

考察

内視鏡視下手術は、整形外科領域でもとくに後方法を主として施行されるようになってきている。著者らは、腰椎変性疾患に対して後腹膜鏡視下に前方固定術を施行してきた。本法では大血管への操作が不要で、腰椎の力学的構成要素である前縦靭帯、後縦靭帯を温存でき、また後方要素では、力学的安定性に最も関与している椎間関節を温存できる。手技への習熟には訓練を要するが、後方からの椎体間固定術と比較して、その手術的侵襲は少なく、今後内視鏡や周辺機器の発達とともにさらなる発展が期待できる。

症例提示

第3群の代表的症例を図10に示す。

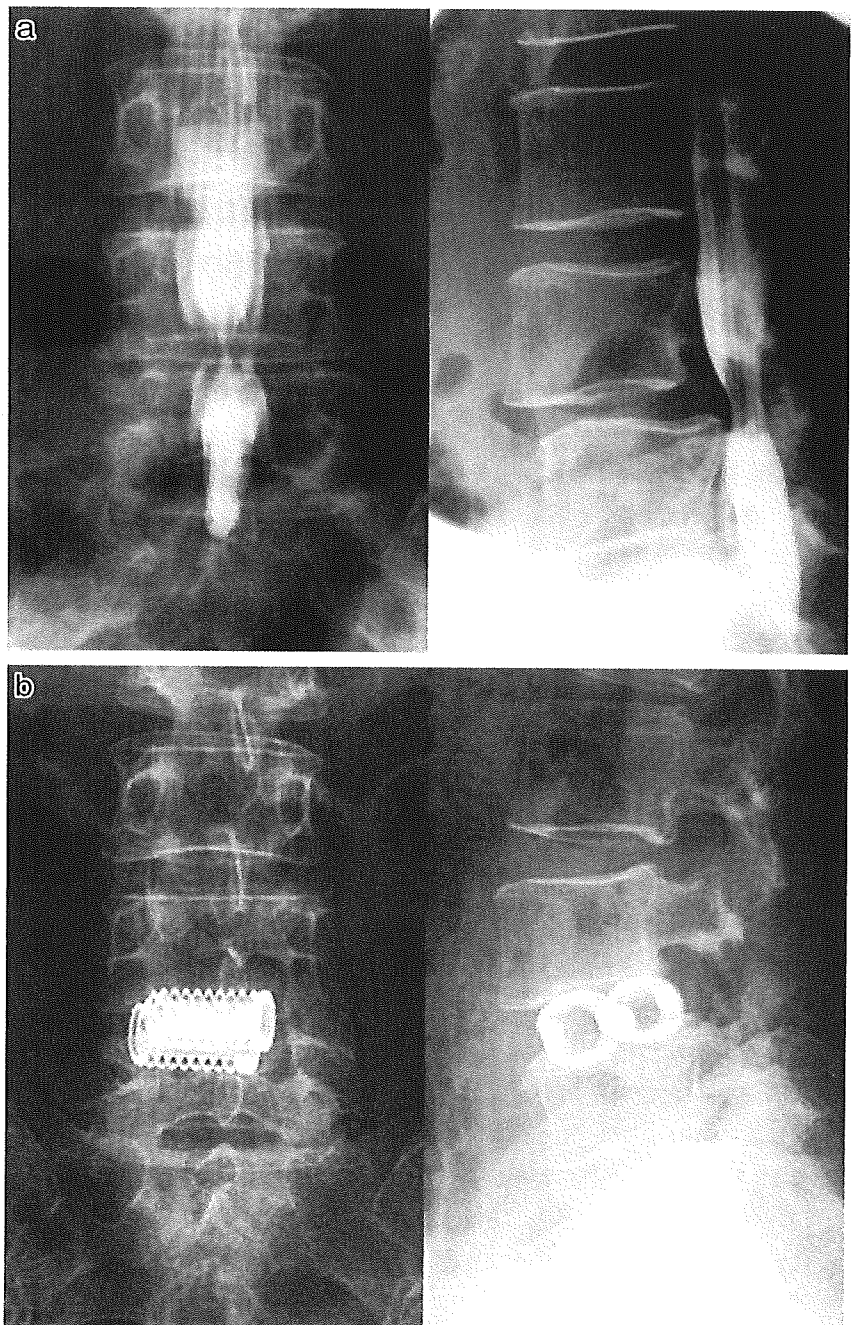


図10 症例

54歳，女性。

a：L4の変性すべりがみられ，同部で硬膜管は圧排を受けている。

b：前方に径16mmのケージ，後方に14mmのケージを挿入し，前弯の形成を図った。

●文献

- 1) Obenchain T : Laparoscopic lumbar discectomy ; Case report. J Laparoendosc Surg, 1 : 145-149, 1991.
- 2) 出沢 明, 草野信一 : 脊椎内視鏡の歴史と現状と展望 ; 内視鏡前方固定術から内視鏡椎間板ヘルニア日帰り手術まで. 脊椎脊髄ジャーナル, 17 : 620-625, 2004.
- 3) 山縣正庸ほか : 最小侵襲手術の実際 ; 脊椎シースを用いた鏡視下腰椎前方固定術の手術手技. 脊椎脊髄ジャーナル, 17 : 57-60, 2004.
- 4) 平泉 裕 : イラストレイテッドサージェリー手術編 胸椎椎間板ヘルニア 内視鏡を用いた前方摘出術. 脊椎脊髄ジャーナル, 16 : 891-899, 2003.
- 5) 矢吹省司ほか : 手術手技私のくふう ; 脊髄砂時計腫に対する鏡視下手術の応用. 臨床整形外科, 37 : 827-832, 2002.
- 6) 夏山元伸 : 顕微鏡対内視鏡脊椎手術 ; 胸腔鏡視下脊椎手術の適応と実際. 整形外科最小侵襲手術ジャーナル, 19 : 16-25, 2001.
- 7) 夏山元伸, 熊野 潔 : 腰椎椎間板症に対するチタンケージを用いた内視鏡下腰椎椎体間固定手術. 関節鏡, 25 : 147-151, 2000.
- 8) 中村博亮ほか : 最小侵襲による脊椎外科 ; 腹腔鏡を応用した腰椎前方固定術の経験. 日本整形外科学会雑誌, 73 : 604, 1999.
- 9) Bridwell KH : Acquired degenerative spondylolisthesis without lysis. The textbook of spinal surgery, Second edition, edited by Bridwell KH and Dewald RL. Lippincott-Raven Publishers, 1997, p1299-1315.
