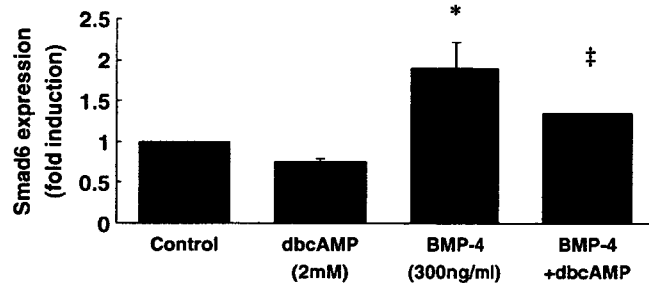


Fig. 4. Cyclic AMP reduced BMP-4-induced Smad6 expression in ST2 cells in a dose-dependent manner. After 12 h of treatment with BMP-4 (300 ng/ml), dbcAMP or both, total RNA was extracted, and expression of Smad6 was analyzed using real-time RT-PCR, normalized to GAPDH expression and presented as the expression level relative to that in control untreated cells. Bars and lines represent mean ± SD for 3 wells. **P* < 0.05, cells treated with BMP-4 compared with untreated cells. ‡*P* < 0.05, cells treated with BMP-4/dbcAMP compared with BMP-4 treated cells.

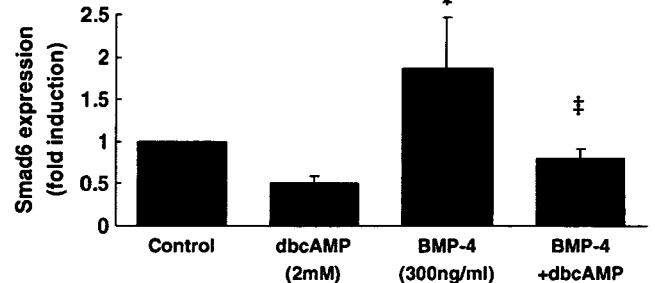
distinct genes and hydrolyze cAMP and/or cyclic guanosine monophosphate (cGMP), thereby contributing to the regulation of intracellular cAMP levels [14]. A number of compounds inhibiting respective PDE subfamily enzymes in

a selective or non-selective manner have already been developed [15]. Interestingly, some PDE inhibitors have been reported to stimulate osteoblastic differentiation and inhibit osteoclastic differentiation in vitro [16,17]. We have

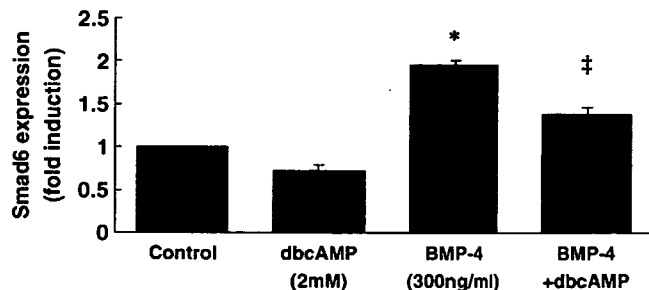
A: 6 hours



C: 24 hours



B: 12 hours



D: 72 hours

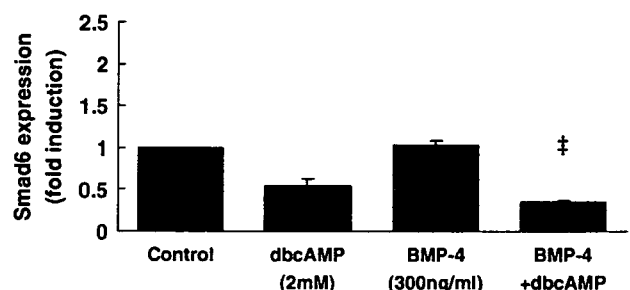


Fig. 5. Cyclic AMP reduced BMP-4-induced Smad6 expression in ST2 cells at 6, 12 and 24 h. ST2 cells were treated with BMP-4 (300 ng/ml), dbcAMP (2 mM) or both for 6 h (A), 12 h (B), 24 h (C) or 72 h (D). Total RNA was then extracted, and expression of Smad6 was analyzed using real-time RT-PCR, normalized to GAPDH expression and presented as expression level relative to that in control untreated cells. Bars and lines represent mean ± SD for 3 wells. **P* < 0.05, cells treated with BMP-4 compared with untreated cells. ‡*P* < 0.05, cells treated with BMP-4/dbcAMP compared with BMP-4 treated cells.

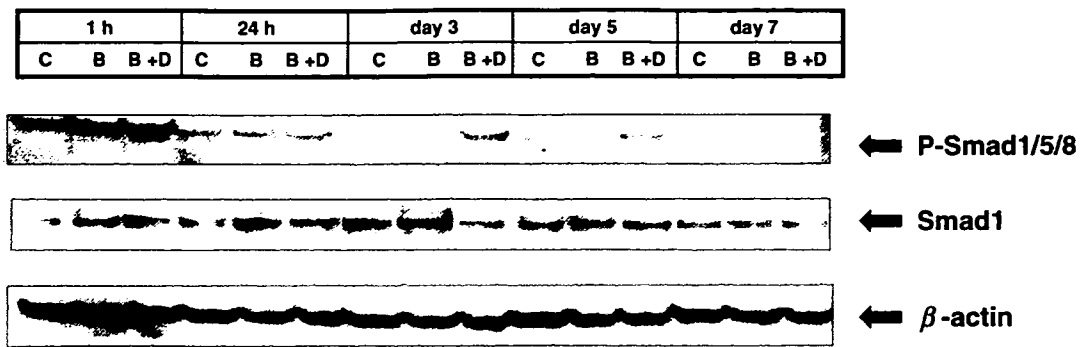


Fig. 6. Effects of dbcAMP on BMP-4-induced Smads signaling in ST2 cells. ST2 cells were pretreated for 1 h in 5% FBS before stimulation. Cells were treated with BMP-4 (300 ng/ml) or BMP-4 and dbcAMP (2 mM). Whole-cell extracts were prepared at indicated time points followed by immunoblotting. Identical amounts of protein samples were applied and run on each lane of a 10% acrylamide gels, blotted to an ECL nitrocellulose membrane, and membranes were developed using ECL plus reagent. Activated BMP-specific R-Smads were detected by anti-phospho-Smad1/5/8 antibody. Bands for Smad1 and β -actin are shown as a loading control. C, control; B, BMP-4; B + D, BMP-4 and dbcAMP.

reported that the PDE inhibitors, PeTx and Rolipram, increase bone mass mainly by promoting bone formation in normal mice [4,18]. Furthermore, PDE inhibitors have been shown to exert therapeutic effects in different experimental osteopenia models [17,19,20]. Although some PDE inhibitors reportedly promote bone formation under both *in vivo* and *in vitro* conditions, the precise mechanisms leading to the osteogenic effects of those PDE inhibitors are currently unknown. The present study was performed to gain clues regarding the anabolic effect of the PDE inhibitor PeTx on osteoblastic differentiation of bone marrow stroma cell-derived osteoprogenitor cells, ST2 cells.

