

BMP 誘導性の異所性骨における
骨形成抑制因子スクロスチンの発現

松下 雅衣

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員:芳澤 享子 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Analysis of expression of sclerostin,
A bone formation inhibitor, in BMP-induced ectopic bone

Mai Matsushita

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Michiko Yoshizawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

現在、歯科臨床において、顎骨腫瘍の摘出後の欠損を補う自家骨移植あるいは骨誘導再生法による顎骨の再生医療が行われている。これらの治療における臨床的課題として、移植骨の経時的な吸収や形成される再生骨量の不足が問題となっている。一方、骨組織における骨細胞の役割は永年不明であったが、近年、スクレロスチンというタンパク質を特異的に分泌していることが発見され、スクレロスチンには骨形成抑制作用があることが報告された。スクレロスチンは骨細胞から特異的に分泌されるタンパク質で、スクレロスチンの働きを阻害する抗スクレロスチン抗体は新規の骨粗鬆症治療薬として注目され、近年臨床応用されている。骨誘導因子（Bone morphogenetic protein:BMP）は、骨基質中に存在し、異所性骨形成を誘導するタンパク質である。BMP誘導性の異所性骨におけるスクレロスチンの発現については、未だ明らかにされていない。そこで、本研究では、リコンビナント BMP-2 誘導性異所性骨におけるスクレロスチンの発現を観察し、その形成・吸収過程におけるスクレロスチンの役割を解析し、顎骨欠損に対する再生医療の研究に貢献することを目的とした。

BMP-2 を浸漬した直径 2 mm の円柱のコラーゲンペレットを作製した。生後 7 週齢雄の C57BL/6 マウスの右側大腿部内側の筋膜下にペレットを移植し、移植後 7 日、10 日、2 週、4 週、6 週後に誘導されたペレットを採取した。採取した異所性骨をマイクロ CT および各種染色により組織学的解析を行った。

BMP 埋入後 7 日で回収したペレットでは、マイクロ CT で解析可能な石灰化は認められなかった。組織学的解析では、移植した BMP ペレットを取り囲むメタクロマジー陽性（トリイジンブルー染色）の軟骨組織を含む結合組織が認められた。また、アルカリホスファターゼ（Alkaline phosphatase:ALP）陽性の骨芽細胞も多数認められた。BMP 埋入後 10 日で回収した異所性骨では、マイクロ CT において、BMP ペレット外周に石灰化像を認めた。組織学的解析では軟骨組織と骨組織を認めた。ALP 陽性の骨芽細胞と共に、トリイジンブルー染色で認識される軟骨基質中に多数の軟骨細胞を認めた。抗スクレロスチン抗体を用いた免疫染色では、軟骨細胞においてスクレロスチンの発現を認

め、骨様組織中にもスクレロスチン陽性骨細胞の出現を認めた。BMP 埋入後 2 週間で回収した異所性骨では、マイクロ CT において、BMP ペレットを完全に取り囲む多孔質な石灰化像を認めた。組織学的解析では、埋入後 10 日で認められた軟骨様組織はほぼ消失し、骨様組織が占めていた。ALP 染色では、骨芽細胞と軟骨細胞で陽性を示した。また、多孔質な石灰化組織に存在する骨細胞において、スクレロスチン発現が強く認められた。これらの骨細胞は、骨細胞の特異形質である象牙質マトリックスタンパク質-1 (Dentin matrix protein-1:DMP-1) と線維芽細胞成長因子-23 (Fibroblast growth factor-23:FGF-23) のタンパク質発現が認められた。BMP 埋入後 4 週間で回収した異所性骨では、マイクロ CT において、石灰化物の不透過性が亢進するとともに、外殻の厚さは薄くなっていた。組織学的解析では、層板様構造の石灰化物が認められ、ALP 染色では骨芽細胞で陽性を認めるが、埋入後 2 週間よりも弱い発現であった。層板骨の骨組織は扁平となり、骨細胞におけるスクレロスチン、DMP-1 および FGF-23 の発現が認められた。BMP 埋入後 6 週間で回収した異所性骨では、マイクロ CT において、埋入後 4 週間と同様であった。組織学的解析でも埋入後 4 週間と類似した層板様構造であった。ALP 染色では骨芽細胞で陽性を認めるが、かなり弱い発現であった。骨細胞におけるスクレロスチン、DMP-1 および FGF-23 の発現は BMP 埋入後 6 週間でも維持されていた。

以上の結果より、BMP 誘導性異所性骨において、骨細胞はスクレロスチンを発現していた。また、興味深いことに、BMP 誘導性異所性骨における軟骨細胞において、スクレロスチンの発現が認められた。このことから、スクレロスチンを標的としたアプローチは、顎骨再生医療における BMP 誘導性の異所性骨形成にも有用な骨形成促進作用を示す可能性を示唆している。

緒言

現在、歯科臨床では線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factors-2:FGF-2) を用いた歯槽骨の再生術や、顎骨腫瘍の摘出後の欠損を補う自家骨移植術、あるいは保護膜と骨補填剤を用いた骨誘導再生法 (Guided bone regeneration:GBR) のような骨誘導再生術によって形成される再生骨が経時的に吸収してしまうことが問題となっている¹⁾。本研究では骨誘導因子 (Bone morphogenetic protein:BMP-2) 誘導性異所性骨を作製し、今だに明らかにされていない異所性骨におけるスクレロスチンの発現を解析し、顎骨欠損に対する再生医療の治療成績の向上に貢献することを目的とした。

今回、異所性骨を *in vivo* で誘導するために BMP を用いた。BMP は骨基質中に含まれるタンパク質で、骨芽細胞の分化を促進し、骨形成を誘導する因子であり、1984 年に Urist によってウシ脱灰骨から発見された²⁾。 *In vivo* において BMP は軟骨の形成を促進し、骨組織を誘導することが報告されている³⁾。BMP を徐放性の担体と共に筋膜下あるいは皮下に埋植すると、血流を介して局所に未分化間葉細胞が誘導され、その後軟骨細胞に分化する。次いで、軟骨組織内に血管侵入が生じ、肥大化した軟骨細胞の吸収と並行して、骨新生が認められる。最後に骨髄が形成され、骨リモデリングを呈する正常骨の形成に至る⁴⁾。このようなメカニズムにより、BMP を生体に移植することで、異所性に骨を形成させることができる。しかしながら、BMP の血中半減期は極めて短く、少量の局所投与では骨形成を生じない。BMP によって骨形成を誘導させるためには、骨形成が必要とされる部位に BMP を一定期間保持し、適度な速度で徐放させる物質、すなわち担体が必須である。現在、整形外科領域、および歯科口腔外科領域を中心に、リコンビナントヒト BMP (recombinant human BMP-2:rhBMP-2) が臨床応用されるようになった。歯科口腔外科領域では、上顎洞挙上術 (サイナスリフト) に rhBMP を応用し、rhBMP-2 の埋入を受けた患者 12 症例のうち、評価可能な 11 症例中 8 例で歯科インプラント施術に十分な骨が新生されることが確認された⁵⁾。一方、FGF-2 は現在歯周組織再生医療で使用されている。FGF-2 の主な作用は、

未分化間葉細胞の増殖作用であり、歯周組織の再生に大変有用であるが、**BMP-2**と異なり、骨を誘導する作用は認められない。このため、**FGF-2**は拔牙窩のような骨組織に囲まれた狭域な骨欠損の治療には骨造成の効果を発揮する⁶⁾。しかしながら、**FGF-2**には、上顎洞挙上術などの広範囲にわたる骨欠損あるいは元来骨がない部位への骨造成能は期待することはできない。

