
大腸菌由来ヒトリコンビナント 骨形成因子変種による骨誘導

(12470437)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金
基盤研究(B)(2)研究成果報告書



平成15年4月

研究代表者 別所和久
(京都大学医学研究科助手)

骨形成因子は骨格形成、骨折治癒などのあらゆる生理的骨形成に必須の役割を担っており、異所性にも骨組織を誘導する程の強い骨形成活性を有するサイトカインであることから、近年注目を浴び、多くの施設で基礎研究が進められてきた。また、臨床における応用範囲は骨再建、難治性骨折の治療などと広く、有用性に富むことから、本邦でも 1995 年より骨形成因子の臨床治験が開始されるまでに至っており、欧米での臨床使用報告などと合わせ、臨床応用間近なように思われていた。しかし、臨床における有効性、担体として使用する適切な生体材料の安全性など、多くの解決すべき問題が残されており、未だ臨床において一般に使用し得る状況には達していない。

これらの問題を解決すべく、今回、平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金基盤研究(B)(2)を受け、大腸菌由来ヒトリコンビナント骨形成因子変種による骨誘導に関し検討を行った。臨床において新生骨を誘導させるには、齧歯類での実験とは異なり大量の骨形成因子を必要とする。しかし、現在行われている哺乳動物の細胞を用いた骨形成因子の作製法では、大量生産困難で費用も嵩んでしまうため、臨床使用には大きな問題となる。本研究では、これまで不可能とされてきた大腸菌での活性型骨形成因子作製に成功を収め、*in vitro*において、本骨形成因子が十分な骨形成活性を示すことを確認した。この大腸菌由来骨形成因子は従来の哺乳動物細胞由来骨形成因子と比較しても、骨誘導活性に関し優るとも劣ることなく、安価で容易に大量生産可能なことから、非常に有用であり、大きく臨床使用に向け前進を遂げたと思われる。

さらに、少量の骨形成因子で少しでも大量の骨再生を得るべく、エルカトニン、hFGF-2 との併用や高圧酸素療法の利用による骨誘導活性の増強効果を確認した。また、遺伝子組換えによる骨形成因子変種の作製も行い、少しでも効率よく安全に骨形成因子を臨床使用する方法について検索した。一方、これらとはまったく異なった手法であるアデノウイルスベクターを用いたヒト骨形成因子遺伝子導入による骨誘導に関しても検討を加え、今後もさらに改善を要する余地はあるものの臨床応用に際し、有用な新手法として期待の持てる結果を得た。

本研究では、大腸菌を用い、活性の高い骨形成因子を非常に安価で容易に大量生産可能な手法を開発し、その骨誘導活性を増強する方法をも検索すること

が出来た。この成果は、骨形成因子の骨形成への臨床応用に多大な貢献を示すものであり、有用なものと考えられる。さらに、遺伝子導入法についての検討は骨再生治療においては画期的な手法であり、将来性ある新治療手技となる可能性を示唆するものである。

研究組織

研究代表者： 別所和久 （京都大学医学研究科助手）
研究分担者： 飯塚忠彦 （京都大学医学研究科教授）
研究協力者： 大久保康則 （京都大学医学研究科医員）
研究協力者： 海原真治 （京都大学医学研究科医員）
研究協力者： 園部純也 （京都大学医学研究科医員）
研究協力者： 河井まりこ （京都大学医学研究科大学院生）
研究協力者： 小西康三 （京都大学医学研究科研究生）
研究協力者： 赤木 誉 （京都大学医学研究科研究生）
研究協力者： 前田潤一郎 （京都大学医学研究科研究生）
研究協力者： 楠本健司 （関西医科大学医学部助教授）
研究協力者： 藤村和磨 （金沢医科大学医学部助教授）
研究協力者： 宮武伸一 （大阪医科大学医学部助教授）

研究経費

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 12 年度	10,400	0	10,400
平成 13 年度	3,700	0	3,700
平成 14 年度	1,700	0	1,700
総 計	15,800	0	15,800

