ(840-150mm)の骨粉を調整した。次に4℃にて骨粉を洗浄、脱脂した後、塩

酸脱灰した。脱灰骨基質を4Mグアニジン塩酸にて抽出し、可溶性画分をHydroxyapatiteカラム、Heparin-Sepharose CL-6Bカラム、Sephacryl S-300 HRカラムにて部分精製した(図1)。Western blottingにて、部分精製BMPS-300画分とBMP抗体との反応性を調べ

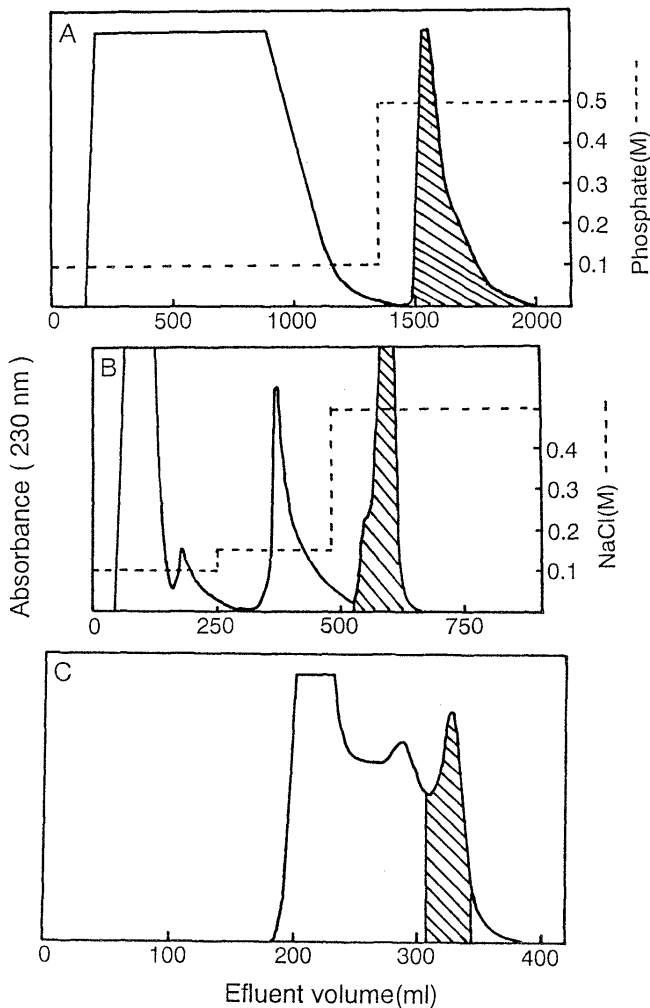


図1. 3段階クロマトグラフィーによるBMPカクテルの精製
 A: ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー B: ヘパリンセファロースクロマトグラフィー C: セファクリルS300HRゲル濾過クロマトグラフィー
 斜線は活性画分を示す

たところ、この画分中にBMP-2、-3、-4が含まれていることが明らかになった。この精製段階ではBMPのそれぞれのアイソフォームの分離は不可能でおそらくこの画分にはすべてのBMPが含まれていると考えられることから、我々はこの画分をBMPカクテルと呼ぶことにした。現在までにBMPに対して相乗効果を持つ因子としてTGF- β ¹⁰⁾、アクチビン¹¹⁾が知られているが、western blottingにてそれぞれの抗体と反応させたところBMPカクテル中にはこれらの相乗因子が含まれていないことが明らかになった。リコンビナントBMPとして山之内製薬から供与されたrhBMP-2を用い比較、検討した。