骨組織における骨細胞の役割は永年不明であったが、近年、スクレロスチンという骨形成を抑制する作用を有するタンパク質を分泌していることが発見された⁷⁾。スクレロスチンをコードするヒト遺伝子である *SOST* は、2001年にアフリカにおける硬結性骨化症 (sclerosteosis) のファミリーより発見された⁸⁾。硬結性骨化症は、進行性の骨格異常増殖を特徴とする常染色体潜性 (劣性) 遺伝病である。臨床的所見として、巨人症、下顎骨の過成長、顔面の歪み、脳神経の狭窄、顔面麻痺、難聴、頭蓋冠拡大による頭蓋内圧の亢進、大後頭孔の狭窄による突然死、合指症などがある⁸⁾。骨細胞から産生されたスクレロスチンは、Wntの共受容体である LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) に結合して、骨芽細胞系細胞における Wntシグナル伝達を阻害する⁹⁾。スクレロスチンの発現を抑制する因子としては、副甲状腺ホルモン (Parathyroid hormone: PTH)、シグナル伝達分子 gp130 を介するオンコスタチン M などのサイトカイン¹⁰⁾ およびメカニカルストレス等がある。PTHの骨形成促進作用は、スクレロスチン発現の抑制を介する可能性が考えられている¹¹⁾。また、宇宙飛行士の骨量減少の主な原因は、無重力状態ではメカニカルストレスの負荷が無くなるために、スクレロスチン発現が維持されるためと考えられている¹²⁾。歯科口腔外科領域の研究においても、拔牙した歯の対合歯を支える歯槽骨には、咬合力がかからないため、スクレロスチン発現が維持され、骨形成抑制に傾き、骨体積率が下がるという報告がある¹³⁾。

抗スクレロスチン抗体は、日本では新規の骨粗鬆症治療薬として2019年に薬事承認され、臨床応用された。抗スクレロスチン抗体は、第三相試験として FRAME 試験¹⁴⁾と ARCH 試験¹⁵⁾が行われた。FRAME 試験では、最初の1年間にプラセボ対照群あるいは抗スクレロスチン抗体が投与され、続く2年間は抗 RANKL 抗体 (デノスマブ) が投与された。抗スクレロスチン抗体投与1

年間の時点で、新規椎体骨折の症例数はプラセボ群と比較して有意に低値であった。その後デノスマブ投与 1 年目の時点において、抗スクレロスチン抗体投与群は、プラセボ群と比較して 3 倍以上の椎体骨密度増加を示した¹⁴⁾。ARCH 試験では、最初の 1 年間に抗スクレロスチン抗体またはアレンドロン酸（第二世代ビスホスホネート）が投与され、その後の 2 年間は両群にアレンドロン酸が投与された。その結果、抗スクレロスチン抗体治療群の新規骨折の患者率は、アレンドロン酸治療群に比較して約半分であり、抗スクレロスチン抗体投与による骨密度は 2 倍強の増加率を示した¹⁵⁾。また、ラットにおける歯科口腔外科領域の研究では、抗スクレロスチン抗体投与は、抜歯による顎骨の吸収を有意に抑えることが報告されている¹²⁾。

BMP はスクレロスチンの発現を増強させるという報告がある¹⁶⁾。この報告では、BMP 受容体タイプ 1a の遺伝子 (*Bmpr1a*) をマウス骨芽細胞で組織特異的に欠損させると、*Sost* の発現が 90% 減弱した¹⁶⁾。これらの知見から、BMP とスクレロスチンの相互作用が存在する可能性が示唆されている。

rhBMP-2 を Poly-L-lactic acid/gelatin conjugate (PGS) 担体とともに組織へ埋入した場合、埋入後 3 日までは急速に BMP は消失するが、1 週間後では埋入時の約 30% の BMP が残存する¹⁷⁾。従って、BMP 誘導性異所性骨においてスクレロスチンの発現が確認できれば、スクレロスチンにより骨形成が抑制されていることが推測され、再生医療の臨床応用において抗スクレロスチン抗体が応用できる可能性がある。BMP 誘導性異所性骨におけるスクレロスチンの発現解析を行った実験は報告されていない。そこで今回、BMP 誘導性異所性骨におけるスクレロスチンの発現を詳しく観察した。

実験材料および方法

1. マウスおよび試薬

C57BL/6 マウス（雄 7 週齢）は、日本 SLC 社（静岡）より購入し、松本歯科大学ハイテクセンター内の動物飼育室にて飼育した。本実験は、松本歯科大学動物実験委員会の承認の上、同大学動物実験取り扱い規定に基づいて行った。実験に用いたコラーゲンペレットは Zimmer 社（東京）、rhBMP-2 はオリエンタル酵母工業（東京）より購入した。ヒツジ血清は Merck (Darmstadt, Deutschland)、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin:BSA) は和光純薬工業（大阪）、Dako Real は Dako (Santa Clara, CA)、抗アルカリホスファターゼ抗体は Abcam (Cambridge, UK) より購入した。抗スクレロシン抗体、抗 Dentin matrix protein-1 (DMP-1) 抗体および抗 Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) 抗体は R&D system (Minneapolis, US) より購入した。ヒストファインシンプルシステムマウス MAX-PO (Rabbit および Rat) およびヒストファインキット DAB 基質キット (DAB) はニチレイバイオサイエンス（東京）、抗ヒツジ HRP と抗ヤギ HRP は Santa cruz (Dallas, TX) より購入した。

2. BMP 含有コラーゲンペレットと異所性骨の作製

rhBMP-2 含有コラーゲンペレットは、生検用パンチ（カイ インダストリーズ、岐阜）を用いて直径 2 mm の円柱として切り出したものに、rhBMP-2 を 5 μ g 浸漬し作製した。C57BL/6 マウス（雄 7 週齢）にペントバルビタールを使用し全身麻酔を施し、右側大腿部内側の筋膜下に、BMP 含有コラーゲンペレットを埋入した。埋入後 7 日 ($n=6$)、10 日 ($n=6$)、2 週 ($n=9$)、4 週 ($n=8$)、6 週後 ($n=8$) に 4% Paraformaldehyde (PFA) で灌流固定を行い、BMP 誘導性異所性骨を含む組織を BMP 移植後に経時的に摘出した。また、軟骨組織の正常コントロールとして、C57BL/6 マウス（雄 9 週齢）の大腿骨を採取した。

3. BMP 誘導性異所性骨の骨量の計測

BMP 誘導性異所性骨の骨量の評価は、マイクロ CT (ScanXmate-A080, コムスキャンテクノ, 東京) を使用した。撮影は、管電圧 22 kV, 管電流 250 mA の条件にて行った。BMP 誘導性異所性骨の骨量解析は矢状断面で行い、骨量体積/組織体積 (bone volume/tissue volume%, BV/TV%) は、骨形態計測ソフトの TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング, 東京) を用いて測定した。

