

〔総説〕 松本歯学 25 : 101~112, 1999

key words : 骨形成因子 (BMP) — 骨形成 — 担体 — 類軟骨 — 類軟骨性骨化

骨形成因子 (BMP) と骨形成

川上敏行

松本歯科大学 口腔病理学教室 (主任 枝重夫教授)

Bone Morphogenetic Protein (BMP) and Bone Formation

TOSHIYUKI KAWAKAMI

*Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental University School of Dentistry
(Chief: Prof. S. Eda)*

Summary

Bone morphogenetic protein (BMP) is an important bioactive protein. BMP was first described by Urist (1965) and has been investigated for its heterotopic osteogenetic properties. rhBMP has been identified by genetic engineering techniques and the time will come when BMP can be synthesized in large quantities and used in clinical practice such as in dental fields. It is well known that a proper carrier is necessary for BMP delivery system. Many materials, such as insoluble bone matrix, collagen and ceramics have been tested as BMP carriers. It has been stated that BMP induces undifferentiated mesenchymal cells to become chondrocytes in the first stage of the BMP-induced heterotopic osteogenesis. The cartilage is replaced by bone in a manner similar to that of normal endochondral ossification. It is suggested that the BMP-induced bone occurs through an endochondral-like ossification; however, the cell differentiation patterns differ from those of the normal endochondral ossification process. On the other hand, intramembranous ossification is observed in some cases. These reports indicate the intramembranous and endochondral ossification occurred independently in both composite systems. Our histopathological, histochemical, immunohistochemical and *in situ* hybridization findings of BMP-induced heterotopic osteogenesis are as follows: The examining histopathological features of chondroid bone are more like bone than cartilage, but cells in the chondroid bone matrix were not distinguishable from chondrocytes. Round chondrocyte-like cells and smaller osteocyte-like cells coexisted in the chondroid bone matrix. Both typical matrix proteins of cartilage (type II collagen) and bone (type I collagen and osteocalcin) were detected in the matrix of "chondroid bone" in the early phase of BMP-induced heterotopic osteogenesis. These results seem to be a third ossification pattern, "transchondroid bone formation". Furthermore, BMP was suggested to be applicable in clinical dental practice if a suitable and delivery system can be utilized at a future date.

はじめに

歯科を初め整形外科などの領域における大きな課題の一つとして局所的な骨組織の再建がある。これらのために燐酸カルシウム系のセラミックス、ヒドロキシアパタイト (HA)、リン酸三カルシウム (TCP) など多くの人工的な移植材が開発・研究されてきた¹⁾。しかしこれらには、いわゆる骨伝導能はあるものの、一般的には骨誘導能はないものと考えられている²⁾。したがって生体内において骨組織を積極的に新生誘導する材料の開発が必要であることは明らかである。

TGF- β スーパーファミリーに属し細胞増殖因子の一つである骨形成因子 bone morphogenetic protein, BMP は、皮下や筋肉などの組織内において、異所性の骨組織を形成する活性を持っている。そのことにより、先に述べたように生体内において骨組織を積極的に新生誘導する (図1) という条件を満たすものとして大いに注目されているのである。

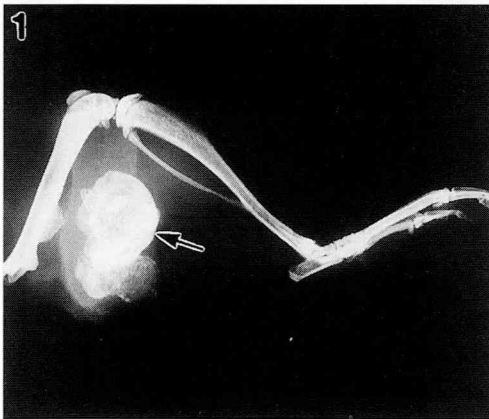


図1：マウスの大腿部筋膜下に BMP を埋入すると類円形の骨組織 (矢印) が形成される (14日, 軟X線写真)。

なお BMP の名称については、osteogenin, osteoinductive factor (OIF)³⁻⁵⁾、などとも言われ、また本邦では、骨形成因子、骨形成タンパク質、骨誘導因子、骨誘導タンパク質⁶⁻⁸⁾ など、多くの名称で呼ばれているが、本稿では BMP と呼ぶことにする。

BMP 研究の背景

骨折を起こした場合には、ギプスで固定することにより、自然に治癒することは周知の事実である。この際、骨折局所において多数の骨芽細胞が増殖し、骨組織が形成される。この場合の骨芽細胞は、骨表面の骨膜にある骨芽細胞の前駆細胞から直接骨芽細胞に分化し骨基質を形成するもの (膜内骨化) と、骨折局所の近傍に存在する未分化間葉系の細胞が骨芽細胞の前駆細胞に分化し、軟骨細胞または骨芽細胞に分化する場合とがある。軟骨細胞に分化した場合には、一旦軟骨が形成されるが、最終的には吸収され骨組織と置換される (軟骨内骨化)。しかしこれらの際の骨芽細胞の前駆細胞の増殖や、未分化間葉系の細胞の骨芽細胞の前駆細胞への分化の機構は明らかでなかった。そこでこれらを制御する因子が、骨組織に内在しているはずであるとの仮説のもと、1940年代から多くの研究者が競い合って追究していた。

Urist は1950年代から異所性骨組織の形成に関する研究を進めており、ラットの骨折治癒部から採取した線維性軟骨を凍結させた後、ラットの前眼房に移植すると、骨組織が誘導されることを1952年に発見した⁹⁾。また、1961年に Goldhaber¹⁰⁾ はマウスの頭蓋冠を diffusion chamber に容れて、マウスの皮下組織内に埋入すると chamber の外側に新生骨が誘導されることを報告した。これらの研究結果は、骨組織中に存在する何らかの因子が異所性の骨誘導を惹起していることを強く示唆していた。

以上のような背景の中で、Urist らが BMP 研究の画期的な基礎となる一編の論文を Science に発表したのは1965年のことである¹¹⁾。すなわち、牛骨の0.6 M 塩酸脱灰後の不溶性成分 (脱灰骨基質) をラットの皮下組織内に埋入し骨組織を形成させ、脱灰骨基質に異所性の骨形成を誘導する因子の存在を明らかにした。最近では、各種の細胞増殖活性を持つ物質が分離・特定され、成長因子ないし増殖因子と呼ばれている。その多くは比較的 low molecular weight のタンパク質である。現在では、その遺伝子構造と発現機構が精力的に追究されており、これらの因子の作用は、ただ単に細胞の増殖を促すのみというような単純なものではないことが分