- 10) 金田清志 : 腰椎すべり症の分類, 病態と再建固定術, Anterior column support の概念から. 脊椎脊髄, 13 : 682-685, 2000.
- 11) 須田浩太ほか : 腰椎変性疾患固定術における anterior column support の要否. 脊椎脊髄, 13 : 180-184, 2000.
- 12) 出沢 明, 斉藤竜太郎 : 基本手技シリーズ ; 後腹膜鏡視下脊椎手術手技と高二酸化炭素血症. 内視鏡外科, 5 : 486-493, 2000.
- 13) 小坂橋俊哉ほか : 内視鏡併用脊椎前方固定術中に高二酸化炭素血症をきたした一例. 臨床麻酔, 24 : 1817-1818, 2000.
- 14) Nakamura H, et al : Psoas strapping technique ; A new technique for laparoscopic anterior lumbar interbody fusion. I Am Coll Surg, 191 : 686-688, 2000.

骨再生医療と骨形成蛋白 (BMP)

寺井秀富 高岡邦夫

はじめに

整形外科領域では骨欠損部修復や骨折後偽関節部の骨再生促進法として、自家骨移植術をししばし行う。自家骨移植が現時点でのもっとも効果的な骨再生促進法であることによる。しかし、自家骨移植に伴う合併症（採骨のための新たな手術創、採骨部の疼痛、知覚鈍麻、変形など）や採骨量に限界があることなどから自家骨移植にかわる、より効果的な骨再生促進技術が求められている。

昨今、整形外科領域の手術において小皮切や内視鏡併用による低侵襲手術 (minimum invasive surgery) の発展にみられるように、骨再生についても採骨しない低侵襲かつ効果的な方法が望ましい。そのためにセラミックやハイドロキシアパタイトなどの骨移植代替材料の開発が盛んに行われ、整形外科手術における骨充填材料として受け入れられている。しかし、これらの材料は骨伝導能を有するものの、自家骨移植にみられる骨形成促進作用は期待できないため、骨再生能力に限界がある。もし、これらの人工材料に骨形成促進活性を付与できれば、自家骨に勝る生体材料となるであろう。そのような骨形成促進効果が期待できるのが骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein : BMP) を用いる方法である。現在 BMP (BMP-2, BMP-7) は遺伝子組換えによって合成され供給可能となっている。現時点での問題点は BMP をい