4. BMP 誘導性異所性骨の免疫組織化学染色

4%PFA で固定した BMP 誘導性異所性骨は、10%EDTA 溶液で 3 週間、4℃にて脱灰を行った。脱灰組織は、上昇エタノール系列にて脱水を行い、パラフィンで包埋した。包埋した組織は、4 μ m の厚さに薄切した。すべての組織切片は Dako Real ペルオキシダーゼブロッキング試薬で 30 分間処理し、内因性ペルオキシターゼを除去した。アルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase:ALP) および FGF-23 染色においては 10%ヒツジ血清で、DMP-1 およびスクレロスチン染色においては 1%BSA で 1 時間処理して、非特異的結合を防ぐためのブロッキングを行った。組織切片は 70 倍希釈した抗 DMP-1 抗体、70 倍希釈した抗スクレロスチン抗体、800 倍希釈した抗 FGF-23 抗体、1000 倍希釈した抗 ALP 抗体で 18 時間、4℃にて処理した。ALP 染色においてはヒストファインシンプルシステインマウス MAX-PO (Rabbit), DMP-1 染色においては抗ヒツジ HRP で 30 分間二次抗体処理を行った。スクレロスチン染色においては抗ヤギ HRP で 60 分間、FGF-23 抗体染色においてはヒストファインシンプルシステインマウス MAX-PO (Rat) で 45 分間二次抗体処理を行った。組織切片は、ヒストファインキット DAB 基質キットにて DAB 染色を行い、ヘマトキシリンにて核染色を行った。また、骨芽細胞と破骨細胞の観察のために ALP 染色を行った後、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase:TRAP) 染色との二重染色を行った。TRAP 反応液は基質である 0.01% naphthol AS-BI phosphate を N,N ジメチルホルムアミドに

溶解し, 酒石酸 (50 mM) を含む Sodium acetate buffer (0.2 M) に色素である Fast red violet LB salt (0.06%) を添加し作製した. 組織切片に TRAP 反応液を滴下し, 37°C で 20 分間反応させ, 染色を行った.

5. 軟骨形成量の解析

BMP 誘導性異所性骨の軟骨形成量は, ImageJ (Rasband WS ImageJ, ver1.4.3.67 NIH, Bethesda, MD) を使用してトルイジンブルー染色にてメタクロマジーを示す紫色の陽性を示す領域の面積を測定した.

6. 統計解析

BMP 誘導性異所性骨の重量, 組織体積 (Tissue volume:TV), 骨量体積 (Bone volume:BV) および骨量体積/組織体積 (BV/TV) の統計学的解析は, Stat view5.0 software (SAS Institute, Carry, NC) を使用し, 軟骨の統計学的解析は, Graph pad prism7 (MDF, 東京) を使用した. 分散分析には重量, TV, BV および BV/TV では Scheffe's multiple comparisons test を用い, 軟骨の分散分析では, Tukey's multiple comparisons test を用いた. p 値は $p < 0.05$ を*, $p < 0.01$ を**として示し, $p < 0.05$ を有意とした.

結果

1. BMP 誘導性異所性骨外面の観察と石灰化についての観察

BMP ペレット埋入 7 日, 10 日, 2 週間後に回収した異所性骨は, 実体顕微鏡像にて黄色の外観を呈していた (図 1A). BMP ペレット埋入 4 週間, 6 週間後に回収した異所性骨は, 骨髓の形成による赤褐色の外観を呈していた (図 1A). ヘマトキシリンエオジン (Hematoxylin-eosin) 染色による組織学的観察により, BMP ペレット埋入 7 日後に回収したペレットでは, 骨組織が未形成であり, ペレット周囲組織は好塩基性を示していた. BMP ペレット埋入 10 日, 2 週間, 4 週間, 6 週間後に回収したペレット周囲組織は種々の量の好酸性の硬組織が形成されていた (図 1B). マイクロ CT 解析において, BMP ペレット埋入 7 日後に回収したペレットでは, 不透過像を示さず石灰化は認められなかった (図 1C). 一方, BMP ペレット埋入 10 日後に回収した異所性骨では, BMP ペレットを取り囲むような不透過像が認められ石灰化像を示した (図 1C). BMP ペレット埋入 2 週間後に回収した異所性骨は, BMP ペレット外周を完全に取り囲む多孔質な石灰化像を示し, その内部にも石灰化像が認められた (図 1). BMP ペレット埋入 4 週間後に回収した異所性骨では, 2 週間目の異所性骨と比較し, 石灰化を示す不透過性は増大していたが, 外周の厚さは減少していた (図 1C). BMP ペレット埋入 6 週間後に回収した異所性骨は, 埋入 4 週間後に回収した異所性骨と類似していた (図 1C).

2. BMP 誘導性異所性の骨形成の定量的解析と軟骨形成の観察

BMP ペレット埋入 7 日, 10 日, 2 週間, 4 週間, 6 週間後に回収した BMP 誘導性異所性骨の骨形成量を定量化した. BMP 誘導性異所性骨の非石灰化組織を含めた組織体積 (TV), マイクロ CT で検出される異所性骨の骨体積 (BV), 組織体積に占める骨体積の割合 (BV/TV) は, 埋入 10 日後で最大を示し, その後は経時的に減少した (図 2A). Scheffe 法にて TV では 2 週間目と 6 週間目に有意差を, BV では 10 日目と 4 週間目, 10 日目と 6 週間目に有意差を, BV/TV では 10 日目と 2 週間目, 10 日目と 4 週間目, 10 日目と 6 週間目に有意差を認めた. また, BMP ペレット埋入 7 日, 10 日, 2

週間後に回収した BMP 誘導性異所性骨の軟骨形成量は、トルイジンブルーにてメタクロマジーを示す領域を計測した。軟骨形成量は、埋入 7 日目で 13.1%, 10 日目で 11.3%, 2 週間目で 3.5%であり, 7 日目をピークに減少傾向を示した。Bonferoni/Dunn 法にて7日目と2週間目の異所性骨に有意差を認めた (図 2B)。

3. BMP 誘導性異所性骨におけるスクレロスチン発現

BMP 誘導性異所性骨における成熟骨細胞の分化マーカーであるスクレロスチンの発現を観察するために、スクレロスチンの免疫染色を行った (図 3)。埋入 7 日後の BMP 誘導性異所性骨では、スクレロスチン弱陽性の軟骨細胞が観察された (図 3B)。埋入 10 日後の異所性骨では、軟骨細胞、骨細胞および軟骨基質から骨基質への移行部にスクレロスチンの発現が強く認められた (図 3B)。埋入 2 週間後の異所性骨では、軟骨細胞と骨細胞がスクレロスチン陽性を示した。4 週間目と 6 週間目の異所性骨では、骨細胞のみがスクレロスチン陽性を示した。成熟骨細胞のマーカーであるスクレロスチンは、埋入 10 日後の未成熟と考えられる骨組織に存在する骨細胞でも発現していた (図 3B)。

4. BMP 誘導性異所性骨における骨芽細胞と破骨細胞の観察

BMP 誘導性異所性骨における骨芽細胞と破骨細胞分布を解析するために、骨芽細胞の分化マーカーである ALP の免疫染色と、破骨細胞の分化マーカーである TRAP の酵素化学染色の二重染色を行った (図 4)。7 日目の BMP 誘導性異所性骨において、ALP 陽性の軟骨細胞および骨芽細胞が多数観察された。また、ALP 陽性細胞に近接して単核の TRAP 陽性破骨細胞が観察された。10 日目の異所性骨では、形成された骨基質表面に ALP 陽性の骨芽細胞とともに、軟骨基質内に ALP に陽性を示す軟骨細胞が観察された。また、軟骨および骨基質表面に TRAP 陽性の多核の破骨細胞が観察された。2 週間目の異所性骨では、形成された骨基質表面に ALP 陽性の骨芽細胞とともに、軟骨基質内に ALP に陽性を示す軟骨細胞が観察された。また、骨基質表面に TRAP 陽性の多核の破骨細胞が観察された。埋入 4 週間