かっている。例えば transforming growth factor- β (TGF- β) は、間葉系の多くの細胞に対しては増殖を促進するが、上皮細胞に対しては、強い増殖抑制作用を示す。さらに、多種多様な細胞に対してそれぞれの分化マーカーの発現を促進したり、また逆に抑制したりといった多彩な作用をしているようである¹²⁾。

以来この活性物質を同定する試みが続けられた結果、骨基質に含まれる活性物質はタンパク質性の因子であることが明らかになり、Uristらは1971年にこの骨誘導活性を持つタンパク質に対し bone morphogenetic protein (BMP) と命名した¹³⁾。その後 Urist は BMP の精製から臨床応用まで、極めて多岐にわたる膨大な研究業績を残しており、その結果として BMP 研究のパイオニアとして尊敬を集め、またオピニオンリーダーとして活躍している。1988年5月にはアメリカ合衆国テキサスにおいて、Urist の業績を讃え “Bioactive Factors in Bone Development and Repaire : A Conference in Honor of Marshall R Urist (Kerrville, Texas, May 15-18, 1988)” と題する国際カンファレンスが行われたほどである。その後、BMP 本態の追究が多くの研究者によって行われたが、長期にわたり BMP の化学的構造は不明のままであった。

1988年から90年にかけて、Genetics Institute の Wozney ら¹⁴⁾ および Celeste ら¹⁵⁾ によって、*in vivo* での骨誘導活性を指標として BMP を精製し、その決定した一部アミノ酸構造をもとに、ヒトの BMP 4種の cDNA がクローニングされた。BMP-1を除くその他の BMP はその全てにおいて C 末端に類似の構造を有しており、この共通の構造は、細胞の分化や個体の発生に重要な働きをすることが知られている transforming growth factor- β (TGF- β) スーパーファミリーによく保存されている構造であることから、BMP も TGF- β スーパーファミリーの仲間であることが明らかとなった (表1)。以降少なくとも、15以上の BMP がクローニングされ¹⁶⁾、その他のものを含め、TGF- β スーパーファミリーの中に BMP ファミリーを形成している¹⁷⁾。BMP 遺伝子のクローニング以降においては、その研究は急激に発展し、とくに発生学分野における研究から、これは形態形成に極めて重要な因子であ

表1 : TGF- β スーパーファミリーのメンバー

TGF- β ファミリー
TGF- β 1-5
BMP ファミリー
BMPs, DPP, 60 A, GDFs, Vg-1, etc
インヒビン/アクチビンファミリー
インヒビン, アクチビン, etc
MIS ファミリー, etc
MIS

ることが明らかになっている。すなわち、BMP は単に骨組織の代謝調節にとどまらず、多彩な生理活性機能を有していることが示唆されている。

BMP の臨床応用のための担体の必要性

さて BMP は、冒頭にも述べたように口腔顎顔面外科や整形外科などにおける骨欠損部再建のためには、極めて有効である。前述のとおり1988年から90年にかけて、またそれ以降において遺伝子組み替え技術により、ヒト BMP の合成 (ヒトリコンビナント BMP, rhBMP) に成功したことから、BMP の臨床応用への道は大きく開けたはずであるが、未だ臨床応用の段階には至っていないのが現状である^{14,15)}。

ヒトの BMP が遺伝子組み替え技術によって合成されたが、合成されたごく微量の rhBMP のみでその活性を有効に発揮させることは不可能である。合成・精製されたごく微量の rhBMP を生体内に埋入しても、活性が得られぬ間に吸収されてしまうからである。BMP によって局所に誘導骨が形成されるためには、少なくとも一定期間 BMP を局所に留めておく必要がある。よってこれらの機能を持つ担体 (carrier) が必要となる。

担体研究の初期段階において、もっぱら用いられていたものは脱灰骨基質から BMP を抽出した残渣 (不溶性骨基質 : insoluble bone matrix, IBM) であった¹⁸⁻²⁰⁾。BMP はこの IBM との組合せでその活性を発揮しており、実験的には極めて優れた担体であった。しかし、この IBM には少なからず多種多様な物質が含まれていることから、その免疫原性が故に、臨床応用に無理なことは周知の事実である。そこで、臨床応用に向けて適切な担体の開発が急務となっているのである。BMP に活性を発揮させる担体としての必要条件は、生体為害性および免疫原性がなく、生理的に

不溶性で、なおかつその活性を阻害しないことなどである。さらに BMP が組織の細胞に作用する一定時間それを保持する、いわゆる薬剤の徐放系 (drug delivery system, slow local release system) としての機能を持っていなければならない。また、大きな骨欠損部に应用する場合などにおいては、生体内に埋入する場合のフレーム材となるものも含まれよう。以上の観点から、多くの研究者によって多種多様な担体が報告されてきた。

すなわち骨組織の構成成分ないしはその類似化合物の中から種々の性状のコラーゲン²¹⁻²⁴⁾やヒドロキシアパタイト (HA)、リン酸三カルシウム (TCP) など²⁵⁻³⁰⁾がまず検討され、その有効性が明らかにされた。またフィブリン³¹⁾やスクアラン³²⁻³⁵⁾なども有効であることが報告された。一方、人工的なものとしては、線維性ガラス膜²²⁾なども極めて有効であると考えられる。さらにフレーム材としてその効力を期待されるチタン³⁶⁾などの金属が、また、その被吸収性を期待される合成高分子では、ポリ乳酸とポリエチレングリコールとの共重合体³⁷⁾などが挙げられる (表2)。

以上に挙げたような種々の担体を用いて異所性の骨組織形成実験を行うと、例えば多孔性ブロック状 HA を用いた場合には、その小孔内に膜内骨化のみが惹起され、軟骨様の組織は全く形成されないようである^{20, 26, 38)}。また線維性ガラス膜を