研究発表

(1) 学会誌等

1. Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Yasuzo Konishi, Kenji Kusumoto, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Osteoinduction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 at Intramuscular, Intermuscular, Subcutaneous and Intrafatty Sites. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 29: 62-66, 2000.
2. Yasuzo Konishi, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Yasunori Okubo, Harumi Ozaki, Kenji Kusumoto, Tadahiko Iizuka: Bone Induction by Escherichia Coli-Derived Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Variant with Collagen as a Carrier. *Dentistry in Japan* 36: 66-68, 2000.
3. Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Kenji Kusumoto, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Effect of Elcatonin on Osteoinduction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269: 317-321, 2000.
4. Kazuhisa Bessho, Yasuzo Konishi, Shinji Kaihara, Kazuma Fujimura, Yasunori Okubo, Tadahiko Iizuka: Bone Induction by Escherichia Coli-derived Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Compared with Chinese Hamster Ovary Cell-derived Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 38: 645-649, 2000.
5. Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Kenji Kusumoto, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Osteogenesis by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 at Skeletal Sites. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 375: 295-301, 2000.
6. Ichiro Kurokawa, Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho, Yasunori Okubo, Hideto Senzaki, Airo Tsubura: Immunohistochemical Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 in Calcifying Epithelioma. *British Journal of Dermatology* 143: 754-758, 2000.
7. Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Jiro Akioka, Yasunori Okubo, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: The Effect of Blood Supply in Muscle and an Elevated Muscle Flap on Endogenous Tissue Engineered Bone by rhBMP-2 in the Rat. *Annals of Plastic Surgery* 45: 408-414, 2000.

8. Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Kenji Kusumoto, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Effect of Hyperbaric Oxygenation on Induced Bone by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 39: 91-95, 2001.
9. Toshikazu Suzuki, Kazuhisa Bessho, Natsuki Segami, Tadahiko Iizuka, Takayuki Nojima: Immunohistochemical Localization of Bone Morphogenetic Protein-2 in the Oral and Maxillofacial Area of the Human Embryo. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 39: 289-293, 2001
10. Kazuma Fujimura, Kazuhisa Bessho, Kenji Kusumoto, Yasuzo Konishi, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Experimental Osteoinduction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 in Tissue with Low-Blood Flow: A Study in Rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 39: 294-300, 2001.
11. Yasuhiko Kiyozuka, Hiroyuki Nakagawa, Hideto Senzaki, Yoshiko Uemura, Susumu Adachi, Yoshihiro Teramoto, Tomohiko Matsuyama, Kazuhisa Bessho, Airo Tsubura: Bone Morphogenetic Protein-2 and Type IV Collagen Expression in Psammoma Body Forming Ovarian Cancer. *Anticancer Research* 21: 1723-1730, 2001.
12. Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Shinji Kaihara, Tadahiko Iizuka, Shin-Ichi Miyatake: The Time Course Study of Osteoinduction by Bone Morphogenetic Protein-2 via Adenoviral Vector. *Life Science* 70: 325-336, 2001.
13. Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Kenji Kusumoto, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Expression of Bone Morphogenetic Protein in the Course of Osteoinduction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Clinical Oral Implants Research* 13: 80-85, 2002.
14. Toshikazu Suzuki, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Yasunori Okubo, Natsuki Segami, Tadahiko Iizuka: Regeneration of Defects in the Articular Cartilage in Rabbit Temporomandibular Joints by Bone Morphogenetic Protein-2. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 40: 201-206, 2002.
15. Kazuhisa Bessho, David L. Carnes, Renee Cavin, Joo L. Ong: Experimental Studies on Bone Induction Using Low Molecular Weight Poly (DL-lactide-co-glycolide) as a Carrier for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Journal of Biomedical Materials Research* 61: 61-65, 2002.

16. Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Jiro Akioka, Yasunori Okubo, Yibiao Wang, Tadahiko Iizuka, Yutaka Ogawa: Osteoinduction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Muscles of Non-human Primates. *The Journal of International Medical Research* 30: 251-259, 2002.
17. Kazuhisa Bessho, Junya Sonobe, Shinji Kaihara, Mariko Kawai, Yasunori Okubo, Jun-ichiro Maeda, Homare Akagi, Tadahiko Iizuka: In Vivo Serial Changes in Bone Induction by E. Coli-derived Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Journal of Musculoskeletal Research* 6: 1-7, 2002.
18. Jiro Akioka, Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho, Junya Sonobe, Shinji Kaihara, Yibiao Wang, Tadahiko Iizuka, Yutaka Ogawa: Angioneogenesis around Induced Bone with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in a Latissimus Dorsi Muscle Flap. *Journal of Musculoskeletal Research* 6: 17-21, 2002.
19. Junya Sonobe, Kazuhisa Bessho, Shinji Kaihara, Yasunori Okubo, Tadahiko Iizuka: Bone Induction by BMP-2 Expressing Adenoviral Vector in Rats under Treatment with FK506. *Journal of Musculoskeletal Research* 6: 23-29, 2002.
20. Kris Partridge, Xuebin Yang, Nicholas M.P. Clark, Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Walter Sebal, Steven M. Howdle, Kevin M. Shakesheff, Richard O.C. Oreffo: Adenoviral BMP-2 Gene Transfer in Mesenchymal Stem Cells: In Vitro and in Vivo Bone Formation on Biodegradable Polymer Scaffolds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292: 144-152, 2002.
21. Kazuma Fujimura, Kazuhisa Bessho, Yasunori Okubo, Kenji Kusumoto, Natsuki Segami, Tadahiko Iizuka: The Effect of Fibroblast Growth Factor-2 on Osteoinducing Activity of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Rat Muscle. *Archives of Oral Biology* 47: 577-584, 2002.
22. Shinji Kaihara, Kazuhisa Bessho, Yasunori Okubo, Junya Sonobe, Kenji Kusumoto, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Effect of FK506 on Osteoinduction by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Life Science* 72: 247-256, 2002.
23. Daniel Howard, Kris Partridge, Xuebin Yang, Nicholas M.P. Clark, Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Steven M. Howdle, Kevin M. Shakesheff, Richard O.C. Oreffo: Immunoselection and Adenoviral Genetic Modulation of Human Osteoprogenitors: In Vivo Bone Formation on PLA Scaffold. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299: 208-215, 2002.

