

異所性遊離骨膜移植によって形成される骨の由来に関する研究

(07672150)



平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究（c）（2））研究成果報告書

平成9年2月

研究代表者 西村 泰一
(旭川医科大学医学部講師)

異所性遊離骨膜移植によって形成される骨の由来に関する研究

(07672150)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究（c）（2））研究成果報告書

平成9年2月

研究代表者 西村 泰一
(旭川医科大学医学部講師)

は し が き

本研究は異所性に遊離骨膜を移植したときに形成される新生骨が骨膜細胞自身の増殖、分化によって形成されるのか、あるいは骨膜細胞が産生する骨誘導蛋白（BMP-2）の骨誘導作用によって移植床の未分化間葉系細胞から形成されるのか、それともそれら両方によって形成されるのかを解明することを目的として筋肉中に遊離骨膜を移植したときの骨膜移植部ならびにその周囲の筋肉組織におけるBMP-2の局在を免疫組織化学的に検討するとともに、骨膜細胞に骨誘導能があるかどうかを遊離骨膜をmillipore diffusion chamberに入れ、腹腔内に移植しmillipore diffusion chamberの外側における新生骨形成の有無を組織学的に検討した。さらに、異所性に遊離骨膜移植したときに形成される骨が骨膜細胞自身に由来するのか否かをautoradiographyを用いて検討し若干の知見を得たのでその概要を報告する。

研究組織

研究代表者：西村泰一（旭川医科大学医学部講師）

研究分担者：竹川政範（旭川医科大学医学部助手）

研究経費

平成7年度 1,300千円

平成8年度 800千円

計 2,100千円

研究発表

(1) 学会誌

(2) 口頭発表

西村泰一、津山 建、北 進一：「遊離骨膜移植によって形成された新生骨の起源」、
第40回日本口腔外科学会総会、平成7年10月19日

(研究 成 果)

緒 言

骨膜が骨形成能をもっているか否かについては長い間論争があったが現在では骨膜には骨形成能があるという考えが支持されている。すなわち遊離骨膜を皮下あるいは筋肉中へ移植すると新生骨が形成される。一般にはこの新生骨は骨膜細胞自身の増殖、分化によって形成されると考えられている。

一方、1965年、Uristは生きた細胞の移植でなく、脱灰凍結乾燥骨を皮下や筋肉中に移植すると軟骨および骨の誘導が起こることを発見し、その活性が蛋白分解酵素で消失することからその分化誘導因子は蛋白質であると考え、この物質をBone morphogenetic protein (BMP)と名付けた。その後BMPを精製、同定するための激しい競争が繰り広げられたにも関わらず、完全精製はなされなかったが、Genetics Institute社のWozneyらが遺伝子工学的手法を用いてrecombinant BMPの合成に成功してからBMPに関する研究は急速に進歩した。現在、BMPはBMP-1からBMP-8まであり、そのうちBMP-1はタイプが違い、残りのBMP-2～BMP-8までの7つはそのアミノ酸配列がTGF- β と類似していることからTGF- β super familyに属することが確認されている。BMP-3はosteogenin, BMP-7はOP-1の別名がある。BMP-2は特に強い骨誘導能をもっていて、in vitroの実験で未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を促進することが確認されていて、骨形成の初期の段階で重要な役割を果たしていると考えられている。BMPの骨組織および他の組織における局在はこれまでは生化学的手法を用いて調べられていたが、recombinant BMPの合成が可能になってから良質のBMP抗体が手にはいるようになり、BMPの局在を組織学的に示すことができるようになった。BMPが骨基質に豊富に存在していることはよく知られているが、最近、BMP-7がヒト胎児の骨膜細胞に存在しているという報告がなされている。また骨折の治癒過程において、BMP-4 mRNAが増殖している骨膜に発現しているという報告もある。このことは骨膜に骨誘導能がある可能性を示唆している。すなわち遊離骨膜を皮下あるいは筋肉中に移植したときに形成される新生骨は骨膜細胞自身の増殖、分化に由来するばかりでなく、移植床の未分化間葉系細胞にも由来する可能性がある。