Our previous report showed that daily injection of PeTx increased systemic bone mass by enhancing bone formation [18], and it also stimulated BMP-2 induced ectopic bone formation [4]. However, the mechanisms underlying the effects of PDE inhibitors on bone metabolism have remained obscure. Regarding mechanisms of action, one of the basic but major questions has been whether the anabolic effect of PDE inhibitors on bone metabolism is linked specifically to BMP signaling system to induce osteoblastic differentiation or results from functional activation of fully differentiated osteoblasts independent of BMP. Based on the results in our present and previous studies, the effect of PDE inhibitors might be brought about in association with BMP since the effects of PDE inhibitors in enhancing osteoblastic differentiation were not seen in the absence of BMP but were consistently noted in the presence of BMP, indicating a potential function of the PDE inhibitor in enhancing BMP signaling through elevation of intracellular cAMP levels [21]. In addition, intracellular cAMP-elevating agents such as dbcAMP and forskolin also increase BMP-4-stimulated osteoblastic differentiation when estimated by elevating ALP activity [21]. These results indicate that cAMP-elevating agents might enhance BMP signaling pathway to enhance bone formation. Regarding the effects of PDE inhibitors on BMP signaling, the results of a recent study suggest that the anabolic actions of PeTx might be attributable to cross-talk

between BMP signaling and protein kinase C (PKC) signaling cascades [22]. Rawadi et al. noted that PeTx could promote osteoblast differentiation not by protein kinase A (PKA) activation, since inhibition of PKA by H-89 (a protein kinase inhibitor) did not alter the PDE-induced osteogenic reaction, but through activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and p38 kinase pathways [22]. However, we could not exclude the possible contribution of cAMP-activated PKA to the acceleration of osteoblastic differentiation by PeTx since inhibition of PKA by H-89 partially abolishes PDE inhibitor-mediated increases in the induction of ALP by BMP-4 (data not shown). Cross-talk between the cAMP/PKA cascade and the Smads-mediated BMP signaling pathway awaits elucidation in future studies.

Among the 3 groups of Smad proteins involved in the BMP signaling pathway, Smad6 and Smad7 are classified as I-Smads. I-Smads interact with activated serine/threonine kinase BMP or TGF- β receptors and compete with R-Smads (Smad1/5/8) to activate the receptors [23]. Smad6 has also been reported to compete with common-partner Smad (Co-Smad, Smad4) in forming complexes with R-Smads. Smad6 might be more crucial in the negative feedback loop as Takase et al. [24] reported that Smad6 mRNA was markedly induced by BMP-2 or BMP-7/OP-1 in various osteoprogenitor cell lines, whereas Smad7 expression remained unchanged in most cells. In this context, Smad6 was targeted to examine involvement of the protein in the mechanism enhancing BMP signaling by cAMP. We confirmed up-regulation of Smad6 expression in response to BMP-4 stimulation in ST2 cells. Interestingly, up-regulated expression of Smad6 by BMP-4 stimulation appears to be partially suppressed by elevated intracellular cAMP levels on addition of cell-membrane-permeable dbcAMP in a dose-dependent manner in ST2 cells. Elevated levels of phosphorylated R-Smads following BMP-4 treatment and dbcAMP lasted longer than that with BMP-4 treatment alone on Western blot analyses. Although dbcAMP significantly suppressed the

expression of Smad6 mRNA induced by BMP-4 within 6 h (Fig. 5A), levels of phosphorylated R-Smads induced by BMP-4 at 24 h were not altered (Fig. 6). This discrepancy might be explained by following two points. First, Smad6 was evaluated by mRNA level, whereas phosphorylated R-Smads were determined by protein level. Second, Smad6 binds in a stable manner to serine/threonine kinase receptors and then interferes with phosphorylation of R-Smads by receptors. This negative feedback loop might require the appropriate time lag. These results suggest that the anabolic effects of cAMP on BMP-4-induced osteoblastic differentiation might be partially attributable to suppressed expression of Smad6 in the negative feedback loop and the facilitation of positive BMP-4 signaling in cells. In addition, dbcAMP enhanced the expression of Id-1 mRNA, an inhibitor of myogenesis, induced by BMP-4 (data not shown). These findings taken together suggest that cAMP might be a modulator of BMP signaling. Ishida et al. identified the 28-base pair regions responsible for transcriptional activation by BMPs in the mouse Smad6 promoter [25]. Ionescu et al. characterized a putative cAMP response element (CRE) site in the adjacent 17-base pair [26]. In that report, dominant negative cAMP response element binding protein reduced BMP-2-stimulated Smad6 gene transcription [26], but these results were not consistent with our current results. Potential causes for these inconsistencies include interactions of other transcriptional factors and differences in cells and BMPs. Similar mechanisms were reported to explain signal cross-talk between BMP and TGF- β [27]. Further studies are needed to elucidate relationships between cAMP and BMPs.

Smad proteins play important roles in BMP signaling and display characteristic pathways. Only a limited number of previous reports have examined relationships between the Smad pathway and cAMP. On addition of dbcAMP, BMP-4-induced Smad6 expression was significantly suppressed (Fig. 4). These results indicate that dbcAMP enhances BMP-4 osteogenic activity through the suppression of a self-regulated negative feedback loop. Parathyroid hormone (PTH) or its amino-terminal fragment is known to enhance systemic bone formation following daily subcutaneous injection and is currently utilized to recover bone mass in osteoporotic patients without the precise mechanisms of action being understood. As PTH also elevates intracellular levels of cAMP in cells with PTH-specific receptors, cAMP interference in the BMP negative feedback might be involved in PTH-enhanced systemic bone formation. Additional studies confirming suppression of I-Smads by PTH treatment are necessary to elucidate the mechanisms of action underlying the anabolic effects of PTH.

In conclusion, suppression of BMP-4-induced Smad6 expression appears to represent one of the mechanisms by which BMP action is enhanced by PeTx and dbcAMP treatments. Manipulation of the BMP signaling loop may also provide new insights into enhancing the efficacy of BMP-mediated local new bone formation for the treatment of damaged bone.

Acknowledgments

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and Japan Society for the Promotion of Science (No. 15591595).


References

- [1] Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002;27:2662–73.
- [2] Chen Y, Luk KD, Cheung KM, Xu R, Lin MC, Lu WW, et al. Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. *Gene Ther* 2003;10:1345–53.
- [3] Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res* 2002;395:110–20.
- [4] Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T, Wakabayashi S, Tsutsumimoto T, Takaoka K. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. *Bone* 2001;28:290–4.
- [5] Horiuchi H, Saito N, Kinoshita T, Wakabayashi S, Yotsumoto N, Takaoka K. Effect of phosphodiesterase inhibitor-4, rolipram, on new bone formations by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Bone* 2002;30:589–93.
- [6] Takaoka K, Yoshikawa H, Hashimoto J, Ono K, Matsui M, Nakazato H. Transfilter bone induction by Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected by DNA encoding bone morphogenetic protein-4. *Clin Orthop* 1994;300:269–73.
- [7] Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* 1973;33:3231–8.
- [8] Ogawa M, Nishikawa S, Ikuta K, Yamamura F, Naito M, Takahashi K. B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac. *EMBO J* 1988;7:1337–43.
- [9] Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983;96:191–8.
- [10] Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, et al. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:295–9.
- [11] Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:366–71.
- [12] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [13] Nakamura Y, Wakitani S, Nakayama J, Wakabayashi S, Horiuchi H, Takaoka K. Temporal and spatial expression profiles of BMP receptors and noggin during BMP-2-induced ectopic bone formation. *J Bone Miner Res* 2003;18:1854–62.
- [14] Soderling SH, Beavo JA. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:174–9.
- [15] Beavo JA, Reifsnyder DH. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:150–5.