担体にした場合には、軟骨組織はもっぱらその膜内に、骨組織は膜の表面に、それぞれ別れて形成されることが明らかにされている。この現象は、線維性ガラス膜の網目の大きさが、未分化な細胞の侵入には充分であるが、血管の侵入を阻害しているためと考えられている³⁸⁾。これらの事実は、担体はただ単に BMP の徐放系としてだけの働きではなく、細胞分化の環境を提供していることを示唆している。したがって BMP などの細胞増殖因子を組織再建のために臨床応用する場合には、適切な担体の開発とその組合せの選択が極めて重要である。

BMP の誘導する異所性骨組織の病理

BMP の誘導する異所性骨組織、これについては最初に IBM を担体とした場合、あるいは部分精製段階の BMP を用いた実験系における組織像について述べたい。まず埋入 1 週で軟骨様細胞の増殖があり、軟骨様基質が形成され (図2)、それに引き続いて 2 週頃から軟骨内骨化の過程、すなわち軟骨様組織が骨組織に置換、3 週もすると、造血骨髄を伴う骨組織 (図3) が形成されるという観察結果から、一般には、軟骨内骨化の過程をとるものとされてきた^{18, 19)}。しかしこれはただ単に、まず軟骨様組織の増殖があり、それに引き続いて骨組織が形成される、との観察事実のみからであり、この骨形成機構についての詳細な論

表2：報告されている主要な BMP 担体および関連文献一覧

担体名	代表的な文献	関連文献#
不溶性脱灰骨基質 (IBM)	Sampath <i>et al.</i> 1981 ¹⁸⁾	19, 20
コラーゲングル	Takaoka <i>et al.</i> 1991 ²¹⁾	
コラーゲンビーズ	Kuboki <i>et al.</i> 1993 ²²⁾	
線維性コラーゲン膜	Sasano <i>et al.</i> 1993 ²³⁾	24
ヒドロキシアパタイト (HA)	Kawamura <i>et al.</i> 1987 ²⁵⁾	
多孔性顆粒状 HA	Kuboki <i>et al.</i> 1995 ²⁴⁾	20, 26
多孔性ブロック状 HA	Ono <i>et al.</i> 1992 ²⁷⁾	
リン酸三カルシウム (TCP)	Urist <i>et al.</i> 1984 ²⁸⁾	
HA・TCP コラーゲン複合体	Bentz <i>et al.</i> 1991 ²⁹⁾	
珊瑚レプリカ HA	Rapamonti <i>et al.</i> 1992 ³⁰⁾	
フィブリン糊	Kawamura <i>et al.</i> 1983 ³¹⁾	
スクアラン	Kawakami <i>et al.</i> 1993 ³²⁾	33, 34, 35
ポリ乳酸・ポリエチレングリコール共重合体	Miyamoto <i>et al.</i> 1993 ³⁷⁾	
線維性ガラス膜	Kuboki <i>et al.</i> 1995 ²²⁾	
チタン	Kawai <i>et al.</i> 1993 ³⁶⁾	

議は為されないままに來たようである。一方 rhBMP ないしは高度に精製した BMP を用いた場合においても、担体によっては BMP により形成された組織塊の部位により、軟骨組織の形成と同時に骨組織も形成され、また軟骨が形成されずに直接骨組織が形成されている事例のあることなどが明らかにされている。例えば、Sasano ら (1993)²⁹⁾ は、線維性コラーゲン膜の担体としての有効性を検討した際における骨形成状況について、部分的にはあるが、軟骨形成を伴わない直接骨化を観察した。これは、線維性コラーゲン膜を用いた場合には、BMP による細胞の分化誘導が方向性と連続性を持っていたために明瞭に観察されたものと考えられる。さらに、多孔性顆粒状 HA を担体とした場合には、形態学的検索により、膜内骨化に類似の骨形成過程をとり直接骨形成が優位であるとの報告がある^{20,26)}。すなわち埋入 3~5 日で未分化間葉細胞が徐々に侵入し、7 日後には一部に骨形成が確認されたが、軟骨細胞は初期より確認されていない。2 週以上で HA 表面に接して線維性の骨組織が形成されると言う。これらのことは、生化学的な分析においても、軟骨の指標である II 型コラーゲンの消長について、IBM を担体とした場合には、1 週でピークを示し、以後暫時減少していくのに対し、多孔性顆粒状 HA を用いた場合には、その初期より II 型コラーゲンは全く検出されなかったことから裏付けられる。したがってこれらの報告は、従来よりの「BMP による異所性の骨形成過程は、軟骨内骨化である。」との常識を覆すものであろう。

我々研究グループでは、BMP の臨床応用に向けて基礎的な研究を、牛骨基質から抽出した部分精製段階の BMP を用い³⁹⁾、とくに流動性を持った担体の開発・評価を行ってきた。その中で化学的に極めて安定した物質で、生体に対する為害性のない、主として化粧品剤の基剤として利用されているスクアランについて着目し⁴⁰⁾、これを BMP 担体として検討した上で、その有効性について報告した³²⁻³⁵⁾。これら一連の組織学的検索において我々は、直接骨形成は、線維性コラーゲン膜を用いた場合や多孔性顆粒状 HA の場合に限らず、どんな場合でも起こり得るものであることを観察した (図 4, 5)。すなわち部分精製段階の BMP だけを用いた実験系において、2 週において軟骨

表 3 : 骨化様式 (ossification modes)

(1) 直接骨化 (direct ossification)
① 膜内骨化 (intramembranous ossification)
② 膜性骨化 (membranous ossification)
③ 線維性骨化 (fibrous ossification)
・ 軟骨外骨化 (perichondral ossification)
(2) 間接骨化 (indirect ossification)
① 軟骨内骨化 (endochondral ossification)
② 軟骨性骨化 (cartilaginous ossification)
③ 内軟骨性骨化 (intracartilaginous ossification)

外骨化と言う形式で直接骨化が起こっていることを、さらにスクアランを担体とした場合にも同様に、2 週で軟骨様細胞の増殖があり、その周囲に軟骨外骨化が観察されることを明らかにした³⁹⁾。