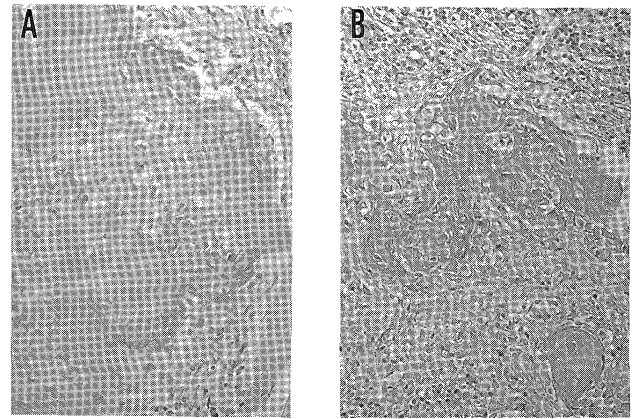


図2. IBMをBMP支持体とした場合、2週では軟骨組織に接して支持体表面にわずかに骨ができる (A)。3週になると支持体は吸収され骨、骨髄が形成される (B)。

支持体

我々がこれまでに開発試験したBMP支持体は以下のような3つのグループに分類できる。

1. 線維系——コラーゲン線維膜(FCM)、線維性ガラス膜(fine and coarse FGM)
2. 粒子系——コラーゲン・ビーズ(CBDS)、充実性ヒドロキシアパタイト(SPHAP)、多孔性粒子状ヒドロキシアパタイト(PPHAP)、ハニカム状ヒドロキシアパタイト(HCHAP)
3. ブロック系——多孔性ブロック状ヒドロキシアパタイト(PBHAP)

各支持体は幾何学的構造が異なっているが、いずれも生体親和性がありBMP支持体となりうるものである。

本稿では上記の支持体のうち興味ある知見を得たFCM、FGM、CBDS、PPHAP、そしてコントロールとして従来から用いられているIBMの結果について報告する^{9,12-13)}。

皮下埋植

BMP活性を確認するため、4週齢のWistar-king AH系雄ラット (体重: 約80 g) を使用した。各支持体にBMPカクテル、またはrhBMP-2を含浸し、あらかじめラット背部皮下結合組織を剥離して作っておいた皮下ポケットに埋植した。ナイロン糸で切開部を縫合し、感染予防のため抗生剤を塗布した。

活性検定法

埋植後、経時的に屠殺し、埋植物を摘出した。形態学的観察に用いるものはホルマリン固定し、生化学的分析を行うものは凍結乾燥した。生化学的分析としては、カルシウムの定量、アルカリフォスファターゼ活性測定、

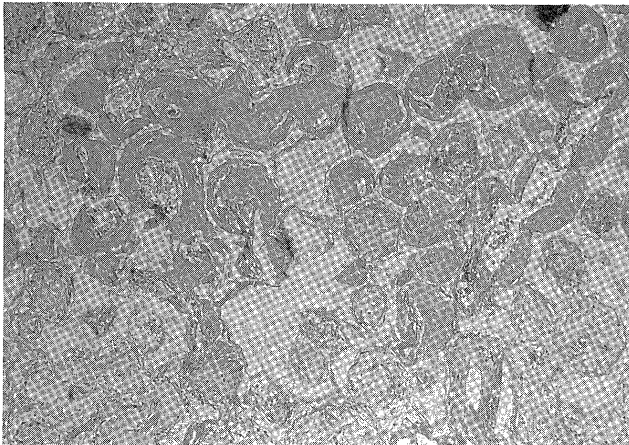


図3. PPHAPをBMP支持体とした場合、血行が確保され、それを中心に骨ができる。

軟骨の指標として酵素免疫定量法（EIA）によるII型コラーゲンの定量を行った。

BMP発現の支持体依存性

各種支持体とBMPカクテルを複合し、形態学および生化学的に骨形成を観察すると支持体によって軟骨性骨化が誘導されるもの、直接、骨が誘導されるもの、軟骨が大量に誘導されるものと、用いた支持体の幾何学的構造の違いによってBMP発現が異なっていることが明らかになった。以下、各支持体について述べてみる。