- [16] Robin JC, Ambrus JL. Study of antiosteoporotic agents in tissue culture. *J Med* 1984;15:319–22.
- [17] Waki Y, Horita T, Miyamoto K, Ohya K, Kasugai S. Effects of XT-44, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in culture and its therapeutic effects in rat osteopenia models. *Jpn J Pharmacol* 1999;79:477–83.
- [18] Kinoshita T, Kobayashi S, Ebara S, Yoshimura Y, Horiuchi H, Tsutsumimoto T, et al. Inhibitors, pentoxifylline and rolipram, increase bone mass mainly by promoting bone formation in normal mice. *Bone* 2000;27:811–7.
- [19] Miyamoto K, Waki Y, Horita T, Kasugai S, Ohya K. Reduction of bone loss by denbufylline, an inhibitor of phosphodiesterase 4. *Biochem Pharmacol* 1997;54:613–7.
- [20] Robin JC, Ambrus JL. Studies on osteoporoses. XI. Effects of a methylxanthine derivative. A preliminary report. *J Med* 1983;14:137–45.
- [21] Tsutsumimoto T, Wakabayashi S, Kinoshita T, Horiuchi H, Takaoka K. A phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline, enhances the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-dependent differentiation of osteoprogenitor cells. *Bone* 2002;31:396–401.
- [22] Rawadi G, Ferrer C, Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Bouali Y, Baron R. 1-(5-oxohexyl)-3,7-Dimethylxanthine, a phosphodiesterase inhibitor, activates MAPK cascades and promotes osteoblast differentiation by a mechanism independent of PKA activation (pentoxifylline promotes osteoblast differentiation). *Endocrinology* 2001;142:4673–82.
- [23] Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 2002;7:1191–204.
- [24] Takase M, Imamura T, Sampath TK, Takeda K, Ichijo H, Miyazono K, et al. Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:26–9.
- [25] Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, et al. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* 2000;275:6075–9.
- [26] Ionescu AM, Drissi H, Schwarz EM, Kato M, Puzas JE, McCance DJ, et al. CREB cooperates with BMP-stimulated Smad signaling to enhance transcription of the Smad6 promoter. *J Cell Physiol* 2004;198:428–40.
- [27] Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K. Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J* 2004;23:552–63.

ヒッププロテクターは大腿骨頸部骨折ハイリスク集団の 頸部骨折を抑制する

小池達也・折戸芳紀・多田昌弘・洲鎌 亮
豊田宏光・小林千益・高岡邦夫

 ライフサイエンス出版

TEL (03) 3664-7900 (代表)

【禁 無断転載・複製】

ヒッププロテクターは大腿骨頸部骨折ハイリスク集団の頸部骨折を抑制する

小池達也¹⁾・折戸芳紀²⁾・多田昌弘²⁾・洲鎌 亮²⁾
豊田宏光²⁾・小林千益³⁾・高岡邦夫²⁾

はじめに

骨粗鬆症の治療目標は時代とともに変遷し、現在では骨折予防が第一義と考えられている。特に大腿骨頸部骨折(HF)の予防が重要であるが、転倒骨折危険因子を有する高齢者には薬物療法も無効であるとの報告がある¹⁾。そのような高齢者の大腿骨頸部骨折予防を目的に開発されたのがヒッププロテクター(HP)である(図1)。しかし、HPに関する既報の14 Randomized controlled trial (RCT)のメタアナリシスでは、その効果が疑問視されている(図2)²⁾。各RCTの結果が異なる理由は明らかではないが、たとえば施設入所者を対象にし、クラスター無作為化を行った同様な二つの研究(図2のKannus 2000³⁾とO'Halloran 2004⁴⁾)の相対危険率が95%CIまでを含めてもまったく重ならないことから、研究そのものの普遍性に疑問がもたれる。そこで、骨折ハイリスク群を対象とし、危険因子・環境因子も考慮したわが国初の多施設RCTにてHPの有効性を検討した。

1 対象と方法

われわれの研究に賛同した76高齢者施設を封筒法にてHP:コントロール(C)が3:1になるよう無作為割付を行った(図3)。逆に、職員負担

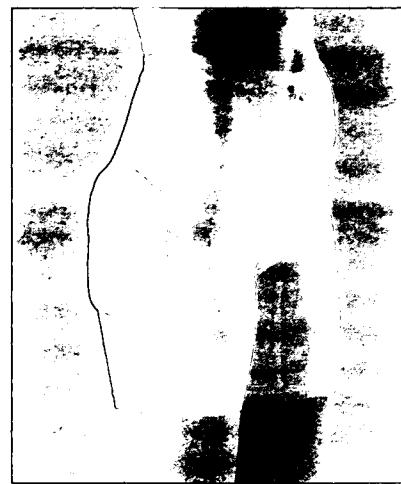


図1 帝人製セーフヒップ

外側部にシェルがあり転倒時の衝撃が大転子に伝わらないように分散させる

を減らし継続率を高めるために、HP群は5名、C群は15名を各施設よりエントリーした。組入れ基準は65歳以上の骨折危険因子を有する起立可能な女性で、インフォームドコンセント取得後、身長・体重・体脂肪率・握力・踵骨骨量・認知度・服薬状況・骨折転倒歴・ADL調査を行った。さらに、施設間格差を調べるため、施設の職員数・過去3年間の転倒骨折数・床の硬さ調べを行った。各施設へは月に1度の訪問を行うとともに、教育講演などを通じてスタッフへの

Hip Protectors Prevent Hip Fractures in the Elderly with Risk Factors

Tatsuya Koike: Rheumatology, Osaka City University Medical School, et al.