かに有効に生体材料と複合するかである。

本稿では BMP について解説し、BMP を用いた骨再生医療の近未来的な可能性について論述する。

1 BMP とは

BMP は骨芽細胞系細胞で産生、分泌されている一群の生理活性ペプチドである。その生物学的活性の特徴は、未分化間葉系細胞に作用して軟骨細胞または骨芽細胞へ分化誘導することである。歴史的には BMP は 1965 年に Urist¹⁾ によって塩酸脱灰した骨基質に存在することが発見され、その後長期の研究発展の結果、1988 年 Wozney ら²⁾ によって 2 種類の BMP (BMP-2, BMP-4) 遺伝子 (cDNA) がクローニングされて、その分子構造が明らかになった。その後、生命科学基礎的研究の発展に伴い BMP は *in vivo* での異所骨形成能や *in vitro* での未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化促進作用以外に、個体発生過程での体軸決定をはじめほかのさまざまな臓器の形成過程にも関与していることが明らかにされている³⁾。出生後の骨折治療過程でも、局所的に遺伝子発現の亢進によって仮骨形成に関与していることが報告されている^{4,5)}。

BMP の骨形成能を臨床的に応用するための研究としては、BMP の遺伝子導入や細胞工学的な方法への応用も考えられる。しかし研究の進捗状況からみて、BMP 遺伝子産物である遺

Key words : bone, BMP, drug delivery system

* Bone regeneration by bone morphogenetic protein (BMP)

** H. Terai (講師), K. Takaoka (教授) : 大阪市立大学整形外科 (Dept. of Orthop. Surg., Osaka City University School of Medicine, Osaka).

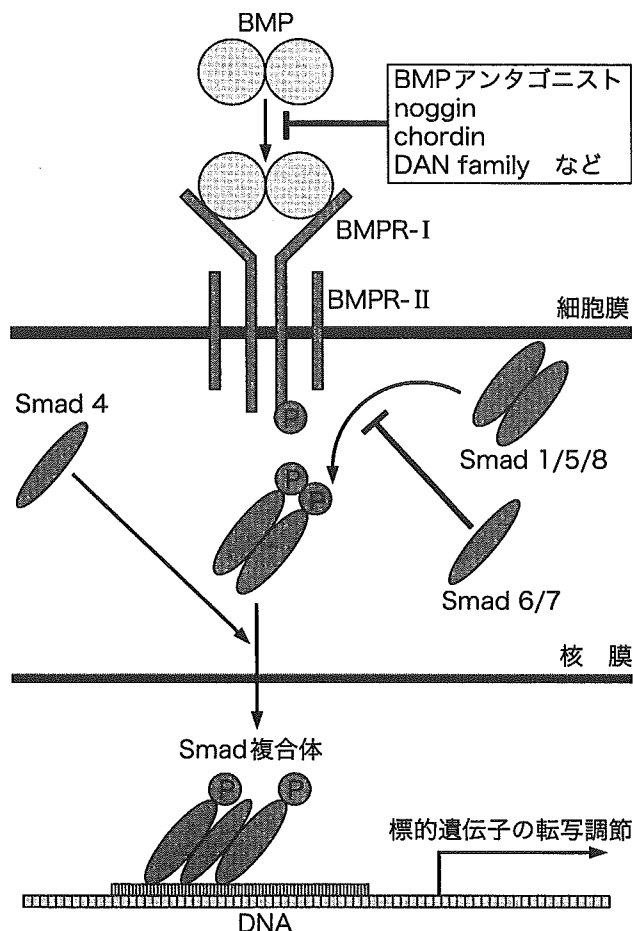


図 1. BMP のシグナル伝達. 細胞膜上にある BMP 受容体 (BMPR-I 型および BMPR-II 型) に BMP が結合すると, I 型レセプターがリン酸化され活性化される. 活性化された I 型レセプターにより R-Smads (Smad 1/5/8) のリン酸化が起り, 引き続いて Co-Smads (Smad 4) と複合体を形成して核内に移行, ほかの転写因子や転写共役因子とともに標的遺伝子の発現を誘導する. I-Smads (Smad 6/7) は R-Smads のリン酸化を阻害して BMP のシグナル伝達を抑制する.