A.IBM

ここで用いられたIBMは完全脱灰骨基質をグアニジン塩酸で数回抽出後、冷蒸留水中で透析し凍結乾燥したものであり、カルシウムは含まれていない。IBMの主成分は直径約0.5mmの不溶性コラーゲン緻密顆粒であるが、形と大きさが一定ではない。IBMとBMPカクテル複合体の埋植後、1週ではIBM粒子の間隙に軟骨組織の形成が認められた。2週では、軟骨組織に接して、IBM表面に骨組織がわずかに形成されていた（図2A）。3週になるとIBM粒子のほとんどが吸収され層板状骨が認められ、骨髓組織も形成されていた（図2B）。支持体の形態上、形成された組織が不連続であるため、軟骨・骨の連続した組織学的観察が困難である。

B.CBDS

従来用いられてきたIBMには未同定成分や未知の抗原性物質が含まれている可能性があることから、化学的性質が明らかであるCBDSを支持体としBMPカクテルと複合した。CBDSは未変性ペプシン処理コラーゲンにヘキ

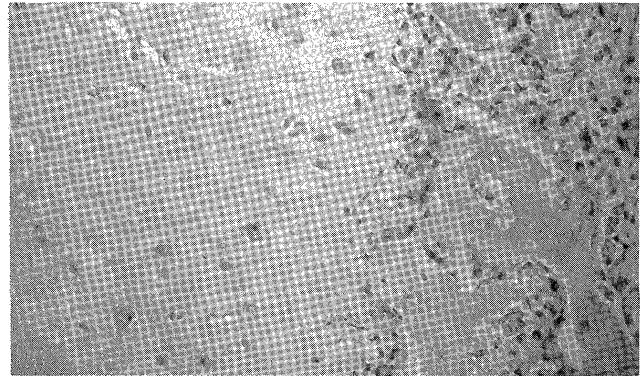


図4. FGMをBMP支持体とした場合、膜の中に軟骨ができ、それとは離れた膜の表面に骨ができる。

サメチレンジイソシアネートにより架橋結合を導入したもので、直径1mmである。今回その凍結乾燥物を支持体として用いた。埋植後、1週でCBDSの周囲に軟骨様組織が形成され、2週では、骨形成が散在して認められた。3週では造血骨髓を伴う骨が形成され、CBDS自身の石灰化像、すなわち無細胞性の石灰化が認められた。4週ではCBDSのほとんどが吸収され、骨髓系の細胞が多くなり、骨髓の一部は脂肪化していた。この系ではIBMの場合と同様に、軟骨・骨が誘導され、3週以降、骨のリモデリングが行われていることが示唆された。生化学分析の結果も、組織学的検索と一致しており、アルカリフォスファターゼ活性は2週で最大となり以降、減少した。カルシウム量は1週では検出されず、2週で最大となり、その後、徐々に減少した。

C.PPHAP

この支持体は日本製鋼室蘭研究所との共同開発によるものである¹⁴⁾。アパタイトの焼成温度は1200℃で、粒径は0.3-0.5mm、気孔径は150μm、気孔率70%で気孔は貫通している。PPHAPとBMPカクテル複合体を埋植すると、IBM、CBDSの場合とは異なり、軟骨の形成が認められず、気孔内と粒子間隙に骨が直接形成された。また多数の連続した気孔を通して血流が確保されていた（図3）。軟骨性骨化を経ず、直接骨が形成されたのは、アパタイト内に存在する貫通性細孔によるものであろう。すなわち、この孔に血管が侵入しやすく、その結果、細胞に十分な酸素を供給し、未分化間葉細胞が優先的に骨芽細胞に分化できると考えられる。久保木らは¹⁵⁾このような構造を「血管確保構造」とよんだ。細胞分化と酸素分圧については、Bassettら¹⁶⁾が、未分化間葉細胞は酸素分圧が低いときに、軟骨芽細胞に分化し、高いときに骨芽細胞に分化すると述べている。