そこで本研究では異所性に遊離骨膜移植したときに形成される新生骨が骨膜細胞自身の増殖、分化によって形成されるのか、あるいはBMPの骨誘導作用に

よって移植床の未分化間葉系細胞から形成されるのか、それともそれら両方によって形成されるのかを解明することを目的として、以下の3つの点について検討した。

第一に、異所性（筋肉中）に遊離骨膜移植したときに骨膜細胞に存在するBMP-2が骨膜細胞ばかりでなく、移植床（筋肉中）にある未分化間葉系細胞にも関与しているのか否かを調べるために骨膜移植部およびその周囲の筋肉組織におけるBMP-2の局在を免疫組織化学的染色を用いて検討した。

第二に、骨膜細胞に骨誘導能があるかどうかを調べるために遊離骨膜をmillipore diffusion chamberに入れ、腹腔内に移植しmillipore diffusion chamberの外側における新生骨形成の有無を組織学的に検討した。

第三に、異所性に遊離骨膜移植したときに形成される骨が骨膜細胞自身に由来するのか否かをautoradiographyを用いて検討した。

方 法

1、異所性遊離骨膜移植部およびその周囲組織におけるBMP-2の局在に関する免疫組織化学的検討

実験動物には家兎を用い、ketamine (5~10mg)とrompum(25~50mg)筋注麻酔下に右側前肢部より骨膜を採取し、反対側前肢部の筋肉中へ遊離骨膜移植し、筋肉縫合、皮膚縫合を行った。移植後3日目、5日目、7日目、14日目、28日目に屠殺し、移植片を摘出し、4%paraformaldehydeで固定した。0.6N HClで脱灰後パラフィン包埋、薄切し4mmの切片を作製した。数枚のスライドはorientationのためにヘマトキシリン、エオジン染色したが残りのスライドはBMP-2の局在を調べるためにVECTASTAIN R Elite ABC kits (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)を用いてAvidin-Biotin Complex法(ABC法)で免疫組織化学的染色を行った。抗BMP-2抗体としてAnti-rhBMP-2モノクローナル抗体(Genetics Institute U.S.A.)を用いた。このモノクローナル抗体はProtein A-FPLC法によってマウスの腹水から精製された。

免疫組織化学的染色法：切片をキシレンで10分間ずつ3回脱パラ後、100%、100%、70%のアルコールで各2分間ずつ脱キシレンして流水中で十分に水洗した。4.3% H_2O_2 加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを阻止(30分間)後、

非特異的な蛋白質との結合を阻止するために室温で20分間、正常ウマ血清と反応させた。次に一次抗体と湿箱中で室温1時間反応させた後、50mM Tris/HCl, 150mM NaCl, pH 7.6[Tris buffered saline(TBS)]で過剰の抗体を除去した。次に二次抗体である抗マウスIgG ウマ血清と室温で30分間反応させ、続いて avidin-biotin-peroxidase complexと室温で30分間反応させた。TBSで洗浄後、3,3-diaminobenzidine(DAB)と3~5分間反応させた後、ヘマトキシリンで後染色し、脱水、封入した。なお一次抗体を除いたものを対照標本とした。

2、骨膜細胞の骨誘導能の検討

(方法) 方法1で採取した骨膜の一部をmillipore diffusion chamber 内に入れ、腹腔内に移植した。移植後3日目、5日目、7日目、14日目、28日目に屠殺し、millipore diffusion chamberを摘出し、プラスチックリングを除去して移植骨膜、ミリポア膜および膜外周囲組織を一塊として4% paraformaldehydeで固定した。0.6N HClで脱灰後パラフィン包埋、薄切し4.0 μ mの切片を作製した。ヘマトキシリン、エオジン染色後鏡検し、millipore diffusion chamber の外側での骨形成の有無を調べた。