後の異所性骨では、埋入 2 週間目の異所性骨より弱い ALP 陽性の骨芽細胞を骨基質表面に認めた。一方、外周の骨組織では TRAP 陽性破骨細胞はほとんど観察されなかった。6 週間目の異所性骨の所見は、4 週間目の異所性骨の所見と類似していた（図 4）。

5. BMP 誘導性異所性骨における DMP-1 および FGF-23 の発現

BMP 誘導性異所性骨における骨細胞を確定するために、DMP-1 および FGF-23 の免疫染色を行った。BMP ペレット埋入 2, 4, 6 週間後の BMP 誘導性異所性骨では、DMP-1 陽性の骨細胞（図 5A）および FGF-23 陽性の骨細胞が観察された（図 5B）。

6. マウス関節軟骨におけるスクレロスチンの発現

BMP 誘導性異所性骨において誘導される軟骨細胞においてスクレロスチンの発現が認められたので、マウス関節軟骨部におけるスクレロスチンの発現を観察した。9 週齢マウスから採取した大腿骨関節軟骨において、非石灰化層と石灰化層の境目に黒点線で示す **tide mark**（石灰化前線）が認められた。**Tide mark** より下部の薄い青色に染色されている部位では石灰化軟骨において、スクレロスチン陽性の軟骨細胞が観察された（図 6）。

考察

スクレロスチンの発現は骨細胞に特異的であり、軟骨細胞におけるスクレロスチン発現の報告はほとんど報告されていなかった。そのため、スクレロスチンは成熟骨細胞の特異マーカーとして考えられてきた¹⁸⁾。しかしながら、近年、マウス関節軟骨の軟骨細胞におけるスクレロスチンの発現¹⁹⁾や、骨細胞を持たない魚類のゼブラフィッシュの軟骨細胞においてスクレロスチン遺伝子 *sost* の発現が認められることが報告された²⁰⁾。近年ヒトにおいては成長板肥大軟骨細胞においてスクレロスチンの発現が認められることが報告された²¹⁾。*SOST* 遺伝子に変異をもつ硬結性骨化症の臨床的所見として高身長を示すことは、軟骨においてスクレロスチン発現が認められることで説明できるのかもしれない²²⁾。他にも、硬結性骨化症においては、軟骨内骨化を示す下顎骨の過成長を認める。軟骨内骨化を示す部位におけるスクレロスチンの発現が認められるため、骨形成が抑制され軟骨形成が促進され下顎骨の過成長につながる可能性が示唆される²²⁾。

今回の実験結果から、BMP 誘導性異所性骨における軟骨細胞においてスクレロスチンタンパク質の発現が認められた。関節軟骨細胞でのスクレロスチンの発現は、生理的な状態（大腿骨関節部）においては石灰化層の軟骨細胞で確認されることから、異所性骨の軟骨細胞は石灰化した基質に閉鎖されると、スクレロスチンを強く発現するのかもしれない。これは、石灰化基質に埋入された肥大軟骨細胞はスクレロスチンを発現するという報告と一致する²¹⁾。また、スクレロスチンは BMP 誘導性異所性骨形成を阻害するという報告²³⁾を考えると、スクレロスチンは BMP のによる過剰な骨形成を抑制するための負のフィードバック機構である可能性が考えられる。

本研究において、BMP 埋入 10 日後の誘導性異所性骨でのスクレロスチン発現は、軟骨基質から骨基質への移行部で顕著に観察された。この所見から、異所性骨内の軟骨細胞が分泌したスクレロスチンが、軟骨基質内を移動出来るが、骨基質部へは移動できないために、境界部に蓄積したものと考えられる。タンパク質が軟骨基質を移動するための物性として、軟骨基質内を移動できる大きさである分子量 67kDa 以下であることと、軟骨基質

が負電荷であるので、電氣的に反発しない正電荷であることが必要である²⁴⁾。²⁵⁾ 骨組織で観察されるスクレロスチンは分子量は **28kDa** であり、計算等電点は **9.5** で正電荷を示す²⁶⁾。このため、スクレロスチンは軟骨基質内を移動可能と考えられる。一方、これまで報告されてきた骨組織における抗スクレロスチン抗体免疫染色結果が示すように、スクレロスチンが局在する部位は骨細胞と骨細管である²⁷⁾。このことは、スクレロスチンは骨基質を通過できないことを示唆している。以上の理由から、スクレロスチンは軟骨基質と骨基質の境界部において蓄積していることが説明できると考える。また、**BMP 誘導性異所性骨**における軟骨様骨 (**Chondroid bone**)^{28,29,30)}に発現しているスクレロスチンは、破軟骨細胞や破骨細胞によって吸収されることで活性化され、骨形成を抑制する可能性が考えられる。

本実験系における **BMP 誘導性異所性骨**は、**rhBMP-2 (5 μ g)** 移植ペレットを使用した。10 日目で最大となり、その後減少して 4 週でほぼ安定する³⁰⁾。組織像からは 10 日目で軟骨内骨化が生じており、2 週間目でリモデリングが行われており、4 週間目以降は骨の成熟期を迎えていることが示唆される。また、骨から精製した **BMP** を移植した場合、**BMP** 移植後 18 日まで石灰化組織の拡大が認められ、その後減少して 13 週間目以降はその体積はほぼ不変となることが報告されている³¹⁾。この推移は、必要とされる移植骨の体積に対し、どれほどの **BMP** が必要となるかの指標となる。

本研究の実験結果より、**BMP 誘導性異所性骨**において、スクレロスチンの発現が観察された。また、本実験で形成された **BMP 誘導性異所性骨**における骨細胞は、スクレロスチンのみならず、**DMP-1** および **FGF-23** 陽性であり、長管骨における骨細胞と同様の性質を有していると考えられる。異所性骨の成熟期である 4 週間目、6 週間目にもスクレロスチンの発現が保持されていることから、骨細胞を標的とした骨粗鬆症患者に対する抗スクレロスチン抗体療法は、顎骨再生医療における **BMP 誘導性**の異所性骨形成にも有用な骨形成促進作用を示し、異所性骨が吸収されてしまうことによる骨量不足という臨床的課題を解決できる可能性が期待できる。

結 論

BMP 誘導性異所性骨で認められる骨細胞および軟骨細胞において、スクレロスチン発現が認められた。

謝 辞

本研究に際し、終始御懇意なるご指導を賜りました松本歯科大学口腔顎顔面外科学講座 芳澤享子教授、松本歯科大学口腔生化学講座 宇田川信之教授、松本歯科大学 硬組織疾患制御再建学講座 各務秀明教授、ならびに松本歯科大学総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学講座 小出雅則准教授に謹んで謝意を申し上げます。また、本研究に多大なるご指導、ご助言を賜りました松本歯科大学総合歯科医学研究所 高橋直之特任教授、日本大学歯学部解剖学第Ⅰ講座 二宮禎准教授に厚く感謝申し上げます。また、本研究の遂行ならび論文の作成にあたり、御助言、御協力頂きました松本歯科大学口腔顎顔面外科講座ならびに松本歯科大学総合口腔生化学講座・歯科医学研究所の諸先生方に御礼申し上げます。