伝子組換え体 BMP (recombinant BMP: rhBMP) を用いるのがもっとも簡便で有望である. 欧米諸国ではすでに脊椎固定術や偽関節など限定された対象に BMP の使用が認可され, 臨床応用が開始されている⁶⁾. しかし, その使用については BMP を局所的に作用させるのに適した薬物伝達系 (drug delivery system: DDS) や BMP 使用量の最適化などの問題が残されており, 今後は BMP のさらに有効かつ安全な使用方法を確立することが重要な課題である. BMP の効果的使用法が確立されれば, 自家骨移植にかわる新しいタイプの骨形成手段が得られ, 偽関節の治療, 脊椎固定術に限

らず腫瘍切除後の骨欠損再建, 人工関節再置換での骨欠損部の修復など整形外科領域での広い範囲に応用可能となるであろう.

2 BMP 分子の特性とシグナル伝達

広く臨床利用される可能性が高い BMP は一群の BMP 分子群のうち BMP-2, BMP-7 である. その分子量は 30 K 前後の 2 量体の中性蛋白である. 分子内に cystine-knot 構造があり, 2 量体分子の構造はきわめて安定である. たとえば 90°C, 15 分間の熱処理でも生物活性は保たれる.

BMP は標的細胞の細胞膜上に存在する BMP に特異的な I 型と II 型の 2 種類のセリン/スレオニン型受容体 (BMPR-I, BMPR-II) を介してそのシグナルを細胞内に伝達する. BMP が I 型および II 型受容体と結合し複合体を形成すると, 細胞内伝達物質である Smad のリン酸化が起る. 現在までに哺乳類では 8 種類の Smad が同定されており, その役割によって特異型 Smad (receptor regulated Smads: R-Smads), 共通型 Smad (common mediator Smads: Co-Smads), 抑制型 Smad (inhibitory Smads: I-Smads) に分類されている. BMP の結合により活性化された I 型受容体により, R-Smads である Smad 1/5/8 がリン酸化され, 引き続き共通型 Smad である Smad 4 と複合体を形成し細胞質から核内に移行する. Smad の複合体は核内で種々の転写因子と結合, あるいは直接的に DNA と結合することにより BMP 標的遺伝子の転写が活性化されると考えられている³⁾ (図 1). 最近, 骨芽細胞分化においては MAPK (mitogen-activated protein kinase) など, Smad を介さない経路の存在も指摘されている⁷⁾.

3 BMP の DDS

BMP を用いて骨折部や骨欠損部の修復を促進させたり脊椎固定術に用いたりする場合には, BMP を目的の局所にとどめて有効に作用させる工夫が必要である. これによって BMP の有効利用が可能となり, BMP 使用量も少なくて済む.

ラット大腿骨骨折モデルを作製し, 80 μ g も

の比較的高用量の rhBMP-2 を局所注射することで骨折治癒促進効果が認められたという報告がある⁸⁾。しかしこの用量でも再現性が得られない。一方、ラット大腿骨骨欠損モデルにおいてリン酸カルシウムセメントを担体（キャリアー）として用いた場合、比較的低用量（6.28 μg ）の BMP で完全な骨修復が得られたと報告されている⁹⁾。このように BMP の効果を再現性よく得るためには、BMP を局所にとどめて徐放し、かつ骨形成の足場となる担体との複合使用が必要であることが知られている。すなわち、適切な BMP の DDS が必要であることを意味している。この担体の選択が BMP の臨床応用にさいして大きな問題となってきた。担体物質に求められる特性として、① 生体親和性がよく異物反応、炎症反応を起さないこと、② 一定時間に生体内で吸収されること、③ 免疫原性がないこと、④ BMP の骨誘導活性を損なわないこと、⑤ 可塑性があり、BMP によって形成される骨の形状制御をしやすいことなどがあげられる。これまでさまざまな物質が BMP の担体として実験的に研究されてきたが、一般的にはウシ脱灰骨基質やウシ由来精製 I 型コラーゲンが使われてきた。ヒトの脊椎固定に米国ではウシ由来精製 I 型コラーゲンを BMP の担体として用いている。しかし I 型コラーゲンはウシ由来の蛋白であり、ヒトに用いると低いながらも抗原性があること、BSE (bovine spongiform encephalopathy) などの病原体混入の危惧があること、力学的強度に欠けることなどの問題点があり、それにかわる理想的な担体の開発が望まれてきた¹⁰⁾。