Key words : Hip fracture, Osteoporosis, Hip protector

¹⁾大阪市立大学大学院医学研究科リウマチ外科学, ²⁾大阪市立大学大学院医学研究科整形外科, ³⁾信州大学医学部整形外科

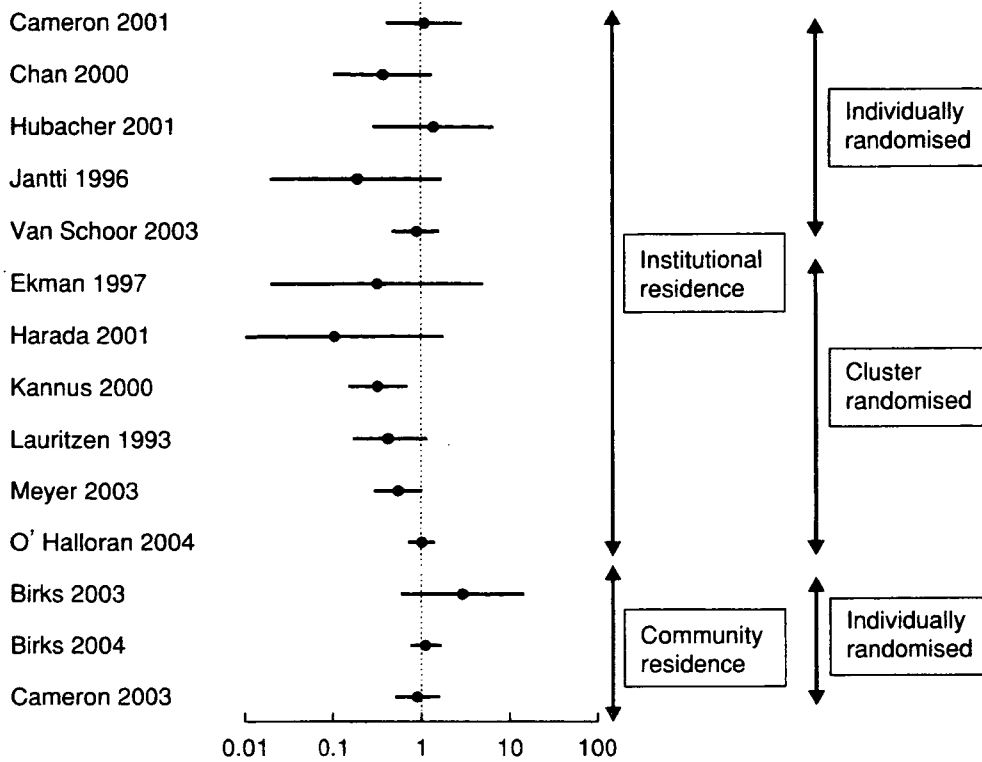


図2 14 RCTの相対危険率比較 (文献2より引用改変)

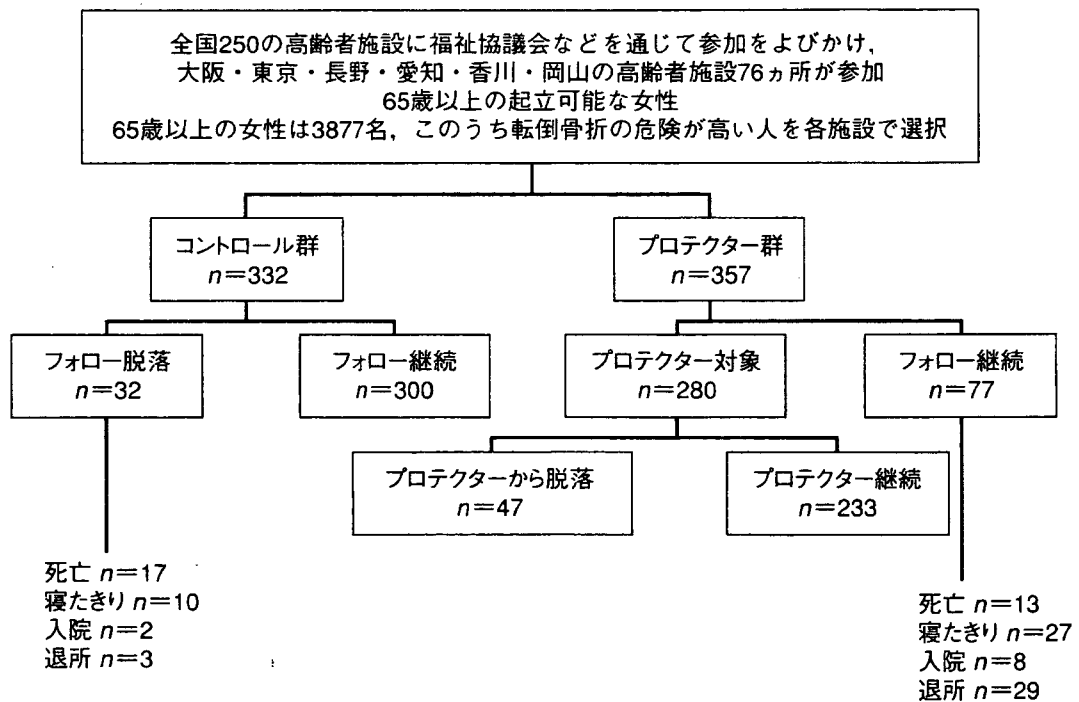


図3 エントリー方法および脱落者

表1 エントリー例の開始時プロフィール
 観察期間にのみ両群間に有意差を認めた。

	コントロール	プロテクター
人数	332	357
年齢(年)	85.2 ± 7.0	85.2 ± 6.6
身長(cm)	144.6 ± 7.4	143.2 ± 7.5
アームスパン(cm)	146.2 ± 9.0	146.3 ± 7.1
体重(Kg)	45.1 ± 8.5	41.8 ± 7.7
握力(Kg)	9.7 ± 3.8	9.7 ± 4.5
体脂肪(%)	30.6 ± 7.4	29.4 ± 7.2
MMSE	14.6 ± 9.8	11.3 ± 8.6
SOS(m/s)	1456.5 ± 28.5	1460.1 ± 30.5
観察期間(日)	302 ± 114.4	256 ± 121.2*

* $p < 0.05$

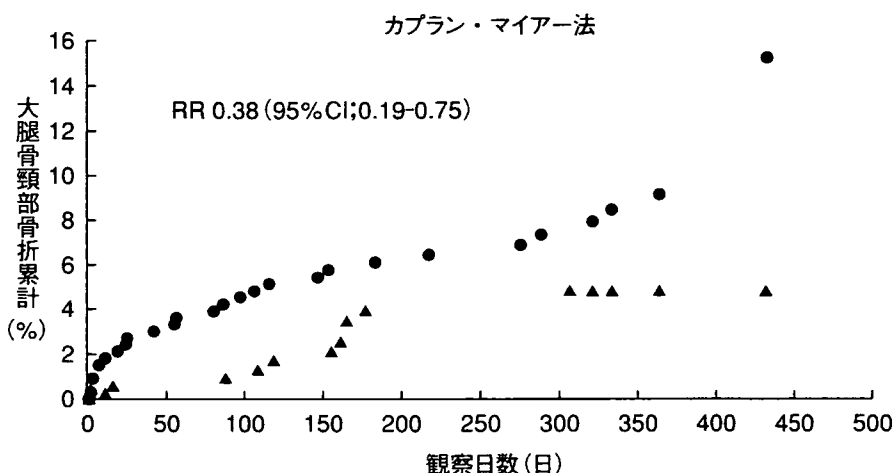


図4 大腿骨頸部骨折発生頻度
 ●：コントロール群, ▲：プロテクター群

強力な介入を行った。2002年12月からエントリーを開始し、今回は2005年3月31日時点までの中間解析を行った。この間にさまざまな脱落が観察(図3)されたが、それらも含めて解析を行った。

2 結 果

エントリー数は689名(HP: 357, C: 332)で、開始時の個人データに両群間に差を認めなかった(表1)。各施設の床は「非常に硬く」、施設でHFが多い一因と考えられたが、両群間に差を認めなかった。職員数や過去の転倒骨折数にも施設間差を認めなかった。HFは、計38件(HP: 11,

C: 27)発生し、相対危険度は0.38 (95%CI; 0.19-0.75)で、観察期間も考慮したカプラン・マイアール法にてもログランク検定にてHP群にHFが有意に少なかった(図4)。転倒は計986回生じ、HP群(1.46/人)がC群(1.38/人)より多かったが、他の部位の骨折発生頻度には差を認めなかった。HP継続率は83.8%で、全RCT中第一位の成績であった。