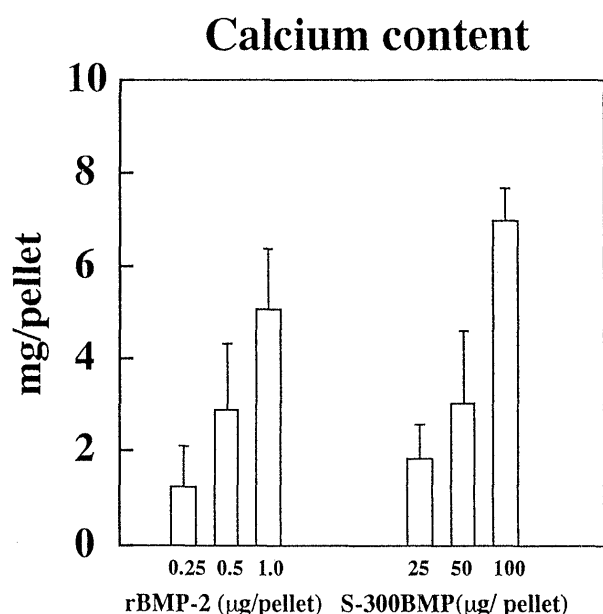


図5. 各種濃度のrBMP-2 およびBMPカクテルをIBMに含浸し、埋植した2週後のペレット中のカルシウム量。

D.FCM

今まで述べてきた粒子状支持体は方向性と連続性に欠ける。これを克服するものとして我々は、線維性支持体を開発した。その一つであるFCMは、ウシ皮膚コラーゲンをペプシン処理し、テロペプチドを除いたコラーゲン分子を透析により太い線維として再構成後、ヘキサメチレンジイソシアネートで架橋結合を導入し、膜状にしたものである。BMPカクテルと共に埋植すると線維束の間隙に軟骨が、線維束の表面に骨が観察された。ここで興味深いことは、この膜を支持体としたとき、従来のBMPによる軟骨性骨化とは異なり、骨と軟骨が別々な場所にそれぞれ独立に形成されるということである¹⁷⁾。次にこの支持体での結果をふまえ、さらに理想化された非吸収性の線維構造物を求めたところ、FGMがBio-mimicしていることが明らかになった¹⁸⁾。

E.FGM

この膜はホウ珪酸ガラス線維（直径1µm）からなり、保留径1µm、厚さ0.6mmである。FGMとBMPカクテル複合体を埋植すると、2週で膜の中に軟骨が形成され、それとは離れた膜の表面に骨が認められた（図4）。軟骨のマーカーとしてII型コラーゲン量を測定したところ、IBMを支持体にしたときと比べて、2週で6倍以上増加しており、多量の軟骨が誘導されていることが示唆された。このように膜の内部に多量の軟骨が発現している理由として、FGMメッシュサイズ1µmの網目構造に未分化間葉細胞は入ることができるが、血管は侵入できないためと考えられる。すなわち細胞環境の酸素分圧が低いため、未分化間葉細胞は骨芽細胞ではなく、軟骨芽細胞に優先的に分化することを示唆している。膜内の軟骨細胞は膜の表面に近くなると肥大軟骨細胞へと分化し、膜の表面に少量の骨が形成される。

我々は、保留径が1µmより小さい0.6µmのfine FGMを支持体として同様の実験を行ったが、膜の内部には血管だけではなく細胞の侵入も認められなかった。

以上、各種支持体を用いた実験結果よりBMPの支持体は、BMPを保持し、徐放するにとどまらず、未分化間葉系細胞が接着し増殖分化する場であることが確認された。その際、支持体の幾何学的構造が重要な意味を持ち、酸素が供給される構造であるか否かにより、細胞分化の方向性が決定づけられる。

rhBMP-2と各種支持体による骨誘導

BMPカクテルを今まで述べてきた6種類の支持体に含浸し、埋植すると、どの支持体においても骨が誘導された。そこでrhBMP-2を各支持体と複合させ同様に埋植した。rhBMP-2投与量はIBMを支持体としたときにBMPカクテルが骨を誘導する量と同じ活性を示す量である。