最後に本研究を遂行するのに際して絶えず励ましてくれました両親（父幸之助、母香子）、兄（義忠）に心から感謝致します。

文献

1. Dong-Woo Kang, Pil-Young Yun, Yong-Hoon Choi, Young-Kyun Kim (2019) Sinus bone graft and simultaneous vertical ridge augmentation: case series study. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 41:36.
2. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, DeLange RJ (1984) Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:371-375.
3. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.
4. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2220-2224.
5. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, Alder M, Nummikoski P (1997) A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 17:11-25.
6. 上與那原朝秀 (2012) FGF-2 及び BMP-2 がヒト歯根膜細胞群において組織再生に与える影響. *北海道医療大学歯学雑誌* 31:114-116.
7. van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Löwik CW (2005) SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:319-327.
8. Mary E. Brunkow, Jessica C. Gardner, Jeff Van Ness, Bryan W. Paeper, Brian R. Kovacevich, Sean Proll, John E. Skonier, L. Zhao, P. J. Sabo, Ying-Hui Fu, Reid S. Alisch, Lucille Gillett,

- Trenton Colbert, Paolo Tacconi, David Galas, Herman Hamersma, Peter Beighton, and John T. Mulligan (2001) Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 68:577-589.
9. X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 220:19883-19887.
 10. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, Constable MJ, Nicholson GC, Zhang JG, Nicola NA, Gillespie MT, Martin TJ, Sims NA (2010) Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest* 120:582-592.
 11. Keller H, Kneissel M (2005) SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37:148-158.
 12. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH (2008) Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 29:5866-5875.
 13. Liu M, Kurimoto P, Zhang J, Niu QT, Stolina M, Dechow PC, Feng JQ, Hesterman J, Silva MD, Ominsky MS, Richards WG, Ke H, Kostenuik PJ (2018) Sclerostin and DKK1 Inhibition Preserves and Augments Alveolar Bone Volume and Architecture in Rats with Alveolar Bone Loss. *J Dent Res* 97:1031-1038
 14. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, Zerbin CA, Milmont CE, Chen L, Maddox J, Meisner PD,

- Libanati C, Grauer A (2016) Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 20:1532-1543.
15. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, Maddox J, Fan M, Meisner PD, Grauer A (2017) Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 12:1417-1427.
 16. Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, Mochida Y, Yamauchi M, Kronenberg HM, Feng JQ, Mishina Y (2008) BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *J Dent Res* 97:1031-1038.
 17. 高橋浩一郎 (2000) 骨形成タンパク質 (BMP) の臨床応用にむけて. 薬理雑誌 (*Folia Pharmacol. Jpn*) 116:232-240.
 18. Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26:229-238.
 19. Chan BY, Fuller ES, Russell AK, et al (2011) Increased chondrocyte sclerostin may protect against cartilage degradation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19:874-885.
 20. Ofer L, Dean MN, Zaslansky P, Kult S, Shwartz Y, Zaretsky J, Griess-Fishheimer S, Monsonego-Ornan E, Zelzer E, Shahar R (2019) A novel nonosteocytic regulatory mechanism of bone modeling. *PLoS Biol* 17:e3000140.
 21. van Bezooijen RL, Bronckers AL, Gortzak RA, Hogendoorn PC, van der Wee-Pals L, Balemans W, Oostenbroek HJ, Van Hul W, Hamersma H, Dijkers FG, Hamdy NA, Papapoulos SE, Löwik CW (2009) Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. *J Dent Res* 88:569-574.

22. Luzzi V, Consoli G, Daryanani V, Santoro G, Sfasciotti GL, Polimeni A (2006) Malignant infantile osteopetrosis: dental effects in paediatric patients. Case reports. *Eur J Paediatr Dent* 9:39-44.
23. Löwik CW, et al (2006) Wnt signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. Review.
24. van Lent PL, van den Berg WB, Schalkwijk J, van de Putte LB, van den Bersselaar L (1987) The impact of protein size and charge on its retention in articular cartilage. *J Rheumatol* 14:798-805.
25. van Lent PL, van den Bersselaar L, Grutters GJ, van den Berg WB (1989) Fate of antigen after intravenous and intraarticular injection into mice. Role of molecular weight and charge. *J Rheumatol* 16:1295-1303.
26. Cejka D, Marculescu R, Kozakowski N, Plischke M, Reiter T, Gessl A, Haas M (2013) Renal elimination of Sclerostin increases with declining kidney function. *J Clin Endocrinol Metab* 99:248-255.
27. Hasegawa T, Amizuka N, Yamada T, Liu Z, Miyamoto Y, Yamamoto T, Sasaki M, Hongo H, Suzuki R, de Freitas PH, Yamamoto T, Oda K, Li M (2013) Sclerostin is differently immunolocalized in metaphyseal trabecules and cortical bones of mouse tibiae. *Biomed Res* 34:153-159.
28. Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata Y, Kitamura Y, Nomura S (1997) Three Modes of Ossification During Distraction Osteogenesis in the Rat. *J Bone Joint Surg Br* 79:824-830.
29. Kawakami T (2001) Immunohistochemistry of BMP-Induced Heterotopic Osteogenesis. *J Hard Tissue Biol* 10:73-76.

30. Sandeep Paul, Simone Schindler, Dion Giovannone, Alexandra de Millo Terrazzani, Francesca V. Mariani, J. Gage Crump Beresford WA (2016) Ihha induces hybrid cartilage-bone cells during zebrafish jawbone regeneration 143:2066–2076.
31. Sato Y, Hayashi T, Hamazima S, Asakura M, Abe A, Kawai T (2013) Long-term observation of ectopic bone formation using in vivo microcomputed tomography. Journal of Hard Tissue Biology 22:343-350.

図の説明

図 1. BMP 誘導性異所性骨外面の観察と石灰化についての観察

- A) 7 日, 10 日, 2 週, 4 週, 6 週後の BMP 誘導性異所性骨の実体顕微鏡像. スケールバー, 1 mm.
- B) 7 日, 10 日, 2 週, 4 週, 6 週後に採取した BMP 誘導性異所性骨の HE 染色像 (矢状断面). スケールバー, 400 μ m.
- C) 各時期の BMP 誘導性異所性骨の μ CT の矢状断面を示す. スケールバー, 1 mm.

図 2. BMP 誘導性異所性の骨形成の定量的解析と軟骨形成の観察

- A) 7 日, 10 日, 2 週, 4 週, 6 週後の BMP 誘導性異所性骨の骨量等計測の結果を示す (day10 $n=6$, day14 $n=9$, day28 $n=8$, day42 $n=8$, * $P < 0.01$).
- B) 7 日, 10 日, 2 週後の BMP 誘導性異所性骨のトルイジンブルー染色像 (矢状断面). 赤い点線は軟骨として指定したエリアを示す. トータルエリアに占める軟骨エリアの割合 (%) 計測した (day7 $n=6$, day10 $n=6$, day14 $n=9$, * $P < 0.01$).

図 3. BMP 誘導性異所性骨におけるスクレロスチン発現

- A) 7 日, 10 日, 2 週, 4 週, 6 週後に採取した BMP 誘導性異所性骨のスクレロスチンの免疫染色像 (矢状断面弱拡大). スケールバー, 400 μ m.
- B) 7 日, 10 日, 2 週, 4 週, 6 週後に採取した BMP 誘導性異所性骨のスクレロスチンの免疫染色像 (矢状断面強拡大). 骨基質中の茶色の細胞はスクレロスチン陽性の軟骨細胞 (青矢印) および骨細胞 (緑矢印) を示す. 黄色の基質部はスクレロスチン陽性の基質部 (点線部) を示す. 6 週後のみ黒枠部の拡大像を示す. スケールバー, 40 μ m.