3 考 察

個人ランダム化試験で有効な成績が出ない理由として、HF発生頻度が一般住民の間では低いこと、およびそれらのRCTでは継続率が3~50%

と非常に低いことが要因としてあげられる^{5~7)}。われわれは施設数を飛躍的に増加させ、個人ランダム化に近い条件で、しかも環境因子も考慮してRCTを行い、HPが転倒危険因子を有した高齢者のHF予防に有効であることを証明した。しかし、この結果からだけでは過去のRCTの成績の相違を説明することはできない。現在、2006年春までのデータを収集中であり、危険因子をも考慮したハザードモデルでの解析により、普遍的な結論を得ることができると期待している。

また、強力な介入を行ったにもかかわらず、HP群の11例の骨折中、5例は転倒時非着用・2例は尻餅型転倒であったことから、HPのさらなる改良も必要である。

【謝 辞】 本研究は、厚生労働科学研究費痴呆・骨折臨床研究事業補助金(痴呆・骨折H16-痴呆・骨折-014)および代謝性骨疾患研究会研究助成(2003-5)の一部を用いて実施した。

文 献

- 1) McClung MR, Geusens P, Miller PD, Zippel H, Bensen WG, Roux C, et al. Effect of risedronate on

- the risk of hip fracture in elderly women. Hip Intervention Program Study Group. *N Engl J Med* 2001;344:333-40.
- 2) Parker MJ, Gillespie LD, Gillespie WJ. Hip protectors for preventing hip fractures in older people. *Cochrane Database Sys Rev* 2005:CD001255.
 - 3) Kannus P, Parkkari J, Niemi S, Pasanen M, Palvanen M, Jarvinen M, et al. Prevention of hip fracture in elderly people with use of a hip protector. *N Engl J Med* 2000;343:1506-13.
 - 4) O'Halloran PD, Cran GW, Beringer TR, Kernohan G, O'Neill C, Orr J, et al. A cluster randomised controlled trial to evaluate a policy of making hip protectors available to residents of nursing homes. *Age Ageing* 2004;33:582-8.
 - 5) Birks YF, Hildreth R, Campbell P, Sharpe C, Torgerson DJ, Watt I. Randomised controlled trial of hip protectors for the prevention of second hip fractures. *Age Ageing* 2003;32:442-4.
 - 6) Birks YF, Porthouse J, Addie C, Loughney K, Saxon L, Baverstock M, et al. Randomized controlled trial of hip protectors among women living in the community. *Osteoporos Int* 2004;15:701-6.
 - 7) Cameron ID, Cumming RG, Kurrle SE, Quine S, Lockwood K, Salkeld G, et al. A randomised trial of hip protector use by frail older women living in their own homes. *Inj Prev* 2003;9:138-41.

BMPの骨再生医学への応用

寺井 秀富*¹⁾ 高岡 邦夫*²⁾

臨床領域での bone morphogenetic protein (BMP) 研究の主たる目的は、BMP が持つ骨誘導能を利用して効果的能率的に骨再生修復する新技術を開発することである。そのための具体的課題として、有効な BMP の担体の開発、BMP の骨形成作用の促進と効率化の技術の開発があげられる。これらの新技術が開発されれば、現在広く行われている自家骨移植に代わる有効な骨形成促進技術となり、さらに、骨折治癒の促進、偽関節の治療、脊椎固定、腫瘍切除後の骨欠損再建、人工関節再置換での骨欠損補填、骨形成活性を備えた人工材料の開発等、整形外科領域での幅広い応用と臨床応用の普及が期待できる。

Application of Bone Morphogenetic Protein (BMP) in Regenerative Medicine of Bone.

Osaka City University Graduate School of Medicine, Department of Orthopaedic Surgery

Hidetomi Terai, Kunio Takaoka

Main purpose of bone morphogenetic protein (BMP) related research in clinical setting is the development of new efficient technologies to regenerate bone tissue effectively by utilizing BMP's osteoinductivity. Problems to be solved for that purpose are the development of efficient carrier system for BMP and the exploitation of methods to promote efficacy of BMP's bone forming activity. These new technologies will enable orthopaedic surgeons to replace currently used autografts with BMP combined implants. Additionally, they are also applicable for the acceleration of bone healing, treatment of non-union, spinal fusion, reconstruction of bone defects after the resection of bone tumor or arthroplasty. Thus, these new technologies are expected for the breakthrough in clinical applications of BMP.

はじめに

自家骨移植術は、骨欠損修復や骨折治癒、脊椎

固定を目的として行われるが、それは、自家骨移植が現時点で最も効果的な骨再生修復促進法であ

*大阪市立大学大学院医学研究科整形外科 ¹⁾ 講師 (てらい・ひでとみ) ²⁾ 教授 (たかおか・くにお)

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）や採骨量の制限などから、自家骨移植に代わる、より効果的な骨再生促進技術が求められてきた。欧米で広く使用されている同種骨は余分な手術侵襲がなく、手術時間も短縮できるなどの利点があるが、免疫反応や病原体伝播の危険性があり、本邦では供給体制も充分でなく普及していない。そこで、本邦では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てきた。これらの人工骨は骨伝導能を有し、安定して供給できること、生体親和性があり、移植材料としての安全性が確立されていることなどの利点があり、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きた。しかし、決定的な欠点として、骨形成細胞や増殖因子などの生物学的活性を欠くために、人工骨単独での骨修復促進作用は期待できない。

現在、最も確実かつ簡便に骨形成促進効果を期待できるのが骨形成タンパク（bone morphogenetic protein：BMP）を用いる方法である。現在BMP（BMP-2、BMP-7）は遺伝子組み換えによって合成され供給されており、本邦以外においては既に脊椎固定術や骨折後偽関節の修復に対し、いわゆるサイトカイン療法として、BMP局所投与による臨床応用が始まっている¹⁾²⁾。その臨床結果から、BMP使用による骨癒合効果が自家骨移植に匹敵することが証明されているが、BMP自体が高価であることによる治療の高コスト性、担体の安全性など未解決の問題も多い。

本稿では、BMPの臨床応用を考えた場合に解決すべき課題と、その解決に向けた研究を中心に解説する。

BMPのドラッグデリバリーシステム（DDS）

BMPの持つ骨誘導能を生体内で再現性よく効果的に発揮させるためには、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が必要であることが知られている。すなわち、適切なBMPのdrug delivery system（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の臨床応用に際して大きな課題となってきた。

BMPの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、炎症反応を起こさないこと、②一定時間内に生体内で吸収されること、③免疫原性がないこと、④BMP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がしやすいこと、⑥生体内でのBMP徐放速度を制御できること、などがあげられる。

これまで様々な物質が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BMPを含む脊椎固定用材料でも米国ではウシ由来精製I型コラーゲンをキャリアーとして用いている。しかし、I型コラーゲンはウシ由来のタンパクであり、ヒトに用いると低いながらも抗原性があること、bovine spongiform encephalopathy（BSE）などの病原体混入の危険があること、力学的強度に欠けることなどの問題点があり、さらに理想的な担体の開発が望まれてきた。