24. Shinji Kaihara, Kazuhisa Bessho, Yasunori Okubo, Junya Sonobe, Yasato Komatsu, Masako Miura, Shin-Ichi Miyatake, Kazuwa Nakao, Tadahiko Iizuka: Over Expression of Bone Morphogenetic Protein-3b (BMP-3b) Using an Adenoviral Vector Promote the Osteoblastic Differentiation in C2C12 Cells and Augment the Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) in Rats. Life Science 72: 1683-1693, 2003.

(2) 口頭発表

1. Kazuma Fujimura, Kazuhisa Bessho, Yasunori Okubo, Kenji Kusumoto, Tadahiko Iizuka: Effect of Hyperbaric Oxygen Treatment for Osteoinduction with rhBMP-2 in the Low Blood Supply Tissue. 6th World Biomaterials Congress, Kamuela, U.S.A., May 20, 2000.
2. Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, Kazuma Fujimura, Kenji Kusumoto, Yutaka Ogawa, Tadahiko Iizuka: Effect of Hyperbaric Oxygenation on Induced Bone by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. 6th World Biomaterials Congress, Kamuela, U.S.A., May 20, 2000.
3. 別所和久: 臨床に即した再生歯学, 一主に外科処置に使用し得る新生体材料と組織工学一. 京都府歯科医師会南支部学術講演会. 京都市, 2000年6月24日.
4. 別所和久: 骨形成因子(BMP)の基礎と将来性. 第139回京都歯科口腔外科集談会, 指名講演. 京都市, 2000年7月15日.
5. 別所和久: 骨形成因子(BMP)研究の現状と歯科関連領域における臨床応用への展望. 第2回福井県歯科医師会学術講演会. 福井市, 2000年7月30日.
6. 別所和久: 骨形成因子(BMP)研究の現状と臨床応用への展望. 平成12年度福井医科大学6年次総合講義「骨形成の現状と展望」. 福井市, 2000年7月31日.
7. 別所和久: 再生歯科学, 一新生体材料と組織工学を利用した組織再生一. 東日本歯学会特別講演会. 北海道, 2000年9月4日.
8. 楠本健司, 別所和久, 藤村和磨, 秋岡二郎, 飯塚忠彦, 小川 豊: 骨形成タンパクを用いた endogenous tissue engineering による骨再建. 第9回日本形成外科学会基礎学術集会. 名古屋, 2000年10月5日.
9. K. Partridge, X. Yang, N.M.P. Clarke, K. Shakesheff, S. Howdle, Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, R.O.C. Oreffo: Ex Vivo Bone Formation Using Adenoviral BMP-2 Gene Transfer into Mesenchymal Stem Cells. 3rd Annual Symposium of the Tissue and Cell Engineering Society, Keele, U.K., Sep. 3, 2001.