図 4. BMP 誘導性異所性骨における骨芽細胞と破骨細胞の観察

7 日, 10 日, 2 週, 4 週, 6 週後に採取した BMP 誘導性異所性骨の ALP

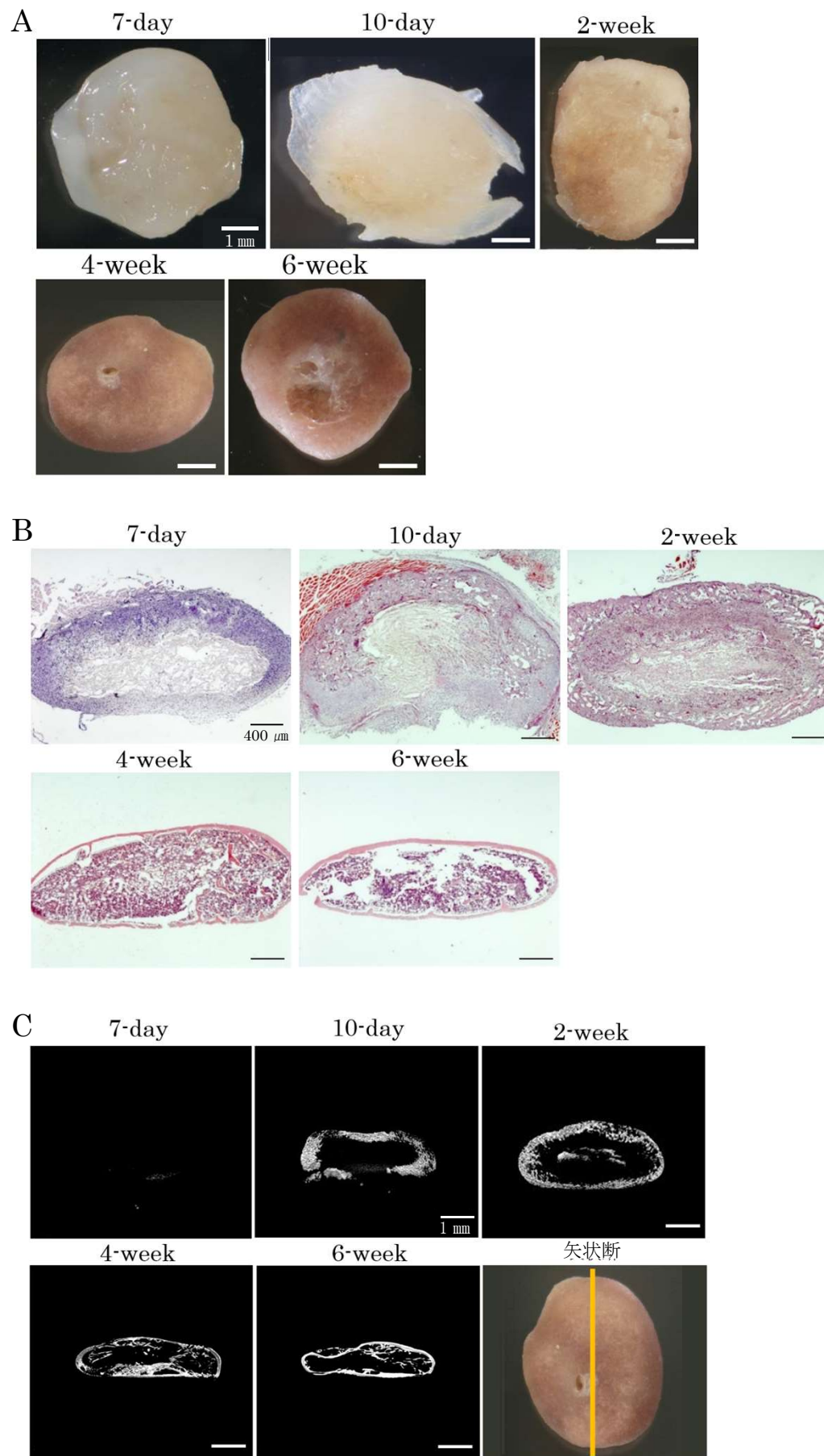
と TRAP の二重染色像（矢状断面）. 骨表面と骨基質中の茶色の細胞は ALP 陽性の軟骨細胞（青矢印）および骨芽細胞（黒矢印）を示す. 骨表面の赤色の細胞は TRAP 陽性破骨細胞（赤紫矢印）を示す.

図 5. BMP 誘導性異所性骨における DMP-1 および FGF-23 の発現

- A) 2 週, 4 週, 6 週後に採取した BMP 誘導性異所性骨の DMP-1 の免疫染色像（矢状断面）. 骨基質中の茶色の骨細胞は DMP-1 陽性の骨細胞を示す（緑矢印）. スケールバー, 100 μm , 50 μm .
- B) 2 週, 4 週, 6 週後に採取した BMP 誘導性異所性骨の FGF-23 の免疫染色像（矢状断面）. 骨基質中の茶色の細胞は FGF-23 陽性の骨細胞を示す（緑矢印）. スケールバー, 100 μm .