以上のことは、BMP による異所性の骨形成は少なくとも二つの骨形成様式が関与していることを示している。表 3 に示す直接骨化 (膜内骨化) と間接骨化 (軟骨内骨化) の両者である。この表で、(1) 直接骨化 (direct ossification) とは、骨芽細胞が直接的に骨基質を形成自らはその基質中に埋没して骨細胞となるような骨形成様式を言う。そして表中の① 膜内骨化 (intramembranous ossification)、② 膜性骨化 (membranous ossification)、③ 線維性骨化 (fibrous ossification) などはすべてその同義語である。それに対し、(2) 間接骨化 (indirect ossification) とは、骨の形成に先立ち硝子軟骨が生じ、それが二次的に骨組織に置き換えられるものである。① 軟骨内骨化 (endochondral ossification)、② 軟骨性骨化 (cartilaginous ossification)、および③ 内軟骨性骨化 (intracartilaginous ossification) などは、それらを表す同義語である。なお、我々が報告したように³⁵⁾、同じ直接骨化に関する用語でも、軟骨外骨化 (perichondral ossification) と言うものは増殖した軟骨組織の周囲に直接骨化が起こることを意味する用語である。

第三の骨化様式 : 類軟骨性骨化 (transchondroid bone formation)

さて先にも記したように、BMP による異所性の骨形成は、二つの骨形成様式が関与していることとされている。しかしとくに軟骨細胞が出現する軟骨内骨化と考えられている骨化様式に関し

て、通常のものとは若干異なる様々なデータが公表されている^{41,42)}。Nagaiら^{43,44)}は、BMPによる実験的な異所性骨形成過程について、骨基質タンパク質の発現を免疫組織化学的に検索すると共に、その mRNA の発現を *in situ* hybridization 技法によって追究した結果、形成される骨・軟骨組織は、軟骨内骨化に類似の経過を辿るが、その基質成分と細胞分化の様式は、生理的なものと異なっていると言う。さらに Sasanoら²³⁾は、BMPの誘導した軟骨は、I型コラーゲンとII型コラーゲンの両者をその基質に持っており、軟骨と骨の中間的な組織であるから“軟骨様組織 (chondroid tissue)”として分類すべきであると報告している。

我々は BMP の誘導する異所性の骨組織形成過程の、とくに初期における TGF- β 1 と、その mRNA の発現状況を免疫組織化学的、ならびに *in situ* hybridization⁴⁵⁾によって追究した。その結果、これらの発現状況は、生理的な軟骨内骨化におけるそれと異なっていることを明らかにした^{46,47)}。以上の事実から、我々は BMP の誘導する異所性の骨形成過程は生理的な軟骨内骨化の過程 (とくにその初期のもの) とは異なっていると考えたのである。

表4：第三の骨化様式 (third ossification mode)

Yasui et al. 1997 :

類軟骨性骨化 (transchondroid bone formation)

Yasuiら (1997)⁴⁸⁾は、ラットを用いた仮骨延長術のモデル実験において、“類軟骨 (chondroid bone)”を形成する“第三”の骨化様式と言うべきものの存在を提唱した (表4)。この軟骨と骨の中間的な性格を示す組織“類軟骨 (chondroid bone)”については、古くから認知されていたが長い間あまり省みられなかった。最近、ある肥大軟骨細胞がさらに骨芽細胞様細胞に分化し、初期の骨形成に参加しているとの研究結果が、Roachら^{49,50)}によって報告された。さらに Yasuiら⁵¹⁾は、“chondroid bone”の基質中には軟骨細胞様の細胞と骨細胞様の細胞が共存しており、それぞれを明確に区別できないと述べている。また Nagaiらも軟骨細胞様細胞は軟骨細胞と骨芽細胞の両者の機能を併せ持っており、その産生する組織

は正常な軟骨組織と言うよりは、Sasanoら²³⁾の言う軟骨と骨との中間的な組織“chondroid tissue”で、“chondroid bone”ないしは“chondroosseous tissue”と呼んでいる^{42,43)}。

また我々は BMP 誘導の異所性骨組織について、組織学的ならびに組織化学的に詳細に検討したところ、封入細胞は軟骨細胞と区別できないが、軟骨組織と言うよりはより骨様組織であること、さらに類円形の軟骨細胞様細胞と小さな骨細胞様細胞が、これらの類軟骨基質内に共存していることを報告した⁵²⁾。また BMP 埋入から3週の、比較的成熟した骨組織基質内には軟骨様のモザイクパターン (図6, 7) が残存しており、これはアザン染色ならびにトルイジン・ブルー (TB) によっても明瞭に確認された (図8, 9)。基質構成成分についての免疫組織化学的検討によっても“類軟骨 (chondroid bone)”の基質には、II型コラーゲンばかりでなく、骨組織を特徴づける基質タンパク質、I型コラーゲンおよびオステオカルシンも同時に検出され (図10, 11)、軟骨と骨の両者の特徴を持っていた⁵³⁻⁵⁷⁾。これらの事実は Nagaiらの研究グループも明らかにしている⁴²⁻⁴⁴⁾。そこで、我々はこれらの事実から、この“類軟骨 (chondroid bone)”を形成する骨化様式は、Yasuiらの提唱する第三の骨化様式“類軟骨性骨化 (transchondroid bone formation)”⁴⁸⁾であり、類軟骨を形成した後に骨組織へ移行していると考えたのである。BMPの誘導する異所性骨組織形成について、この“類軟骨性骨化”の概念を導入したのは我々が最初であるが^{52,54-57)}、ほぼ同時期に中川らによってもその考えが示された⁵⁸⁾。

この第三の骨化様式“類軟骨性骨化 (transchondroid bone formation)” (表4) は、軟骨内骨化と膜内骨化の橋渡し機構的なものであると言えよう⁴⁸⁾。これは BMP による異所性骨形成に特異なものではなく、仮骨延長術の他、骨折の場合など、急速に骨形成が行われる場合などに起こると考えられる⁴⁸⁾。これと類似の現象について、ある組織学の教科書⁵⁹⁾には、“化生的骨形成 (metaplastic bone formation)”の名称で、軟骨組織が消滅、吸収されることなく、直ちに骨組織に転化するくる病などにおいて例外的にみられる病的な現象として記載されている。しかしその詳細な記