IBM、FGMではBMPカクテルを含浸し埋植した場合と同様に軟骨、骨が誘導されたが、CBDS、PPHAPでは全く両者とも誘導されなかった（表1）。この理由として各支持体とrhBMP-2との親和性の違いということも考

表1 rhBMP-2とBMPカクテルとの骨誘導の差

担体略称 素材 幾何学的形態	IBM 骨コラーゲン 顆粒	FCM コラーゲン 繊維膜	FGM ホウ珪酸ガラス 繊維膜	CBDS コラーゲン 顆粒	PPHAP アパタイト 顆粒
BMPカクテル	+++	+++	+++	+++	+++
rhBMP	+++	+	+++	-	-

えられるが、筆者らはBMPカクテル中にrBMP-2に対する作用増強因子が存在しているのではないかと考えた。すなわちBMPの機能発現には単一BMPの他にこの作用増強因子が必要となる。

BMPの作用増強因子

IBMを支持体としたときのrBMP-2とBMPカクテルとの骨形成能を埋植2週間後のペレット中のカルシウム量を測定することにより比較したのが図7である。この実験より骨に含まれるBMP量を推定すると、骨1Kgあたり、約100 μ gのrBMP-2活性に相当するBMPが含まれていることになる。しかしこの値は従来報告されている骨中のBMP混合物量¹⁹⁾を大幅に上回るものであり、BMPカクテル中にBMPの効果を増強する因子の存在が示唆される。

そこで筆者らはBMPカクテル中にrBMP-2に対する作用増強因子が含まれているという仮定のもとにCBDSを支持体として相乗効果を調べた。

rBMP-2とBMPカクテルの活性検出限界量をそれぞれ単独に、または複合してCBDS10mgに含浸し埋植した。2週間後にペレットを分析すると、rBMP-2単独では有意量の骨形成は認められなかった。BMPカクテル単独では僅かに骨が形成された。ところが両者を混和して埋植すると顕著な骨形成が確認された。

in vivoにおいて、精製されたBMPを異所性に埋植する場合、TGF- β と組み合わせると軟骨が多く誘導され¹⁰⁾、アクチビンと複合させると軟骨がほとんど認められず骨が多く誘導される¹¹⁾と報告されている。ここで用いたBMPカクテルには、これらの補助因子が含まれないことから今回見つかった相乗作用は新しい補助因子による可能性が強く現在追求中である。

おわりに

BMPの機能が次々に明らかになり、臨床応用も間近である。その際、問題になるのはBMP支持体であるが、一連の支持体を用いた研究を通して、BMP支持体としての必要条件が確認されている。今後、さらにBMPの最適な機能発現を求めるには、BMP補助因子の解明が望まれる。

参考文献

1) Urist,M.R.(1965) Bone formation by autoinduction.