3、Autoradiography による異所性遊離骨膜移植によって形成される新生骨の由来に関する検討。

(方法) 1羽の家兎に0.5~1.0 mCi/gのtritiated thymidine(³HTdr)を12時間おきに5回皮下注射し、最終注射の2時間後に屠殺して前肢部より骨膜を採取した。一部は10%中性ホルマリンで固定し、tritiated thymidine の骨膜への取り込み率を調べた。残りの骨膜はエーテル麻醉下で3匹のヌードマウスの背部筋肉中へ移植した。移植後10日目、12日目、14日目に屠殺し、移植片を摘出し10%中性ホルマリンで固定した。脱灰、パラフィン包埋後、薄切し4.0 μ mの切片を作製した。暗室内でスライドガラスを40℃の温蒸留水で1.2~2倍に希釈したコダックNTB-2乳剤に漬けて、余分な乳剤を吸い取ってから暗室内で30分間風乾後、暗箱中にスライドガラスを入れ、6日間露光後、コダックD-19で現像、固定、水洗後ヘマトキシリン、エオジンで染色し、鏡検した。

結 果

筋肉中に遊離骨膜を移植した群では、移植後5日目に膜性骨の形成を認めた。形成された軟骨は移植後14日目には内軟骨性骨化を起こし、移植後28日目には層板骨になった。破骨細胞は移植後14日目には新生骨の周囲に認められた。

1. 異所性遊離骨膜移植部およびその周囲組織におけるBMP-2の局在に関する免疫組織化学的検討。

移植後5日目には骨の形成を認め、新生骨周囲の未分化間葉系細胞、骨芽細胞、骨細胞にBMP-2の局在を認めた(Fig. 1)。しかし移植した骨膜周囲の筋肉および筋肉周囲の未分化間葉系細胞にはBMP-2の局在を認めなかった。また形成された骨基質、軟骨基質にもBMP-2抗体による特異的な染色像は認められなかった(Fig. 2)。

移植後14日目には破骨細胞が出現し、大部分の破骨細胞の細胞質にBMP-2抗体による特異的な染色像が認められた(Fig. 3)。

2. 骨膜細胞の骨誘導能に関する検討

移植後28日目にはmillipore diffusion chamber 内では軟骨、骨およびosteochondroidの形成が認められた(Fig. 4)。しかし全期間を通じてmillipore diffusion chamber の外側には軟骨あるいは骨の形成は認められなかった。

3. autoradiographyによる異所性遊離骨膜移植によって形成された新生骨の由来に関する検討

移植前の骨膜へのtritiated thymidine($^3\text{HTdr}$)の取り込み率は5.2%であった。移植後10~14日目に新しく形成された骨組織の骨細胞の一部に $^3\text{HTdr}$ の取り込みを認めた(Fig. 5)。また新生骨周囲の間葉系細胞の一部にも $^3\text{HTdr}$ の取り込みを認めた。

考 察

異所性に遊離骨膜移植したときに形成される新生骨が骨膜細胞自身の増殖、分化によって形成されるばかりでなく移植床の未分化間葉系細胞からも形成されるかもしれないという仮説は骨膜細胞に骨誘導蛋白であるBMPが存在しているという報告に基づいている。本研究でも異所性に遊離骨膜移植したときに形成された新生骨周囲の骨膜の間葉系細胞、骨芽細胞ならびに骨細胞の細胞質にBMP-2を認め、骨膜の間葉系細胞や骨芽細胞がBMP-2を産生することが確認された。このことは骨膜の骨芽細胞や間葉系細胞で産生されたBMP-2が拡散して宿主の間葉系細胞に作用し、それらの骨芽細胞への分化を促進する可能性が考えられる。しかし骨膜と接している筋肉や筋肉周囲の未分化間葉系細胞にはBMP-2の局在を認めなかった。また骨膜を封入したmillipore diffusion chamber を腹腔内に移植したが、移植後28日経ってもmillipore diffusion chamber の外側には軟骨あるいは骨の形成は認められなかった。このことは骨膜には骨誘導能がほとんどないか、あってもきわめて弱いことを示唆している。一方、autoradiographyの実験によって新しく形成された骨組織の骨細胞の一部に³HTdrの取り込みを認めたことから新生骨の一部は移植した骨膜細胞に由来していることが確認された。しかしこの実験からは³HTdrの取り込みが認められなかった骨細胞の由来は明らかでなく、新生骨の全てが移植した骨膜細胞に由来しているとは断定できない。