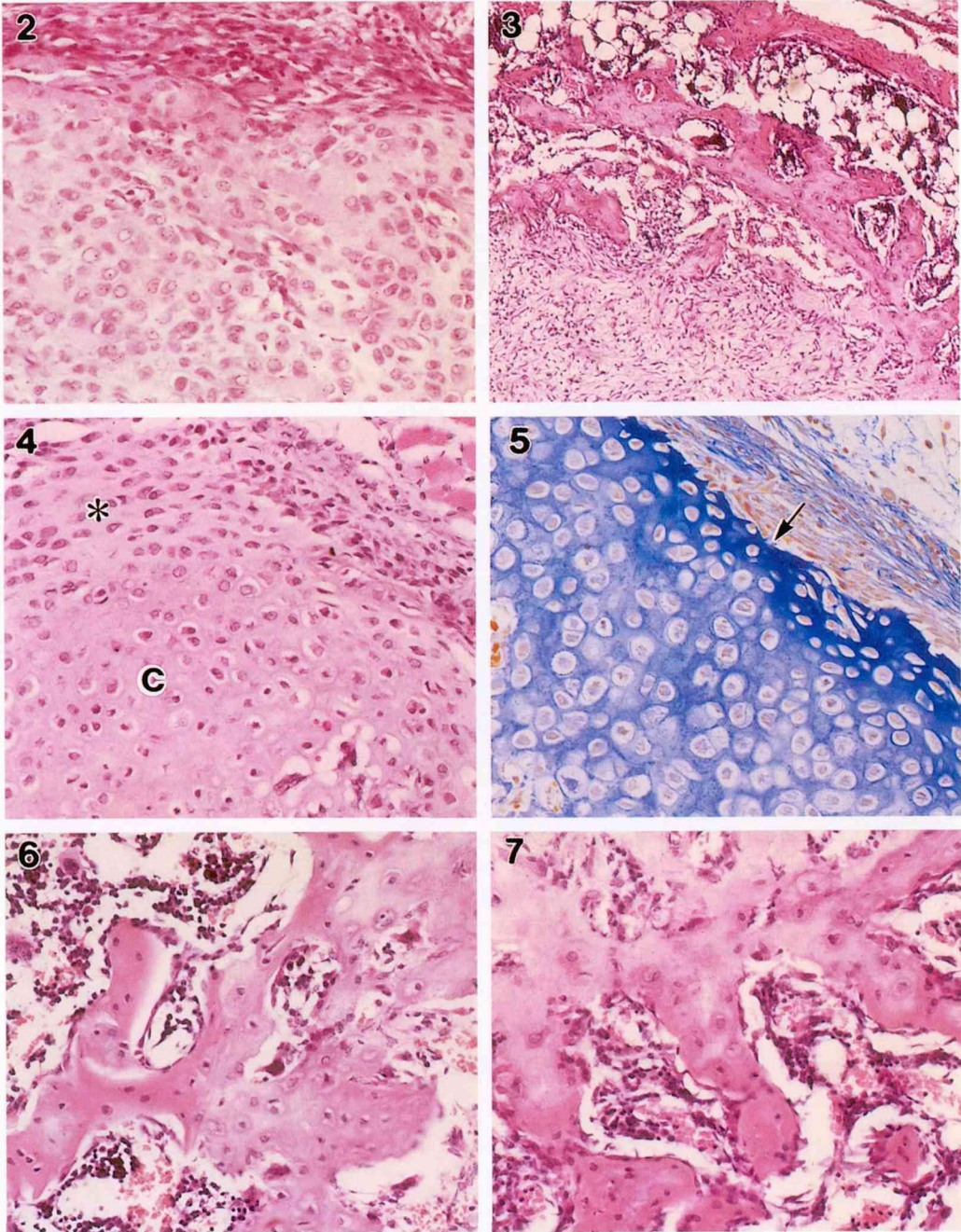


図2：未分化な軟骨様細胞の増殖（7日，HE，×200）。
 図3：骨髓組織を伴う梁状骨の形成（21日，HE，×80）。
 図4：軟骨様組織の増殖（C）があり，その周辺部には直接骨形成（*印）がみられる（10日，HE，×200）。
 図5：直接骨形成部（矢印）は濃青色を呈する（10日，Azán，×200）。
 図6：梁状の“類軟骨”基質内には軟骨様のモザイク模様がみられる（14日，HE，×20）。
 図7：梁状の基質内に軟骨細胞様の細胞と骨細胞様細胞の両者が封入されている（21日，HE，×200）。