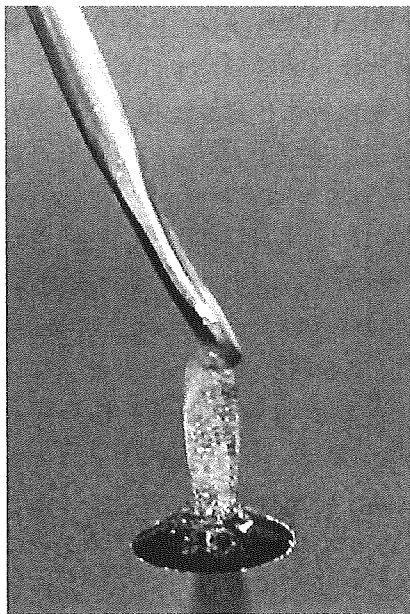
4 BMP のための新しい合成 DDS

われわれは生体内分解性を有する合成担体（高分子化合物、ポリマー）を開発し、動物実験に用いてその有効性を示してきた。この合成担体はポリ乳酸ポリエチレングリコールブロック共重合体（PLA-PEG）であり、生体内で分解、吸収される。さまざまな組成や分子量の組合せの PLA-PEG ポリマーを用いて BMP の担体としての至適化を行った結果、分子量が 9,500、組成が PLA : PLG で 68 : 32 の化合物がもっとも骨形成に適していることを明らかに

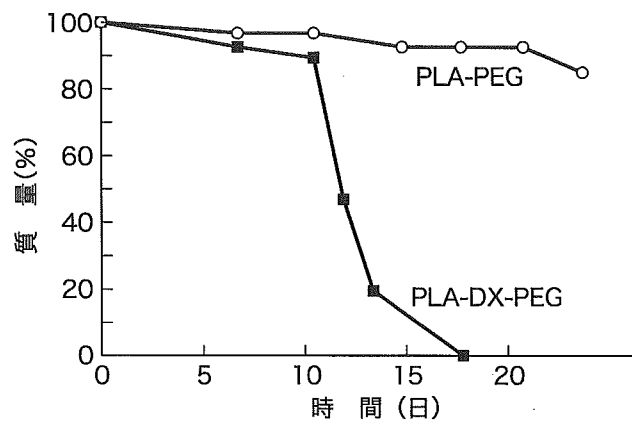
した。PLA-PEG の *in vitro*、リン酸緩衝液中の分解特性は時間経過と比例する¹¹⁾。さらに分解速度を速めるために、ポリ乳酸鎖にジオキサノンランダムに組み込んだ共重合体ポリ乳酸-パラジオキサノン-ポリエチレングリコール共重合体（PLA-DX-PEG）を開発した。PLA-DX-PEG はリン酸緩衝液中では 17 日で完全に分解される。これを用いることによって BMP の徐放速度を適正化できるようになり、さらに有効な骨形成が得られるようになった（図 2）¹²⁾。このような BMP の DDS を単独、またはほかの生体材料と複合して用いることによって、より低用量の BMP で効率的で再現性のよい骨形成が可能となっている。家兎やイヌの長管骨欠損モデルや脊椎固定（後側方固定）モデルでの BMP・ポリマー複合体の有効性についてはすでに報告している¹³⁻¹⁵⁾。

5 BMP での骨再生医療に残された問題点と未来

巨大骨欠損や偽関節など骨再生活性を強く賦活することが必要なときに BMP を有効に利用すれば、骨移植なしに骨再生修復が可能であることはほぼ間違いない。しかし現時点で BMP が汎用されるにいたっていないのは事実である。BMP の利用が遅れている理由がいくつか存在している。第一にヒトは BMP に対する応答性が低いため多量の BMP (rhBMP) が必要であり、その結果高価な治療法となっている点である。その解決策として、優れた DDS を開発して BMP 用量を下げる工夫、さらに BMP の骨誘導活性を増幅する薬剤を開発することによる BMP の低用量化、BMP 合成法改良による BMP 自体の低コスト化などがある。これらの問題が解決されれば、BMP による骨再生技術は広く普及するものと期待される。われわれはすでに上記ポリマーと生体吸収性である β -リン酸三カルシウム (β -TCP) の混合体を担体とすることで BMP 低用量化が可能であることを報告している（図 3）^{16,17)}。さらに BMP の生物活性を増強する薬剤として phosphodiesterase 阻害薬 [ペントキシフィリン (Rolipram)]¹⁸⁾ やプロスタグランジン E 2 (PGE2) の受容体の 1 つである EP 4 のアゴニスト



a. PLA-DX-PEG. 無色透明な高分子化合物. 室温では粘稠である.



b. 37°C, リン酸緩衝液中での分解性を示すグラフ. PLA-DX-PEG は 17 日間で完全に分解される (文献 12 より引用).