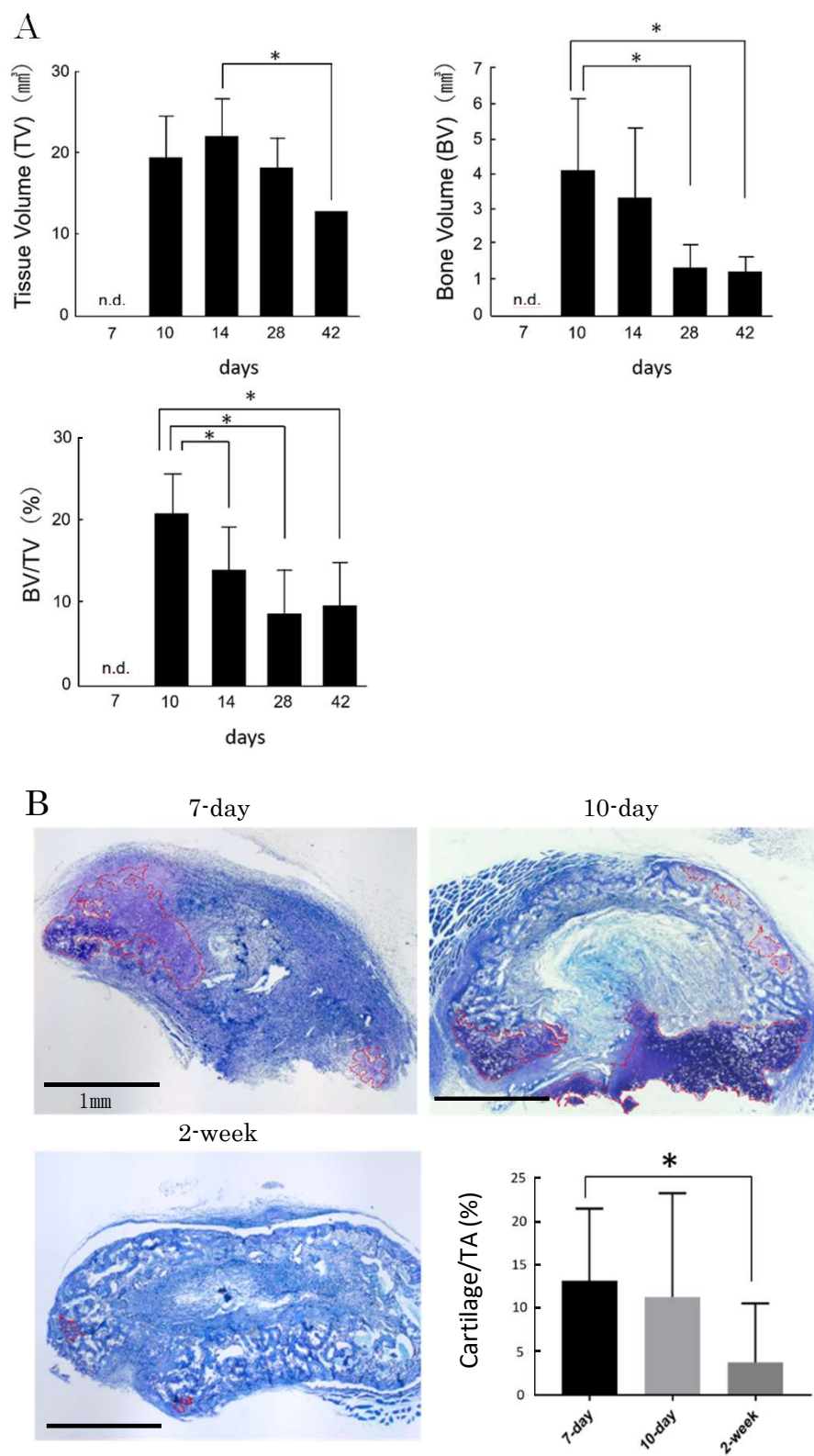
図 6. マウス関節軟骨におけるスクレロスチンの発現

- A) 大腿骨の関節軟骨のスクレロスチンの免疫染色とトルイジンブルーの二重染色像. メタクロマジー陽性を示す関節軟骨内の石灰化軟骨層において, 茶色に染色されるスクレロスチン陽性の軟骨細胞を青矢印で示す. スケールバー, 100 μm .
- B) 黒枠部の拡大像を示す. スケールバー, 10 μm .