新しいBMPのDDSの開発

我々は生体内分解性を有する人工合成担体（高分子化合物、ポリマー）を開発し、BMP担体としての有効性を実験的に証明してきた。ポリ乳酸-ポリエチレングリコール（PLA-PEG）やポリ乳酸-パラジオキサノン-ポリエチレングリコール（PLA-DX-PEG）などである（図1）。これらのポリマーは先にあげたBMP担体としての特性をすべて満たしており、I型コラーゲンと比較しても、より低用量のBMPで有効な骨形成が得られることが証明されている（図2）³⁾⁴⁾。

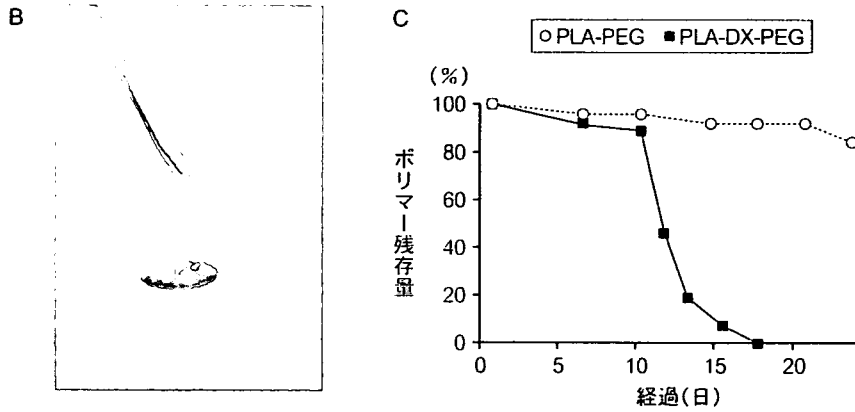
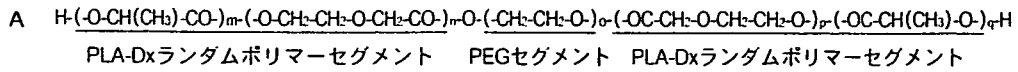


図1 人工合成担体 PLA-PEG, PLA-DX-PEG の構造と性状および分解特性

- A : PLA-DX-PEG はランダムに dioxanone が挿入された疎水性のポリ乳酸セグメントとポリエチレングリコールセグメントからなる。
 B : PLA-DX-PEG の外観。室温で無色透明のゲル状のものを主に用いているが、組成を調節することにより、固体～液体状へと形状を制御できる。
 C : 37℃、リン酸緩衝液中での PLA-PEG と PLA-DX-PEG の分解特性を示す。PLA-DX-PEG では先に PLA に挿入された dioxanone 部分での分解が進むために、PLA-PEG よりも急速な分解が得られる。このようにポリマーの分解速度を制御できることは薬物伝達システムの特長として重要である。
 PLA-PEG : ポリ乳酸-ポリエチレングリコール, PLA-DX-PEG : ポリ乳酸-パラジオキサノン-ポリエチレングリコール

(文献 3 より)

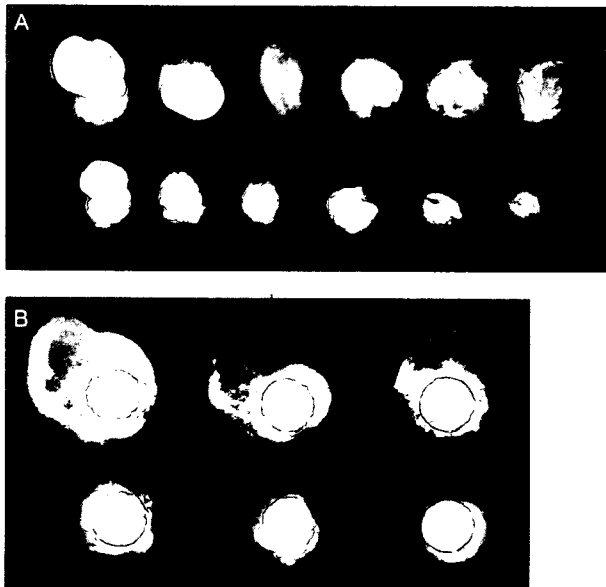


図2 BMP による異所骨形成試験における薬物伝達システム (ポリマー) の効果

A : rhBMP-2 (20 µg) の薬物伝達システムとして PLA-DX-PEG (上段) と I 型コラーゲンを用いた場合の骨形成の違い。マウス背筋筋下埋植モデル (3 週) での検討結果。

B : rhBMP-2 (5 µg) の薬物伝達システムとして β-TCP ディスク / PLA-DX-PEG 複合体 (上段) と β-TCP 単独 (下段) を用いた場合の骨形成の違い。マウス背筋筋下埋植モデル (3 週)。ポリマーを使用した場合の方が有意に大きな骨形成が得られた。

BMP : bone morphogenetic protein, rhBMP : ヒト型リコンビナント BMP, PLA-DX-PEG : ポリ乳酸-パラジオキサノン-ポリエチレングリコール, β-TCP : β-tricalcium phosphate

(A : 文献 4 より改変, B : 筆者ら提供)

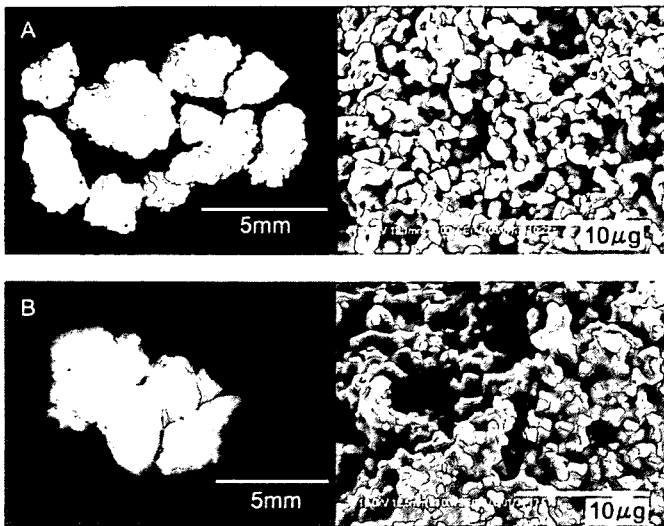


図3 PLA-DX-PEGによる β -TCPの表面コーティング処理

A：コーティング前の顆粒状 β -TCPの全体像と走査電顕写真。

B：コーティング処理後。 β -TCP表面に一様にBMPを含有したPLA-DX-PEGのコーティングが可能であり、骨伝導能を持つ β -TCPにBMPの骨誘導能を付加することができる。

PLA-DX-PEG：ポリ乳酸-パラジオキサノン-ポリエチレングリコール、 β -TCP： β -tricalcium phosphate、BMP：bone morphogenetic protein

(文献5より)