図 2. 生体内分解性を有する合成担体

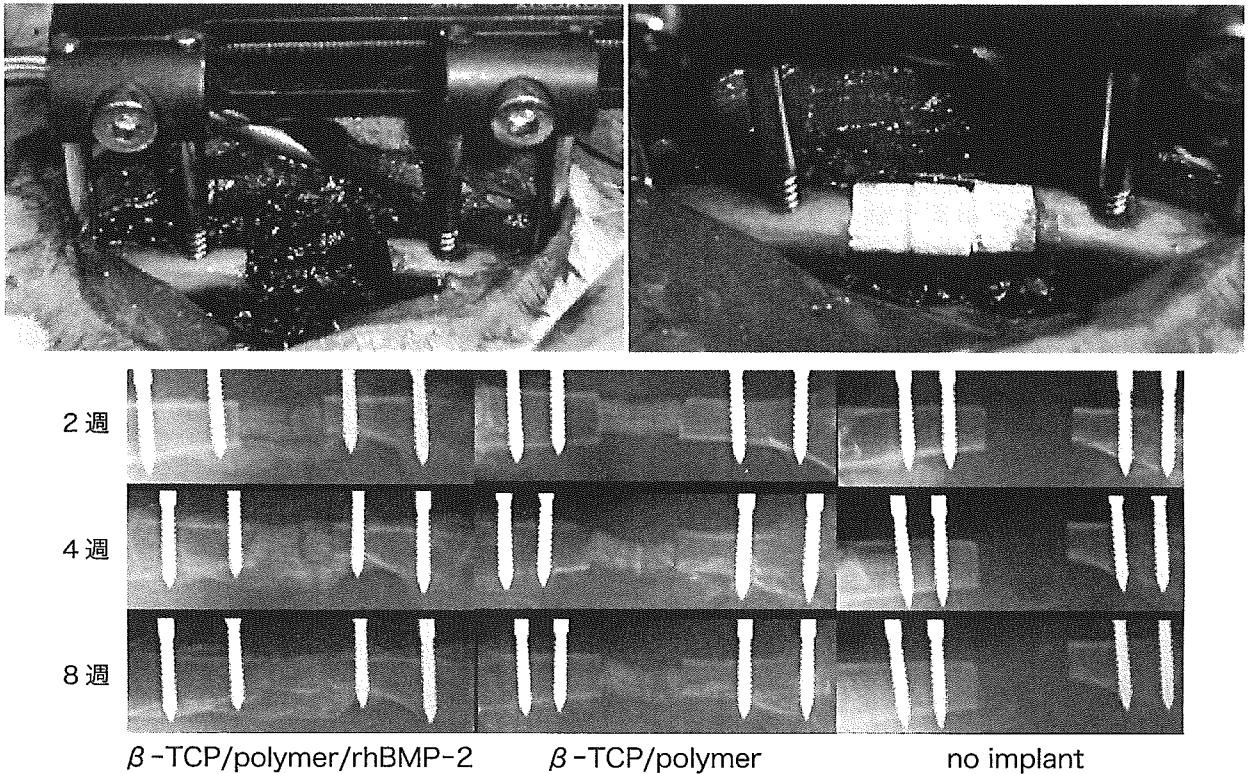
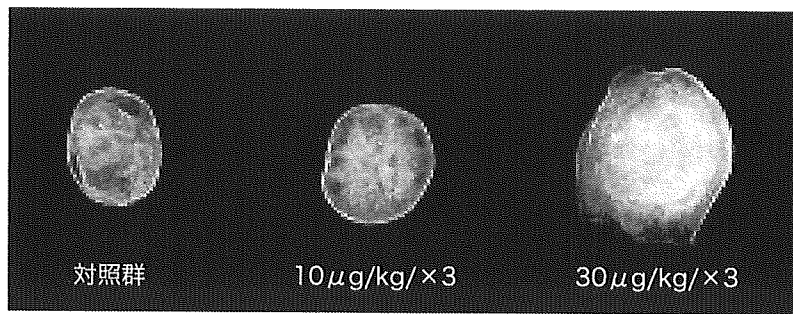