以上の結果を総合して考えると異所性に遊離骨膜移植したときに形成される新生骨の大部分は骨膜細胞自身の増殖、分化によって形成されることが示唆された。また骨膜の骨芽細胞や間葉系細胞によって産生されたBMP-2は骨膜のcambial cells の骨芽細胞への分化過程で重要な役割を果たしているが、宿主の間葉系細胞からの骨形成を誘導するには量的に不十分であることが示唆された。

さらに本研究において興味ある結果が2つ得られた。ひとつはBMP-2が豊富に存在している骨基質にBMP-2抗体による特異的な染色像が認められなかったこと。もうひとつは破骨細胞の細胞質にBMP-2抗体による特異的な染色像が認められたことである。

これらの理由は明らかでなく、今後の解明が期待される。

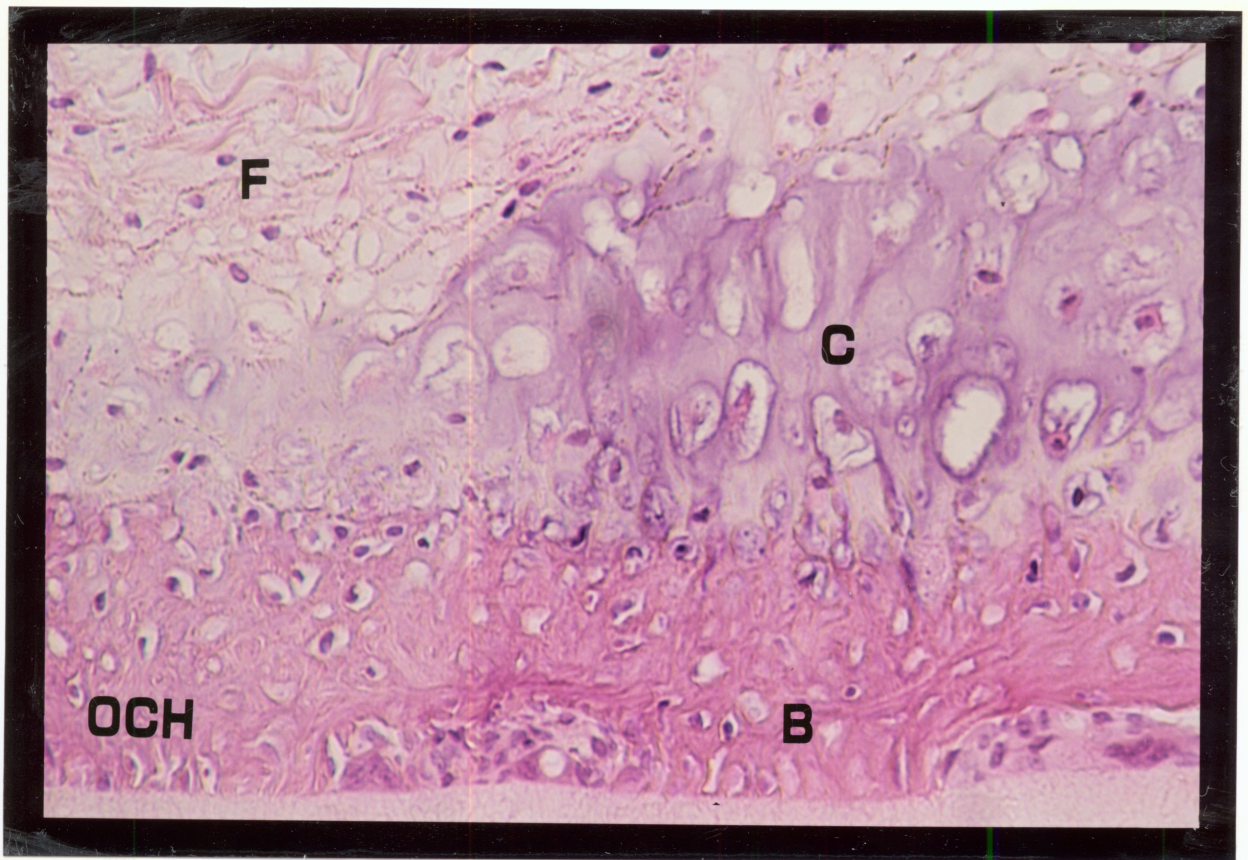


Fig. 1 Periosteal tissue isolated in millipore diffusion chambers have