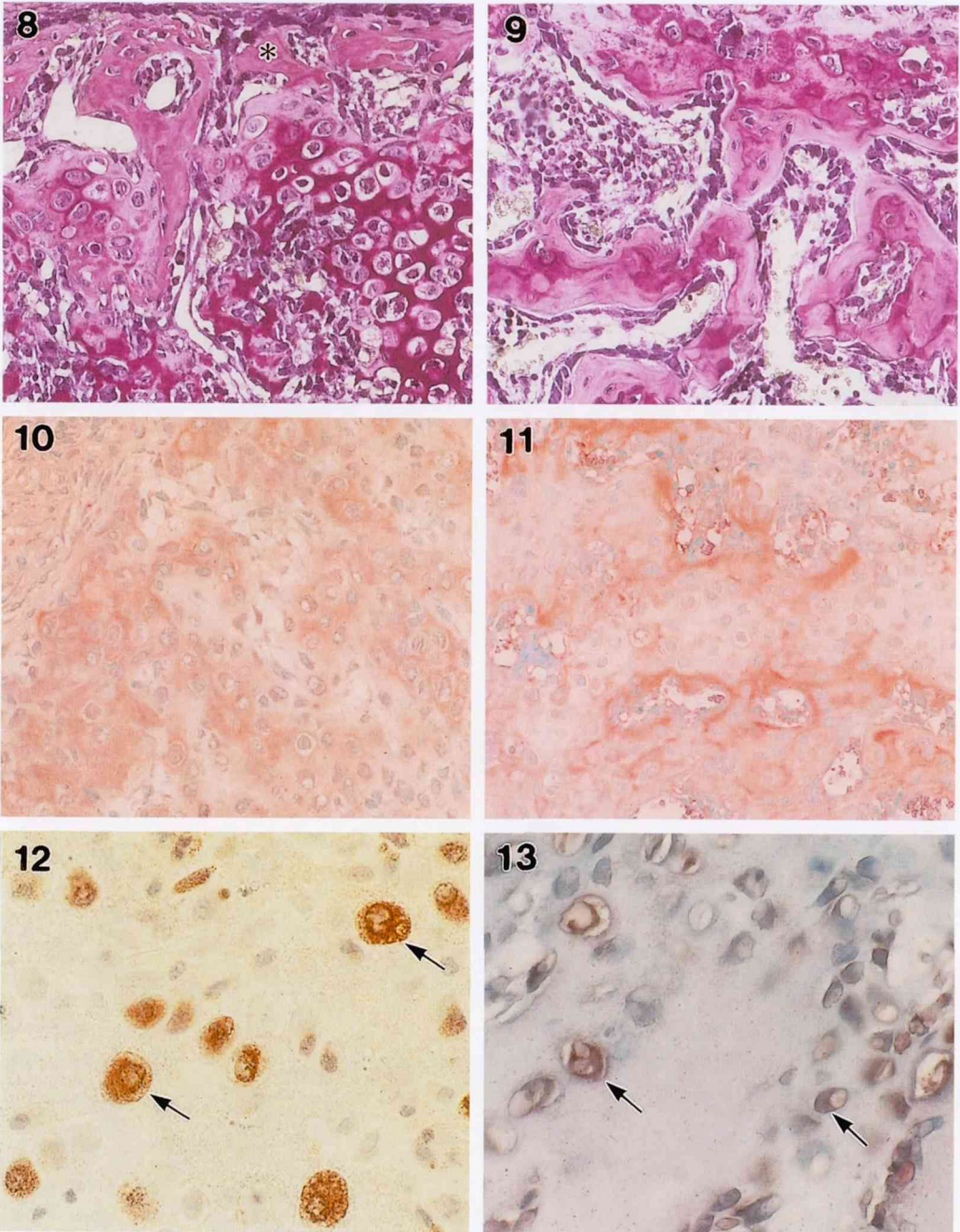


図8：“類軟骨”基質は強い異染性を示すが、周辺の直接骨形成部（*印）は示さない（14日，TB pH 4.1，×200）。

図9：梁状の“類軟骨”基質は斑状に異染性を呈する（21日，TB pH 4.1，×200）。

図10：“類軟骨”基質に陽性反応が確認される（7日，オステオカルシンの免疫染色，×200）。

図11：“類軟骨”基質に強い陽性反応が出現している（10日，オステオカルシンの免疫染色，×200）。

図12：増殖する細胞に強いTGF-β1ペプチドの発現（矢印）がある（7日，TGF-β1の免疫染色，×400）。

図13：細胞質にTGF-β1遺伝子の発現（矢印）が確認される（7日，TGF-β1遺伝子の検出，×400）。

載はなく、またこの用語では化生による直接骨形成と区別が出来ないので、適切な用語とは言えない。

また先にも記したように、我々は異所性の骨組織形成過程の、とくに初期における TGF- β 1 (図 12) と、その mRNA (図 13) の発現状況は、生理的な軟骨内骨化におけるそれと異なっていることを明らかにしている^{46,47)}。さらに、増殖する細胞に TGF- β が発現していることにより、BMP により誘導される類軟骨性骨化にみられる類軟骨形成細胞への分化は、TGF- β により制御されている可能性があることを指摘した⁶⁰⁾。これらが証明されれば、BMP によって形成される骨組織の形成機構におけるシグナリング (シグナル伝達機構) の一端を明らかにすることになり、ひいては“類軟骨性骨化 (transchondroid bone formation)”と言う第三の骨化様式を含む骨形成機構の完全解明に向けての契機となるであろう。

臨床応用への展望

多くの研究者によって、BMP の強力な骨形成作用を臨床的に応用すべく、骨形成療法を指向した基礎的な検討が行われている。Wang らによる rhBMP を用いた研究⁶¹⁾により、埋入物の単位体積当たりの BMP 量の増加が骨形成速度を早めることなどが明らかにされている。この事実は、BMP の高濃度投与は、骨形成の促進剤として有効であることを示すものと考えられる。rhBMP-2 はラット、イヌ、ヒツジ、サルなどの動物実験において、良好な骨形成活性を示し、種々の部位における骨欠損・骨退縮の局所で有効に働いた。したがって歯科領域においては、先に紹介した様な適切な担体との組合せによって、①歯周疾患による歯周組織欠損の修復、②人工歯根 (インプラント) の安定のための骨形成、③顎堤形成、および④口蓋裂の修復、などで有効な臨床応用が望まれている^{38, 62~65)}。

終わりに

TGF- β スーパーファミリーに属する多種多様な因子の中で、BMP の異所性骨形成の活性は極めて特徴的なものであり、これの作用機序、受容体 (レセプター) 以降のシグナルの伝達機構、活性の発現機構などについては、多くの研究の蓄積

を通じて解明されつつある。しかし BMP の骨形成療法の臨床応用への有効性の研究については、始まったばかりである⁶⁰⁾。将来の臨床応用に向けての基礎的研究、ならびに応用研究に期待したい。

謝 辞

本稿は、筆者が松本歯科大学口腔病理学教室において行ってきた BMP に関する一連の研究結果を基に、それに纏わる最近の話題を紹介したものである。本研究を遂行するにあたり、多くの便宜を与えられた教室主任の枝重教授に対し深謝するとともに、研究を共に行ってきた教員各位に感謝の意を表す。BMP 研究の大先達である、カリフォルニア大学ロサンゼルス校骨研究所 (UCLA Bone Research Laboratory) の Urist 教授には、一部の研究^{33,34)}において共同研究者として我々の研究結果についての議論に加わり、BMP による骨組織形成機構について考えるきっかけを与えて頂いた。ここに改めて深甚なる感謝の意を表す。また岡山大学歯学部口腔病理学講座永井教之教授ならびに愛知学院大学歯学部歯科理工学講座河合達志講師には、共同研究者としてばかりでなく BMP に関する最新の情報提供および適切な助言等を頂いたことを明記しておきたい。

本研究の一部は文部省 (日本学術振興会) 科学研究費補助金 (課題番号 #06454515, 07771646, 11877320) によって行った。

なお、本稿は1998年8月に、ストックホルムにおいて開催された第28回スカンジナビア口腔病理学・オーラルメディスン学会 (Scandinavian Fellowship of Oral Pathology and Oral Medicine (28th), Aug. 8, 1998, Stockholm, Sweden) における招待講演 “Pathology of heterotopic osteogenesis induced by bone morphogenetic protein” の原稿を骨子として、書き改めたものであることを付記する。