図 3. 家兎大腿骨欠損モデルにおける β -TCP/Polymer/rhBMP-2 複合体による骨欠損の修復. 大腿骨中央部で長さ 15 mm の骨欠損を作製し創外固定を設置し, 骨欠損部に rhBMP-2 を含んだインプラント (β -TCP 直径 5×5 mm 3 個, PLA-DX-PEG 250 mg, rhBMP-2 50 μ g) を移植する (上段). rhBMP-2 を含まないもの, 欠損部のままにしておくものを比較対照群とした. BMP 使用群では 4 週までに仮骨形成が認められ, 術後 8 週で新生骨による欠損部の完全な架橋が認められる (下段). 修復された長管骨は創外固定をはずしても, 長期間にわたり形状・機能ともに保たれている (文献 17 より引用).



a. 軟X線像

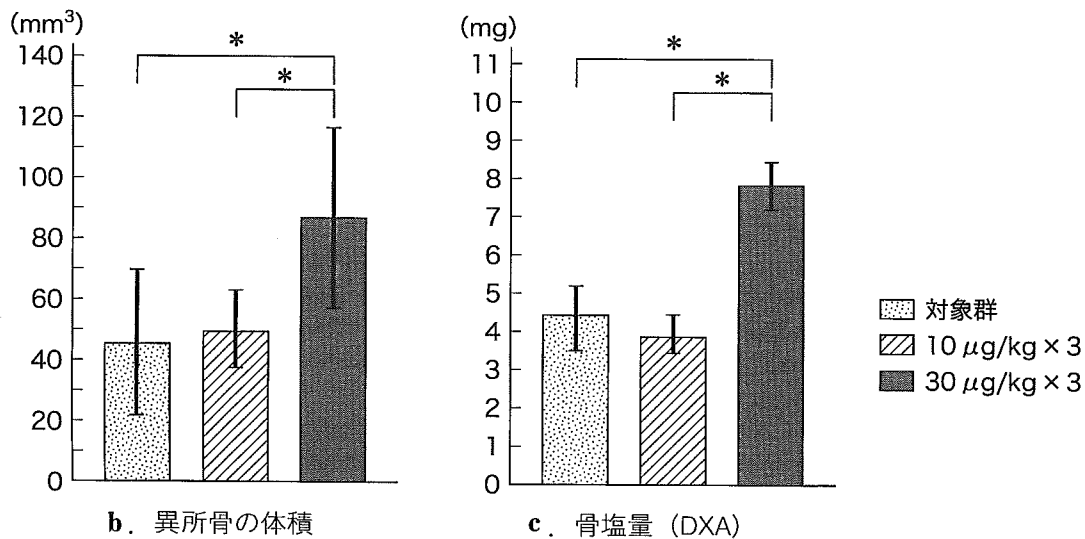


図 4. BMP による異所骨形成に対するプロスタグランジン E EP4 アゴニスト (ONO-4819) の効果. rhBMP-2 含有コラーゲンペレットをマウス背筋筋膜下に埋植し, 異所骨の形成を調べる実験系においてプロスタグランジン E EP4 アゴニスト (ONO-4819) を皮下注射与したさいの骨形成能への影響を調べた. 1日3回 30 μg/kg 投与により異所骨のサイズ, 骨塩量ともに増大している (文献 20 より引用).

(EP4 A, ONO-4819) [図 4]^{19,20)}, ヘパリン²¹⁾などが BMP の活性を特異的に増幅する作用があることを確認している. その他いくつかの BMP 活性増幅作用の有する薬剤の存在が示されている. これらと BMP を併用することによって BMP の低用量化と骨形成作用のさらなる促進が期待できる.

さらに将来, 広く BMP の臨床応用を進展させる方向性として, rhBMP の利用以外に BMP 遺伝子を用いた遺伝子治療も可能性がある²²⁾. しかし現在のところは遺伝子導入のための安全かつ有効な発現ベクターを模索しているのが実状であり, まだ骨再生の領域では実用には時間が必要と思われる²³⁾.