differentiated into fibrous connective tissue(F), cartilage(C), bone(B) and osteochondroid(OCH) by 28 days postgrafting. Hematoxylin and eosin stain. Original magnification= 100X

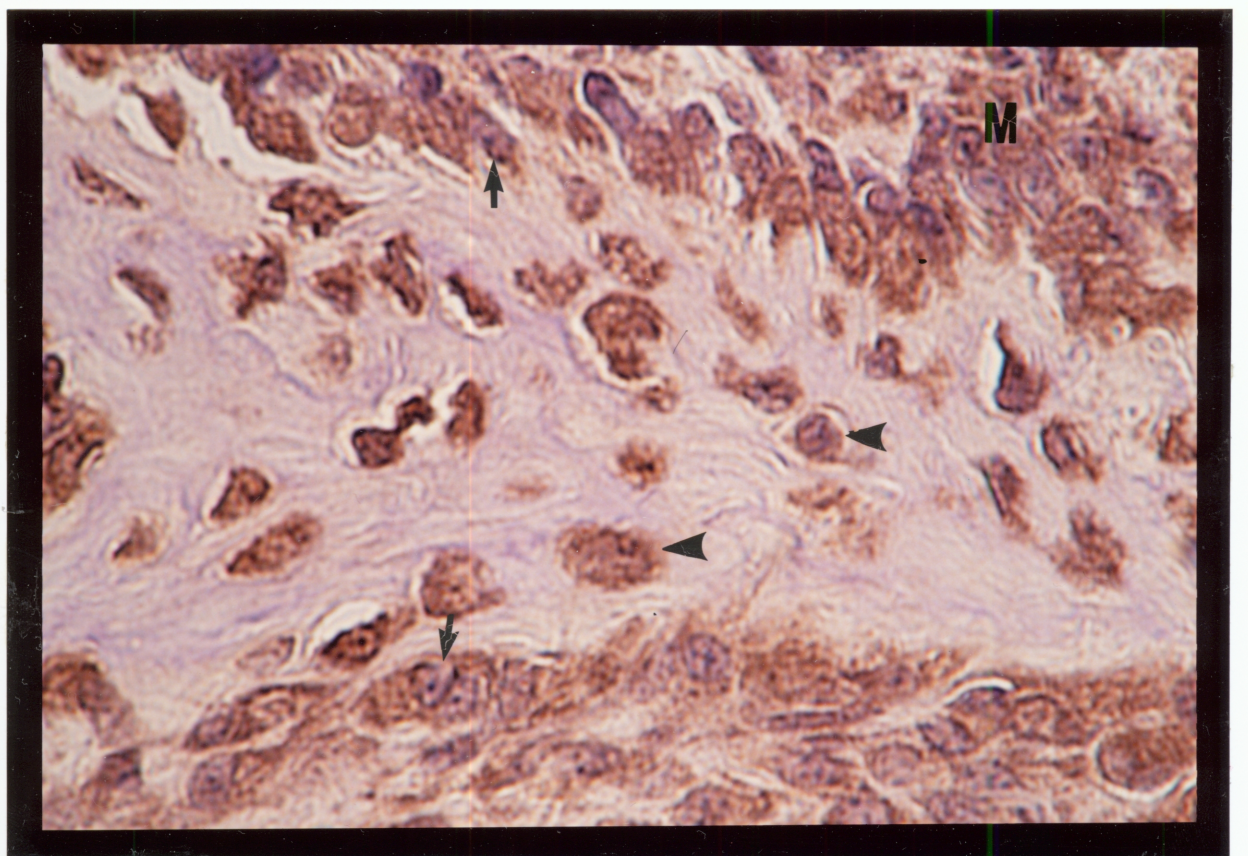


Fig. 2 Staining for BMP-2 in tissue formed within 7 days by intramuscular periosteal grafts shows localization in mesenchymal cells (M), osteoblasts (arrow) and osteocytes (arrow head). ABC stain. Original magnification= 200X