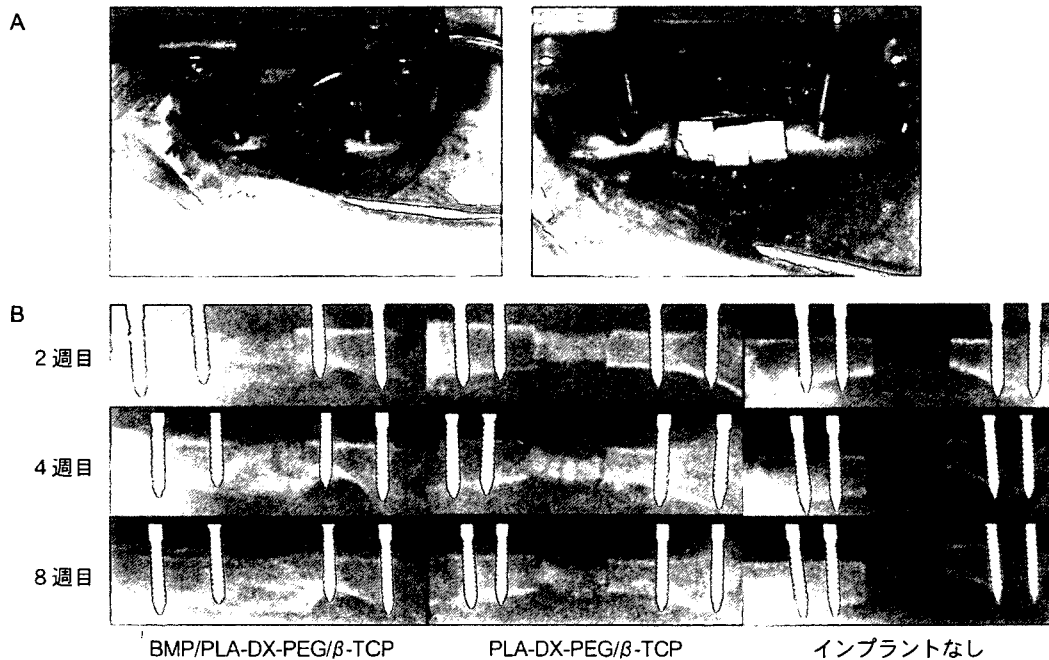


図4 家兎大腿骨欠損モデルを用いたBMP/ポリマー/ β -TCP複合体による骨欠損修復実験

A：家兎大腿骨骨幹部に作製した1.5 cmの骨欠損(左)とBMP/ポリマー/ β -TCP複合体を埋植したところ(右)。創外固定器を装着している。

B：術後の経時的変化。BMP/PLA-DX-PEG/ β -TCP群でのみ骨癒合が得られた。

BMP：bone morphogenetic protein、 β -TCP： β -tricalcium phosphate、PLA-DX-PEG：ポリ乳酸-パラジオキサノン-ポリエチレングリコール

(文献7より改変)

これらのポリマーは常温でゲル状であるが、有機溶媒に溶解し、人工骨やインプラント表面に付加させることができるという特徴がある(図3)。我々は、生体吸収性の人工骨である β -tricalcium phosphate (β -TCP)をポリマーと組み合わせることにより、新しいBMP担体として用いている⁵⁾。このBMP/ポリマー/ β -TCP複合体は、ポリマー単独の特性に加えてインプラントとしての容量を増やせること、操作性がよいこと、形状を維持できること、生体内に埋植後X線撮影によって追跡可能であることなどの特性が加わっており、より臨床応用に近いBMPの人工合成担体であるといえる。

我々はBMP/ポリマー/ β -TCP複合体を用いて、脊椎固定⁶⁾や大腿骨欠損修復⁷⁾、感染性骨欠損修復⁸⁾などを想定したモデル動物を作成し、そのBMP担体としての効果を実証している(図4)。

BMPの骨誘導活性の促進

BMPの臨床応用に際しての課題のひとつに、ヒトではBMPに対する応答性が低いということがあげられる。そのためにヒトでは高用量のBMPが必要となり、効果は確実にあるものの高価な治療法になるため、BMPの臨床応用の普及に障壁となっている。その解決策として、優れたDDSの開発のほかに、BMPの骨誘導活性を増幅する薬剤との併用や、BMP合成法改良によるBMP生産の低コスト化などが考えられている。

最近の研究報告ではホスホジエステラーゼ阻害薬(ペントキシフィリン、ロプリラム)^{8) 9)}、プロスタグランジンE₂(PGE₂)の受容体のひとつであるEP4のアゴニスト(EP4A, ONO-4819)¹⁰⁾、sulfated polysaccharides¹¹⁾、vascular endothelial growth factor(VEGF)¹²⁾や人工的に作成されたある種のペプチドであるB2A2¹³⁾などがBMPの骨誘導活性を特異的に増幅する作用を持つことが報告されており、将来的に、これらの薬剤を臨床応

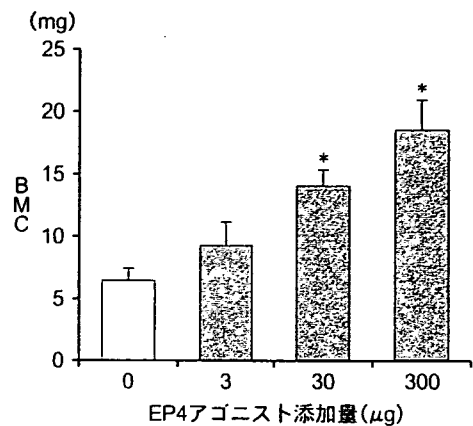


図5 EP4アゴニストの骨形成促進効果

マウス異所性骨化モデルを用いてプロスタグランジンEのレセプターであるEP4の特異的アゴニスト(ONO-4819)を段階的に添加し、骨形成に及ぼす作用を検証した。PLA-DX-PEG 30mg/rhBMP-2 5μg使用。EP4アゴニスト用量依存的にBMCは増大した。

PLA-DX-PEG: ポリ乳酸-パラジオキサノン-ポリエチレングリコール, BMP: bone morphogenetic protein, rhBMP: ヒト型リコンビナントBMP, BMC: 骨塩量 (文献10より)

用することにより効果的・効率的な骨組織の再生が可能になると考えられる。これらの薬剤と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促進効果が期待できる(図5)。

遺伝子導入による骨再生、細胞を用いた組織工学など

骨再生について広くBMPの臨床応用という面で見ると、リコンビナントBMPを用いたサイトカイン療法以外に、BMP遺伝子を用いた遺伝子治療も将来的に可能性がある^{14) 15)}。しかし、遺伝子導入のための安全かつ有効な発現ベクターの開発や、骨組織再生が必要な限局した部位における遺伝子発現制御方法など、解決すべき課題が多く、まだ実用には時間が必要と思われる。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¹⁶⁾。しかし、実用化の面から見ると、大掛かりな設備、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課題が残されている。