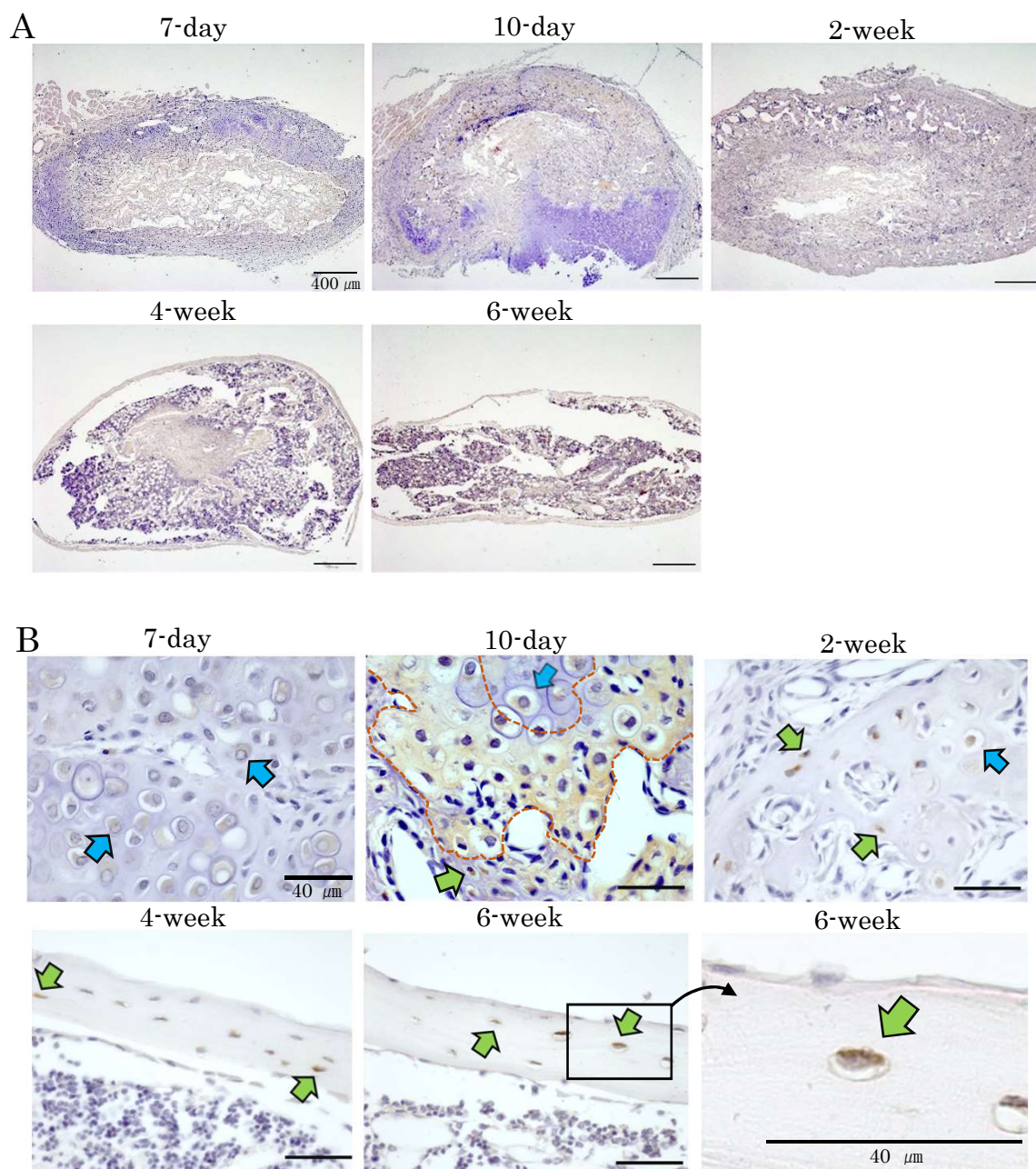
BMP誘導性異所性骨外面の観察と石灰化についての観察

図1 松下雅衣

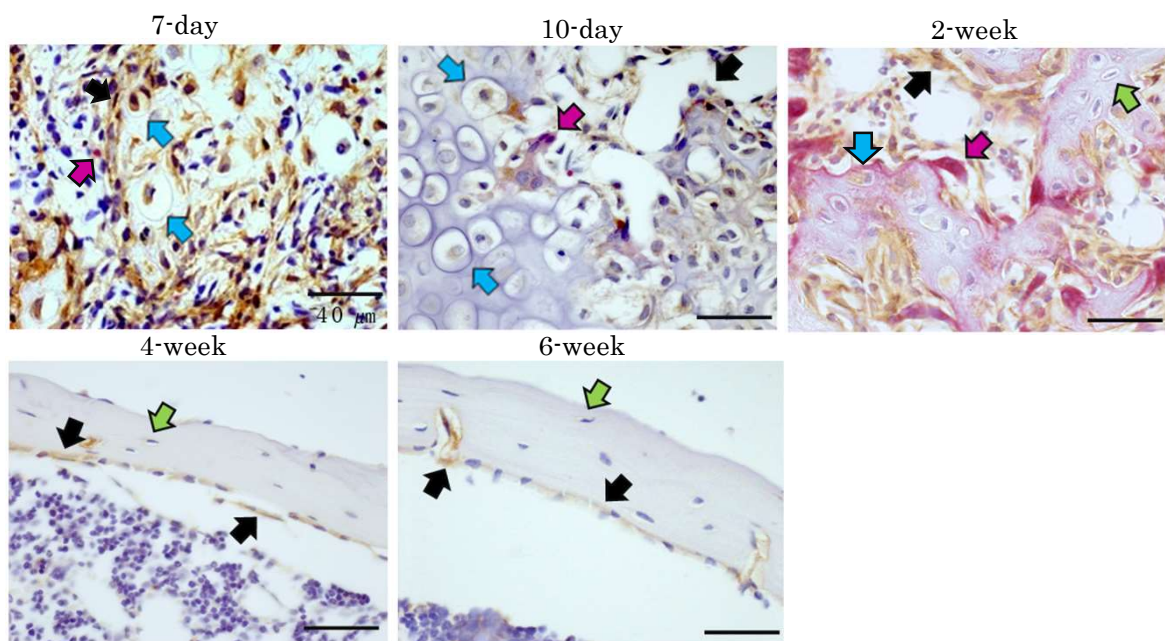


BMP誘導性異所性の骨形成の定量的解析と軟骨形成の観察

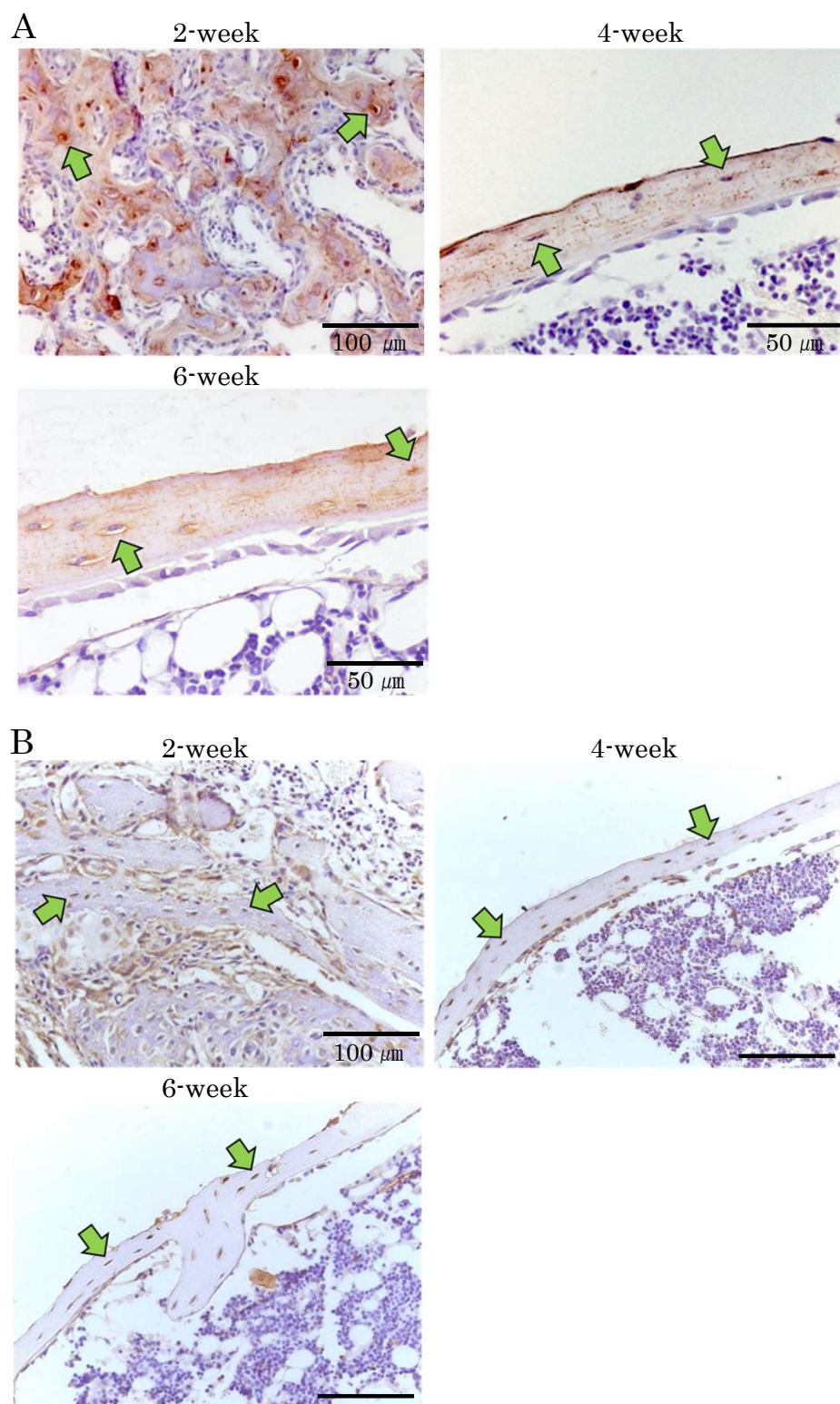
図2 松下雅衣



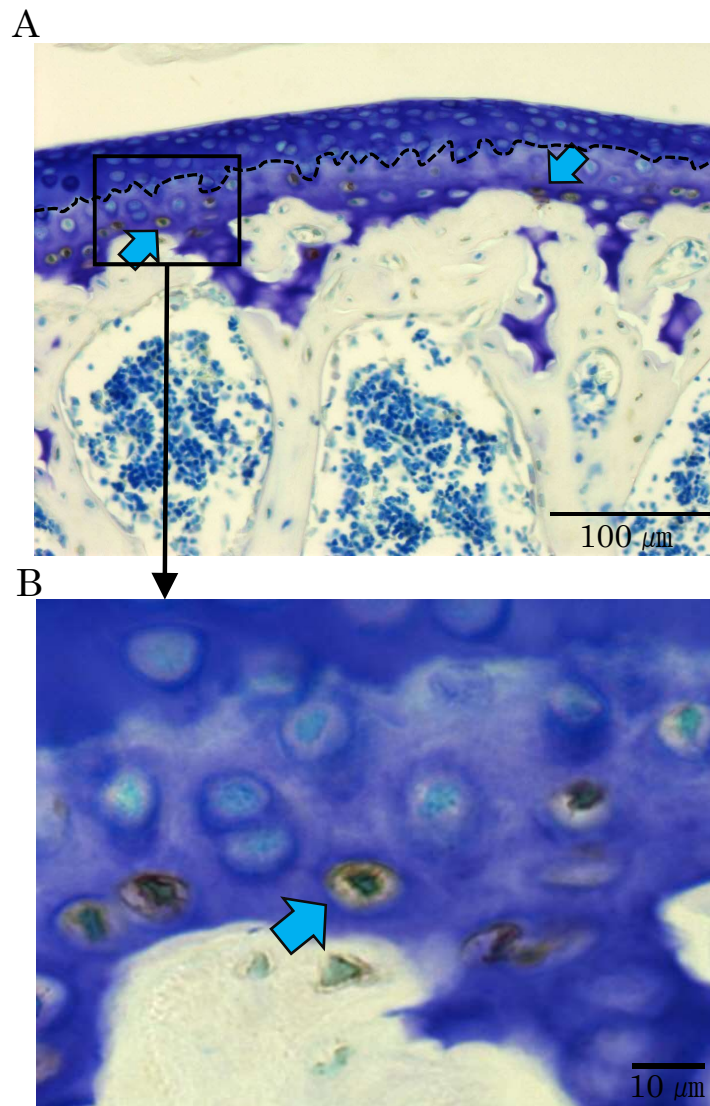
BMP誘導性異所性骨におけるスクレロスチン発現



BMP誘導性異所性骨における骨芽細胞と破骨細胞の観察



BMP誘導性異所性骨におけるDMP-1およびFGF-23の発現



マウス関節軟骨におけるスクレロスチンの発現