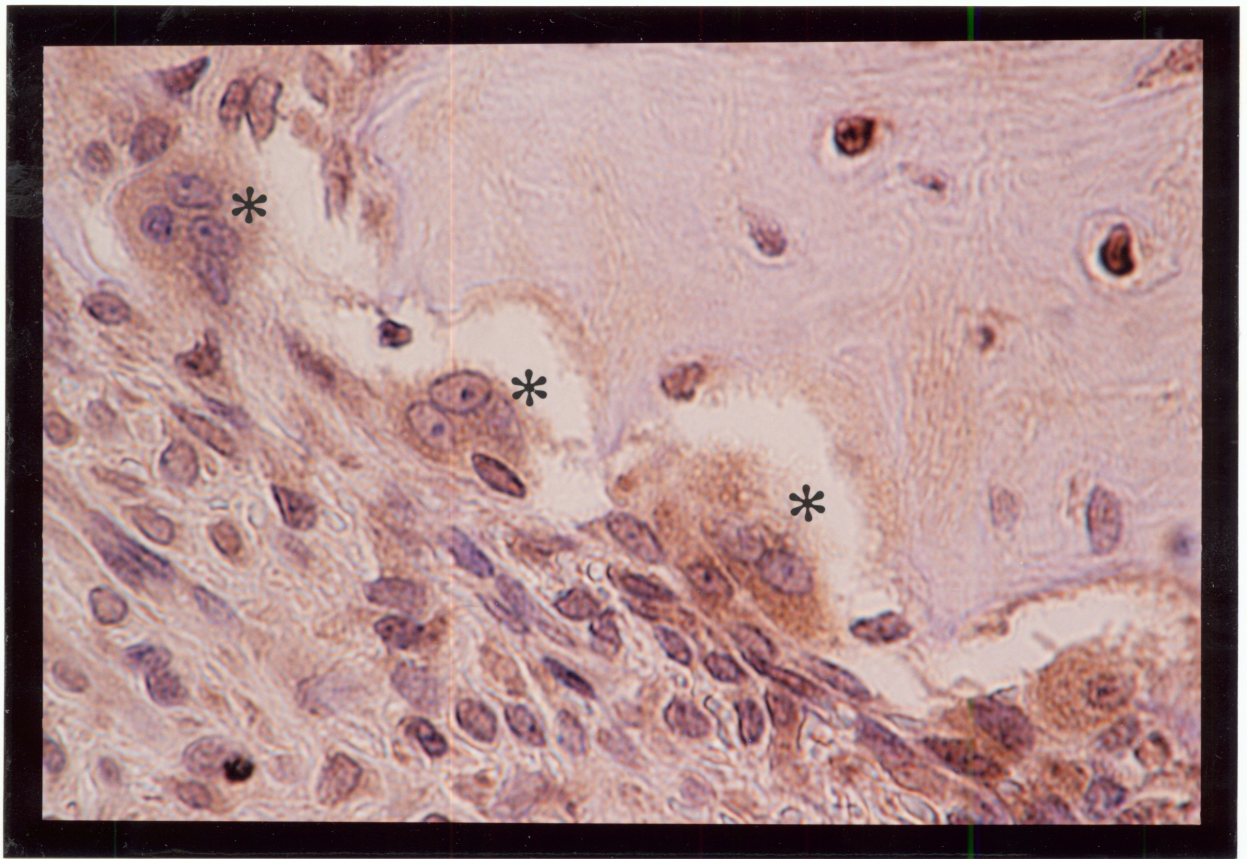


Fig.3 Staining for BMP-2 in tissue formed within 28 days by intramuscular periosteal grafts shows localization in osteoclasts(*). ABC stain. Original magnification= 200X