文 献

- 1) Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M and Eda S (1991) Subcutaneous tissue response to a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste in rats. *Med Sci*

- Res 19 : 725-7.
- 2) Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M and Eda S (1992) An experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials* 13 : 759-63.
 - 3) Bentz H, Nathan RM, Rosen DM, Armstrong RM, Thompson AY, Segarini PR, Mathews MC, Dasch JR, Piez KA and Seyedin SM (1989) Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem* 264 : 20805-10.
 - 4) Sampath TK, Muthukumaran N and Reddi AH (1987) Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by affinity chromatography. *Natl Acad Sci USA* 84 : 7109-13.
 - 5) Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Wood WI and Reddi AH (1989) Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264 : 13377-80.
 - 6) 田辺俊一郎 (1990) 骨形成因子の抽出と骨誘導実験. *日口外誌* 36 : 2659-69.
 - 7) 山口博雄 (1993) 骨形成タンパク質の精製とその精製物による骨形成過程の生化学的研究. *北海道歯誌* 14 : 26-48.
 - 8) 桜井規雄 (1993) 骨誘導因子 (BMP) の精製および骨芽細胞系細胞に対する作用に関する研究. *口病誌* 60 : 169-82.
 - 9) Urist MR and MacLean FC (1952) Osteogenic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 34-A : 443-79.
 - 10) Goldhaber P (1961) Osteogenic induction across millipore filters *in vivo*. *Science* 133 : 2065-7.
 - 11) Urist MR (1965) Bone : Formation by auto-induction. *Science* 150 : 893-9.
 - 12) Massague J, Attisano L and Wrana JL (1994) The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4 : 172-8.
 - 13) Urist MR and Strates BS (1971) Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50 : 1392-406.
 - 14) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM and Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation : Molecular clones and activities. *Science* 242 : 1528-34.
 - 15) Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen EA, Wang EA and Wozney JM (1990) Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 9843-7.
 - 16) Dube JL and Celest AJ (1996) Human bone morphogenetic protein-15, A new member of the transforming growth factor- β . *J Bone Mine Res* 11 : S 382.
 - 17) 山下英俊, 宮園浩平 (1994) TGF- β スーパーファミリーの分子生物学, 羊土社, 東京.
 - 18) Sampath TK and Reddi AH (1981) Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7599-603.
 - 19) Rapamonti U, Magan A, Ma S, Vendenheever B, Moehl T and Reddi AH (1991) Xenogenic osteogenin, a bone morphogenetic protein, and demineralized bone matrices, including human, induce bone differentiation in athymic rats and baboons. *Matrix* 11 : 404-11.
 - 20) Murata M, Inoue M, Arisue M, Kuboki Y and Nagai N (1998) Carrier-dependency of cellular differentiation induced by bone morphogenetic protein in ectopic sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27 : 391-6.
 - 21) Takaoka K, Koezuka M and Nakahara H (1991) Telo peptide-depcketed bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Orthop Res* 9 : 902-7.
 - 22) Kuboki Y, Yamaguchi H, Yokoyama A, Murata M, Takita H, Tazaki M, 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 and Nagai N (1991) Osteogenesis induced by BMP-coated biomaterials : Biochemical principles of bone reconstruction dentistry. In the bone-biomaterial interface (Davies JE ed) Toronto Univ Press. Toronto, 127-38.
 - 23) Sasano Y, Ohtani E, Narita K, Nagayama M, Murata M, Saito T, Shigenobu K, Takita H, Mizuno M and Kuboki Y (1993) BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification *in vivo*. *Anat Rec* 236 : 373-80.
 - 24) Kuboki Y, Saito T, Murata M, Mizuno M, Inoue M, Nagai N and Poole AR (1995) Two distinctive BMP-carriers induce zonal chondrogenesis and membranous ossification, respectively ; geometrical factors of matrices for cell-differentiation. *Conn Tissue Res* 32 : 219-26.
 - 25) Kawamura M, Iwata H, Sato K and Miura T