10. K. Partridge, X. Yang, N.M.P. Clarke, Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, R.O.C. Oreffo: Adenoviral BMP-2 Gene Transfer into Mesenchymal Stem Cells for Bone Formation. Autumn Meeting of the British Orthopaedic Research Society, Southampton, U.K., Sep. 24, 2001.
11. 別所和久: 骨形成因子 (BMP) 研究の最前線と組織再生. 第 59 回歯周病集学治療研究会, 招待講演. 京都市, 2001 年 9 月 27 日.
12. 楠本健司、別所和久、秋岡二郎、飯塚忠彦、小川 豊: 再生医療をめざした増殖因子の精製、遺伝子組み換えと遺伝子導入 - 骨形成タンパク (BMP) の研究を通して - . 第 10 回日本形成外科学会基礎学術集会, シンポジウム. 東京都, 2001 年 10 月 19 日.
13. K. Partridge, X. Yang, H.I. Roach, N.M.P. Clarke, Yasunori Okubo, Kazuhisa Bessho, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, R.O.C. Oreffo: Bone Tissue Engineering - Adenoviral BMP-2 Gene Transfer into Mesenchymal Stem Cells on Biodegradable Polymer Scaffolds. 2nd European Meeting on Cell Engineering, Costa Brava, Spain, Oct. 26, 2001.
14. 海原真治, 別所和久, 大久保康則, 園部純也, 飯塚忠彦, 楠本健司, 小川 豊: 骨形成因子による骨誘導における FK 506 の影響. 第 20 回日本運動器移植・再生医学研究会. 京都市, 2001 年 10 月 27 日.
15. 園部純也, 別所和久, 海原真治, 大久保康則, 飯塚忠彦: 免疫抑制下における BMP-2 発現アデノウイルスベクターによる骨誘導に関する研究. 第 5 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会. 京都市, 2001 年 11 月 16 日.
16. 別所和久: 骨形成因子を用いた骨・軟骨再生. メニコン 50 周年記念事業, B I O セミナー「再生医療と再生工学」. 名古屋市, 2001 年 11 月 17 日.
17. 別所和久: 夢の骨移植. 第 5 回歯科器材臨床研究会総会, 招待講演. 大阪市, 2002 年 2 月 17 日.
18. Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho, Yasunori Okubo, Jiro Akioka, Fumiko Sasaki, Sawako Fujimori, Tadahiko Iizuka, Yutaka Ogawa: Bony Tissue Engineering in Rat Muscle Flap using Adenovirus Vector with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Gene. 16th Congress of European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Münster, Germany, Sep. 6, 2002.
19. 楠本健司, 別所和久, 秋岡二郎, 飯塚忠彦, 小川 豊: 骨形成タンパク (BMP) による VEGF 発現の検討. 第 11 回日本形成外科学会基礎学術集会. 仙台市, 2002 年 10 月 4 日.

20. Kazuhisa Bessho, Shinji Kaihara, Mariko Kawai, Yasunori Okubo, Junya Sonobe, Tadahiko Iizuka: Over Expression of Bone Morphogenetic Protein-3b (BMP-3b) Using an Adenoviral Vector Promote the Osteoblastic Differentiation in C2C12 Cells and Augment the Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) in Rats. Invited Lecture in 4th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins 2002. Sacramento, U.S.A., Oct. 19, 2002.
21. Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho, Yasunori Okubo, Jiro Akioka, Fumiko Sasaki, Shinji Kaihara, Junya Sonobe, Tadahiko Iizuka, Yutaka Ogawa: Endogenous Bony Tissue Engineering with Bone Morphogenetic Protein (BMP) and the Gene Therapy. 4th Asian Pacific Craniofacial Association Conference, Tokyo, Japan, Oct. 23, 2002.
22. 別所和久:「再生医療を目指して」－口腔領域の粘膜・骨再生の現状と最先端治療－. 第19回滋賀歯学会, 特別講演. 大津市, 2003年2月9日.

(3) 出版物

1. 別所和久, 飯塚忠彦: サイトカインの応用とその展望, 骨形成因子と生体材料の併用を中心に. 末次恒夫, 松本直之監修; 先端医療シリーズ・歯科医学1, 歯科インプラント. 先端医療技術研究所, 東京, 2000, 195-201頁.
2. Kazuhisa Bessho, Joo L. Ong, Tadahiko Iizuka: Bone Morphogenetic Proteins and Biomaterials as Carriers. In D.L.Wise ed.: Biomaterials and Bioengineering Handbook, Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, p373-382.
3. Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho: Osteoinduction by Bone Morphogenetic Protein (BMP); Basic Aspects in the Application to Tissue Engineering. In.: Current Topics in Biochemical Research, Volume 3, Research Trends, Trivandrum, 2000, p55-68.
4. Kazuhisa Bessho, Joo L. Ong: Effect of BMP around Dental Implant. In T.S.Lindholm ed.: Advances in Skeletal Reconstruction Using Bone Morphogenetic Proteins, The World Scientific Publishing Company, Singapore, 2002, p234-244.
5. Kenji Kusumoto, Kazuhisa Bessho: Jaw Reconstruction with BMP, Collagen Hydroxyapatite. In T.S.Lindholm ed.: Advances in Skeletal Reconstruction Using Bone Morphogenetic Proteins, The World Scientific Publishing Company, Singapore, 2002, 307-328.
6. Kazuhisa Bessho: Osteoinduction by a Human Bone Morphogenetic Protein-2 Expressing Adenoviral Vector. In.: Recent Research Developments in Biophysics & Biochemistry, Research Signpost, Trivandrum, in press.