- Science 150, 893-899
- 2) Wozney,J.M., Rosen,V., Celeste,A.J., Mitsock,L.M., Whitters,M.J., Krits,R.W., Hewick,R.M., Wang,E.A. (1988) Novel regulators of bone formation : Molecular clones and activities. Science 242, 1528-1534
- 3) Nishimatsu,S., Suzuki,A., Shoda,A., Murakami,K., Ueno,N.(1992) Genes for bone morphogenetic proteins are differentially transcribed in early amphibian embryos. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 1487-1495
- 4) Dale,L., Howes,G., Price,B.M.J., Smith,J.C. (1992) Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early Xenopus development. Development 115, 573-585
- 5) Jones,C.M., Lyons,K.M., LaPan,P.M., Wright,C.V.E., Hogan,B.L.M.(1992) DVR-4 (Bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in Xenopus mesoderm induction. Development 115, 639-647
- 6) Sampath,T.K., Reddi,A.H. (1981) Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7599-7603
- 7) Kuboki,Y., Yamaguchi,H., Yokoyama,H., Murata,M., Takita,H., Mizuno,M., Hasegawa,T., Iida,S., Shigenobu,K., Fujisawa,r., Kawamura,M., Atsuta,T., Matsumoto,A., Kato,H., Zhou,H-Y, Ono,I., Takeshita,N., Nagai,N. (1991) Osteogenesis induced by BMP-coated biomaterials: Biochemical principles of bone reconstruction in dentistry. The bone-biomaterial interface (In: Davis, J. D.ed), Univ. Toronto Press, p127-138
- 8) Kuboki,Y., Takita,H., Tazaki,M., Mizuno,M., Zhou,H-Y, Saito,t., Murata,M., Iida,S., Shigenobu,K., Ono,I., Takeshita,N., Nagai,N. (1992) Hydroxyapatite as a supporter for osteoblast differentiation in vivo and in vitro. Proceedings of First International Symposium on Apatite, (Aoki,H., Akao,M., Nagai,N., Tsuji,T. eds) Japanese Association of Apatite Science, 311-320
- 9) Iida,S., Kawasaki,T., Mizuno,M., Kuboki,Y. (1994) Bone formation in osteoporotic rats: Reduced effect of bone morphogenetic protein (BMP) ascribed to suppressed osteoblast differentiation. Jpn J Oral Biol,
- 10) Bentz,H., Thompson,A.Y., Armstrong,R., Chang,R.J., Piez,K.A., Rosen,D.M. (1990) Transforming growth factor b 2 enhances the osteoinductive activity of a bovine bone-derived fraction containing bone morphogenetic protein-2 and 3. Matrix, 11, 269-275
- 11) Ozawa,Y., Schmidt,D.K., Nathan,R.M., Armstrong,R.M., Miller,K.L., Sawamura,S.J., Ziman,J.M., Erickson,K.L., de Leon,E.R., Rosen,D.M., Seyedin,S.M., Glase,C.B., Chang, R.J., Corrigan,A.Z., Vale,W. (1992) Bovine bone activin enhances bone

滝田裕子:BMP発現の支持体依存性と作用増強因子

- morphogenetic protein-induced ectopic bone formation. *J. Biol. Chem.*, 267, 14233-14237
- 12) Shigenobu, K., Kaneda, K., Nagai, N., Kuboki, Y. (1993) Localization of bone morphogenetic protein-induced bone and cartilage formation on a new carrier. *Ann. Chir. Gynaecol.* 82, 85-90
- 13) Missana, L., Nagai, N., Kuboki, Y. (1994) Comparative histological studies of bone and cartilage formations induced by various BMP-carrier composites. *Jpn. J. Oral Biol.* 36, 9-19
- 14) Itoh, H., Wakisaka, Y., Ohnuma, Y., Kuboki, Y. (1994) A new porous hydroxyapatite ceramic prepared by cold isostatic pressing and sintering synthesized flaky powder. *Dental Materials Journal* 13, 25-35
- 15) 久保木芳徳(1995)骨形成と細胞外マトリックス. 蛋白質核酸 酵素 40:475-491
- 16) Bassett, C.A.L. (1961) Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature* 190, 460-461
- 17) Sasano, Y., Ohtani, E., Narita, K., Kagayama, M., Murata, M., Saitou, T., Shigenobu, K., Takita, H., Mizuno, M., Kuboki, Y. (1993) BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification in vivo. *The Anatomical Record* 236, 373-380
- 18) Kuboki, Y., Saitou, T., Murata, M., Takita, H., Mizuno, M., Inoue, M., Nagai, N., Poole, A.R. (1995) Two distinctive BMP-carriers induce zonal chondrogenesis and membranous ossification, respectively; Geometrical factors of matrices for cell-differentiation. *Connect. Tissue Res.* in press
- 19) Wozney, J.M. (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reproduct. Dev.*, 32 : 160-162