- (1987) Chondroosteogenetic response to crude matrix proteins bound to hydroxyapatite. *Clin Orthop* **217** : 281-92.
- 26) 村田 勝 (1994) 骨形成タンパク質 (BMP) による細胞分化のマトリックス依存性-多孔質ヒドロキシアパタイトにおける直接骨形成の確認. *北海道歯誌* **15** : 148-60.
- 27) Ono I, Ohura T, Murata M, Yamagishi H, Ohnuma Y and Kuboki Y (1992) A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg* **90** : 870-9.
- 28) Urist MR, Lietze A and Dawson E (1984) β -tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* **187** : 277-80.
- 29) Bentz H, Thompson AY, Armstrong R, Chang R-J, Piez KA and Rosen DM (1991) Transforming growth factor- β 2 enhances the osteoinducing activity of a bovine bone-derived fraction containing bone morphogenetic protein-2 and 3. *Matrix* **11** : 269-75.
- 30) Rapamonti U, Ma S and Reddi AH (1992) The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein. *Matrix* **12** : 202-12.
- 31) Kawamura M and Urist MR (1988) Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* **235** : 302-10.
- 32) Kawakami T, Uji H, Antoh M, Hasegawa H, Kise T and Eda S (1993) Squalane as a possible carrier of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* **14** : 575-7.
- 33) 宇治英世 (1994) 骨形成因子の担体としてのスクアランに関する病理組織学的研究. *松本歯学* **20** : 24-42.
- 34) Kawakami T, Kawai T, Takei N, Eda S and Urist MR (1996) Effect of squalane as a slow local release system for BMP. *Int Dent J* **46** : 489.
- 35) Kawakami T, Kawai T, Takei N, Kise T, Eda S and Urist MR (1997) Evaluation of heterotopic bone formation induced by squalane and bone morphogenetic protein composite. *Clin Orthop* **337** : 261-6.
- 36) Kawai T, Miki A, Ohno Y and Urist MR (1993) Osteoinductive activity of composites of bone morphogenetic protein and pure titanium. *Clin Orthop* **290** : 296-305.
- 37) Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hashimoto J and Ono K (1993) Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) block copolymer, A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* **294** : 333-43.
- 38) 久保木芳徳, 敦賀英知, 滝田裕子, 小野一郎 (1996) BMPによる細胞分化における細胞環境の影響-硬組織再建における応用. *J Hard Tissue Biol* **5** : 69-75.
- 39) 宇治英世, 川上敏行, 枝重夫, 木瀬俊彦 (1992) 骨形成因子の抽出とその生物活性. *松本歯学* **18** : 244-9.
- 40) Kawakami T, Takei N, Antoh M, Hasegawa H, Kise T and Eda S (1995) A histopathological evaluation of the safety of squalane fluid applied subcutaneously. *Med Sci Res* **23** : 512-3.
- 41) Inoue M, Qin C-L, Murata M, Akagi T and Nagai N (1995) Immunohistochemical study of heterotopic cartilage bone formation induced by BMP-FGM. *Dentistry in Japan* **32** : 19-21.
- 42) Inoue M, Qin C-L, Nojima T, Nagatsuka H, Murata M, Nosaka Y, Akagi T, Kuroda K, Mabuchi M, Hoh K and Nagai N (1996) Histopathological and immunohistochemical study of heterotopic chondro-osseous tissue formation induced by S-200 BMP. *J Hard Tissue Biol* **5** : 1-6.
- 43) Nagai N, Nagatsuka H, Murata M, Inoue M, Akagi T, Qin C-L, Nakano K, Ishiwari Y, Konouchi H, Tsujigawa H, Chigono Y and Takagi T (1995) Gene expression of bone matrix protein mRNA during BMP induced chondrogenesis and osteogenesis by *in situ* hybridization. *J Hard Tissues Biol* **4** : 15-23.
- 44) Nosaka Y, Takahashi A, Nosaka T, Onoue Y, Yasuda K, Liliana M, Murata M, Konouchi H, Takagi T and Nagai N (1996) Histological and morphometrical study of bone formation in rat subcutaneous tissue by BMP-collagen particles. *J Hard Tissue Biol* **5** : 188-94.
- 45) 川上敏行, 平岡行博, 枝重夫 (1998) Transforming growth factor- β mRNA の *in situ* hybridization による検出-異所性骨組織への応用-. 永井教之監修「形態形成・分子メカニズム研究の最新技術」, 口腔保健協会, 東京, 86-9.
- 46) 武井則之, 川上敏行, 河合達志, 吉河靖, 枝重夫 (1997) BMPによる異所性骨組織の誘導過程における TGF- β の発現. *J Hard Tissue Biol* **6** : 64-9.
- 47) Kawakami T, Hiraoka BY, Kawai T, Yoshikawa Y and Eda S (1997) Expression of transforming growth factor beta 1 peptide and its mRNA in chondrocytes in the early phase of BMP-induced

- heterotopic osteogenesis in mice. *Int J Oral Maxillofac Surg* **26** (S-1) : 212.
- 48) Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y and Nomura S (1997) Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg* **79-B** : 824-30.
- 49) Roach HI, Erenpreisa J and Aigner T (1995) Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol* **131** : 483-94.
- 50) Roach HI (1992) Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone Miner* **19** : 1-20.
- 51) Yasui N, Ono Konomi H and Nagai Y (1984) Transitions in collagen types during endochondral ossification in human growth cartilage. *Clin Orthop* **183** : 215-8.
- 52) Kawakami T, Kawai T, Kimura A, Hasegawa H, Yoshikawa Y and Eda S (1998) Transchondroid bone formation displayed in BMP-induced heterotopic osteogenesis. *J Hard Tissue Biol* **7** : 21-6.
- 53) Kimura A, Kawakami T, Hasegawa H and Eda S (1998) Immunohistochemical localization of bone matrix proteins in heterotopic osteogenesis by BMP. *J Hard Tissue Biol* **7** : 72.
- 54) 川上敏行, 木村晃大, 長谷川博雅, 枝重夫 (1998) BMPの誘導する異所性骨形成にみられる類軟骨性骨化: Transchondroid bone formation. *日口外誌* **44** : 1216.
- 55) 木村晃大, 川上敏行, 長谷川博雅, 枝重夫, 河合達志 (1998) BMPによって誘導される類軟骨性骨化に関する病理学的検討 (第2報). *歯基礎誌* **40** : 410.
- 56) 木村晃大, 川上敏行, 長谷川博雅, 枝重夫 (1998) BMPによって誘導される類軟骨性骨化の免疫組織化学. *日病会誌* **88** : 282.
- 57) 木村晃大, 川上敏行, 長谷川博雅, 枝重夫, 河合達志 (1999) 骨形成因子により誘導される類軟骨性骨化の病理学的検討. *松本歯学* **25** : 118-23.
- 58) 中川俊幸, 井上有子, 後藤 匡, 松尾和昭, 森 恵行, 栗田勇岐, 関田素子, 田川俊郎 (1999) rhBMP-2誘導骨・軟骨組織におけるI, II, X型コラーゲンの局在. *日口科誌* **48** : 239-40.
- 59) 尾曾越文亮 (1974) 骨組織の発生 (骨化), 西村秀雄, 清水信夫編「新組織学, 第2版」, 医学書院, 東京, 105-7.
- 60) Kawakami T, Hiraoka BY, Kawai T, Takei N, Hasegawa H and Eda S (1999) Expression of transforming growth factor-beta peptide and its mRNA in chondrocytes in the early phase of BMP-induced heterotopic "transchondroid bone formation". *Med Sci Res* **27** : 419-21.
- 61) Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Coedes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos JK, Nove J and Wozney JM (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation (cartilage induction). *Proc Natl Acad Sci USA* **87** : 2220-4.
- 62) 久保木芳徳 (1996) 歯科における生物学的療法の過去・現在および未来. *J Hard Tissue Biol* **5** : 66-8.
- 63) 榎木昭二 (1996) 骨再建における新しい生体材料の開発. *J Hard Tissue Biol* **5** : 119-25.
- 64) 高岡邦夫, 宮本純平, 中原治彦, 橋本 淳, 吉川秀樹 (1996) BMPの臨床応用の問題点と解決. *J Hard Tissue Biol* **5** : 133-41.
- 65) 河合達志 (1996) BMPを用いた顎骨再建. *J Hard Tissue Biol* **5** : 142-50.
- 66) 土居真樹 (1996) BMPシグナリング-分子メカニズムから臨床応用へ. *実験医学* **14** : 1363-5.