Ex vivo で患者の未分化細胞を培養で増殖させ, BMP によって軟骨や骨芽細胞に分化誘導して移植する方法, いわゆる組織工学 (tissue

engineering) に関しても研究が行われており, 理論的には実現可能である²⁴⁾. しかし実用化の面からみると大がかりな設備, 厳重な無菌環境での培養やそれに要する時間と手間, 安全性, 経済性, 有効性などの面で多くの問題があり, 実用化が困難ではないかと危惧される. 近未来的には rhBMP の有効利用による臨床応用が遺伝子治療や組織工学方法に先駆けて汎用されることになるものと推測される.

おわりに

BMP についての基礎的知識として BMP 分子の特性, シグナル伝達制御機構, BMP の実用化のための DDS, BMP 活性増幅方法, さらに遺伝子治療, 組織工学への応用の可能性について私見を混せて述べた.

今後の BMP の研究発展によって新しい骨再

生技術の確立が可能となることは疑いないもの
と考える。それによって自家骨移植が不要とな
り、治療期間短縮とともに能率よい骨再生が可
能となって、高度な整形外科治療が実現でき
ることが期待できる。

文 献

- 1) Urist MR : Bone formation by autoinduction. *Science* **150** : 893-899, 1965
- 2) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ et al : Novel regulators of bone formation ; molecular clones and activities. *Science* **242** : 1528-1534, 1988
- 3) Chen D, Zhao M, Mundy GR : Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22** : 233-241, 2004
- 4) Kloen P, Di Paola M, Borens O et al : BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone* **33** : 362-371, 2003
- 5) Yoshimura Y, Nomura S, Kawasaki S et al : Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. *J Bone Miner Res* **16** : 876-884, 2001
- 6) Burkus JK, Transfeldt EE, Kitchel SH et al : Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine* **27** : 2396-2408, 2002
- 7) Nohe A, Keating E, Knaus P et al : Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* **16** : 291-299, 2004
- 8) Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A et al : A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg* **85-A** : 1425-1435, 2003
- 9) Ohura K, Hamanishi C, Tanaka S et al : Healing of segmental bone defects in rats induced by a beta-TCP-MCPM cement combined with rhBMP-2. *J Biomed Mater Res* **44** : 168-175, 1999
- 10) Saito N, Takaoka K : New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* **24** : 2287-2293, 2003
- 11) Saito N, Okada T, Toba S et al : New synthetic absorbable polymers as BMP carriers ; plastic properties of poly-D, L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers. *J Biomed Mater Res* **47** : 104-110, 1999
- 12) Saito N, Okada T, Horiuchi H et al : A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat Biotechnol* **19** : 332-335, 2001
- 13) Murakami N, Saito N, Horiuchi H et al : Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer. *J Biomed Mater Res* **62** : 169-174, 2002
- 14) Murakami N, Saito N, Takahashi J et al : Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials* **24** : 2153-2159, 2003
- 15) Takahashi J, Saito N, Ebara S et al : Anterior thoracic spinal fusion in dogs by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a synthetic polymer. *J Spinal Disord Tech* **16** : 137-143, 2003
- 16) Matsushita N, Terai H, Okada T et al : A new bone-inducing biodegradable porous beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res* **70** : 450-458, 2004
- 17) Yoneda M, Terai H, Imai Y et al : Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. *Biomaterials* **26** : 5145-5152, 2005
- 18) Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T et al : Effect of phosphodiesterase inhibitor-4, rolipram, on new bone formations by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Bone* **30** : 589-593, 2002
- 19) Yoshida K, Oida H, Kobayashi T et al : Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP 4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 4580-4585, 2002
- 20) Sasaoka R, Terai H, Toyoda H et al : A prostanoid receptor EP 4 agonist enhances ectopic bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* **318** : 704-709, 2004
- 21) Takada T, Katagiri T, Ifuku M et al : Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* **31** : 43229-43235, 2003
- 22) Zhu W, Rawlins BA, Boachie-Adjei O et al : Combined bone morphogenetic protein-2 and-7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* **19** : 2021-2032, 2004
- 23) Huang YC, Simmons C, Kaigler D et al : Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Gene Ther* **12** : 418-426, 2005
- 24) Fischer EM, Layrolle P, Van Blitterswijk CA et al : Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. *Tissue Eng* **9** : 1179-1188, 2003