Fig. 4 Staining for BMP-2 in tissue formed within 14 days by intramuscular periosteal grafts fails to show localization in bone (B) and cartilage (C) matrices. Osteoblasts and chondrocytes express the BMP-2. ABC stain. Original magnification= 200X

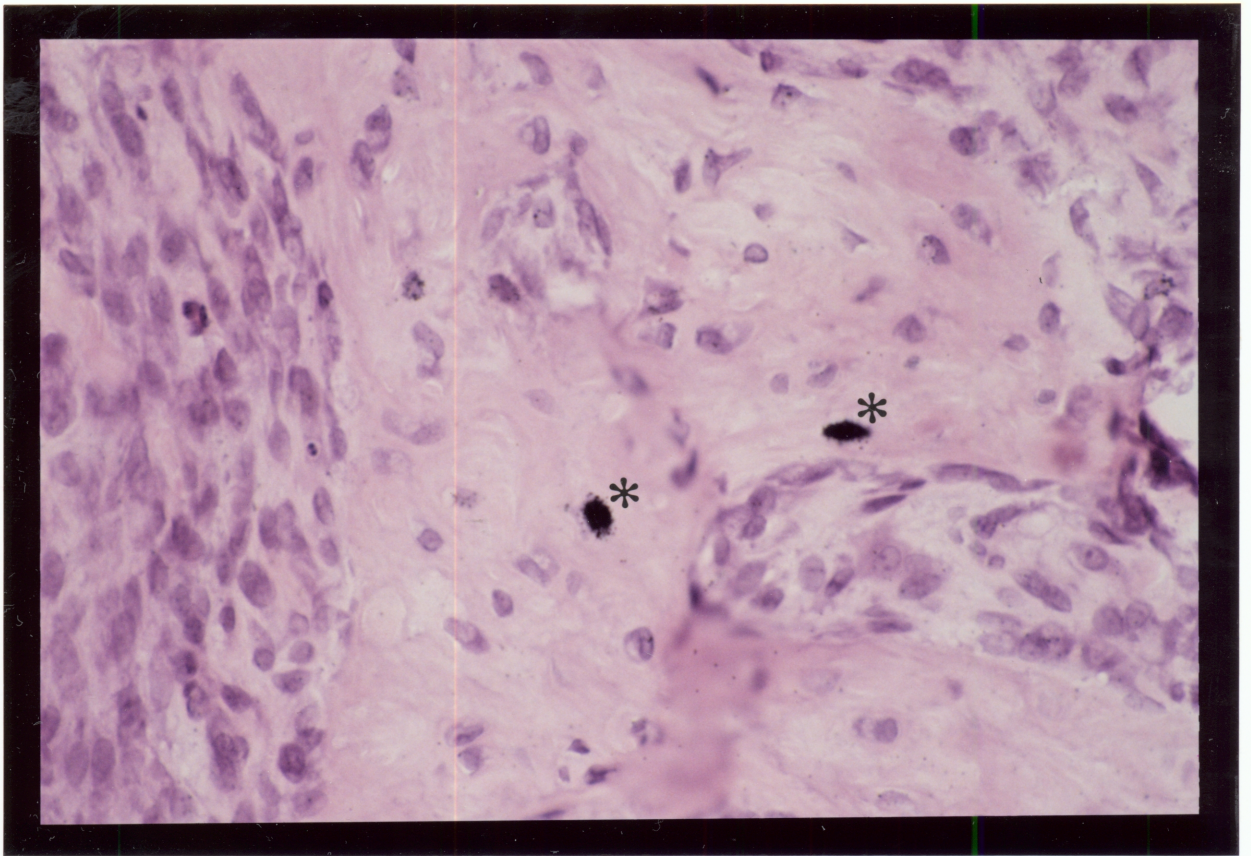


Fig.5 Autoradiographs of bone formed at a site in the paravertebral muscle of a nude mouse which had been grafted with radiothymidine ($^3\text{Htdr}$)-labeled rabbit periosteum and harvested after 10 days. $^3\text{Htdr}$ -labeled osteocytes (= asterisks). Hematoxylin and eosin stain. Original magnification= 100X