おわりに

本稿では我々の研究結果を中心に、BMPの骨再生医学への応用について述べた。様々な骨再生を目指した基礎的研究が進行中であるが、遺伝子組み換え体サイトカインであるrhBMPを用いた骨再生医療は、実用化の面からはより先行した技術であると考えている。それによって近い将来には自家骨移植が不要となり、治療期間短縮とともに、効率よい骨再生が可能となって、より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) Boden SD, Kang J, Sandhu H, et al : Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial : 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 27 (23) : 2662-2673, 2002.
- 2) Govender S, Csimma C, Genant HK, et al : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures : a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (12) : 2123-2134, 2002.
- 3) Sajto N, Okada T, Horiuchi H, et al : A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat Biotechnol* 19 (4) : 332-335, 2001.
- 4) Kato M, Toyoda H, Namikawa T, et al : Optimized use of a biodegradable polymer as a carrier material for the local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Biomaterials* 27 (9) : 2035-2041, 2006.
- 5) Matsushita N, Terai H, Okada T, et al : A new bone-inducing biodegradable porous beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res A* 70 : 450-458, 2004.
- 6) Namikawa T, Terai H, Suzuki E, et al : Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate in a rabbit model. *Spine* 30 (15) : 1717-1722, 2005.
- 7) Yoneda M, Terai H, Imai Y, et al : Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. *Biomaterials* 26 (25) : 5145-5152, 2005.
- 8) Suzuki A, Terai H, Toyoda H, et al : A biodegradable delivery system for antibiotics and recombinant human bone morphogenetic protein-2 : A potential treatment for infected bone defects. *J Orthop Res* 24 (3) : 327-332, 2006.
- 9) Sugama R, Koike T, Imai Y, et al : Bone morphogenetic protein activities are enhanced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate through suppression of Smad6 expression in osteoprogenitor cells. *Bone* 38 (2) : 206-214, 2006.
- 10) Toyoda H, Terai H, Sasaoka R, et al : Augmentation of bone morphogenetic protein-induced bone mass by local delivery of a prostaglandin EP4 receptor agonist. *Bone* 37 (4) : 555-562, 2005.
- 11) Takada T, Katagiri T, Ifuku M, et al : Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 278 (44) : 43229-43235, 2003.
- 12) Huang YC, Kaigler D, Rice KG, et al : Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res* 20 (5) : 848-857, 2005.
- 13) Lin X, Zamora PO, Albright S, et al : Multidomain synthetic peptide B2A2 synergistically enhances BMP-2 *in vitro*. *J Bone Miner Res* 20 (4) : 693-703, 2005.
- 14) Yang IH, Kim H, Kwon UH, et al : De novo osteogenesis from human ligamentum flavum

- by adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfer. *Spine* 30(24) : 2749-2754, 2005.
- 15) Park J, Ries J, Gelse K, et al: Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer : a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* 10 (13) : 1089-1098, 2003.
- 16) Kasten P, Luginbuhl R, van Griensven M, et al: Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials* 24 (15) : 2593-2603, 2003.

特集 脊椎脊髄病学 最近の進歩 2006

骨粗鬆症性脊椎椎体骨折における予後不良因子の検討

辻尾 唯雄 中村 博亮 星野 雅俊 寺井 秀富 高岡 邦夫

臨 床 整 形 外 科

第41巻 第4号 別刷

2006年4月25日 発行

医学書院

骨粗鬆症性脊椎椎体骨折における予後不良因子の検討*

辻尾 唯雄** 中村 博亮** 星野 雅俊**
寺井 秀富** 高岡 邦夫**

Evaluation of Prognostic Factors for Osteoporotic Vertebral Fractures

Tadao Tsujio, Hiroaki Nakamura, Masatoshi Hoshino, Hidetomi Terai, Kunio Takaoka

臨整外 41:499~506, 2006

●Key words : osteoporosis(骨粗鬆症), vertebral fracture(椎体骨折), magnetic resonance imaging(磁気共鳴画像)

高齢者の骨粗鬆症性椎体骨折後の骨癒合例と偽関節例における受傷機転、骨折高位、画像所見の相違について検討を行った。骨粗鬆症に伴う新鮮椎体骨折例で、44例50椎体を対象とした。性別の内訳は男性12例、女性32例で、受傷時年齢は、平均73.3歳であった。検討項目は、受傷原因、骨折高位、MRIのT1、T2強調矢状断像での輝度変化について行った。偽関節へ移行するものは、外傷機転が明らかでない症例、胸腰椎移行部レベルの骨折例、椎体の後壁損傷例、T1、T2強調矢状断像で広範囲に低輝度変化を示す例が多かった。

The present study evaluated prognostic factors for osteoporotic vertebral fractures. Forty-four patients, 12 men and 32 women, with 50 osteoporotic vertebral fractures were enrolled in the study. The average patient age at the time of injury was 73.3 years. Bony union was obtained in 38 cases, and pseudoarthrosis was observed in 12 cases. In each group, the cause of the fracture, the fracture level, and imaging characteristics (including MR images) were evaluated. In the pseudoarthrosis group, the trauma that induced the fracture tended to be much less severe than that in the bone-union group. The ratio of vertebral collapse was not a factor inducing non-union, but injury of the posterior wall of the body may be a factor causing non-union. Large low-intensity changes both on T1- and T2-weighted images suggesting acute hematoma within the vertebral body may be a predictor of pseudoarthrosis following osteoporotic vertebral fracture.

はじめに

高齢者人口比率の増加に伴い、骨粗鬆症の有病者数も増加し、日本国内で1,000万人を超えるといわれている¹²⁾。骨粗鬆症に伴う骨折のなかで脊椎椎体骨折は最も頻発する骨折である。超高齢化社会を迎えるに当たって、今後ますますその頻度が増加する可能性がある。現在、椎体骨折は高齢

者の寝たきりの原因の上位を占め、世界一の長寿国となった日本にとって、当該症例の寝たきりを防止することは重要な問題である。

現在、骨粗鬆症性椎体骨折の治療として確立された治療指針はなく、一般的に、安静臥床およびその後の体幹ギプス固定、コルセット装着による保存療法¹¹⁾が行われ、多くの症例では疼痛が軽快する。しかし、長期間の保存治療にもかかわらず、

* 2005.12.1 受稿

** 大阪市立大学大学院医学研究科整形外科〔〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3〕Department of Orthopaedic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine

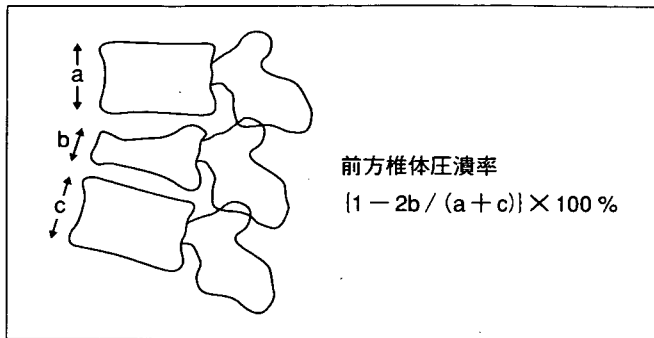


図1 前方椎体圧潰率
単純X線側面にて計測

骨癒合が得られず椎体偽関節を生じ、椎体部での異常可動性によって生じるとされる強い疼痛によって、寝たきりを余儀なくされることもある。高齢者が一度寝たきりになった場合、再び離床させることは困難で、肺炎などの重篤な合併症が危惧される。

近年、骨粗鬆症性椎体骨折偽関節例に対して、侵襲の少ない椎体形成術^{1,3,5,13)}が広く行われ、その優れた除痛効果などが報告されている。椎体骨折後早期に偽関節の危険因子を同定できれば、不必要な保存的治療の期間を短縮することができ、寝たきり状態を防ぐことが可能である。今回われわれは椎体骨折後の予後不良因子を解明すべく、骨癒合例と偽関節例へ移行する症例群の疫学および画像的差異を検討したので報告する。

対象および方法

対象は、当大学または関連施設を受診し新鮮な椎体骨折を認めた85例中、6カ月以上経過を観察することができた44例50椎体とした。

性別の内訳は、男性12例、女性32例で、いずれの症例も骨粗鬆症を有していた。受傷時年齢は、57～92歳の平均73.3歳であった。

受傷後6カ月の時点で、単純X線側面像にて受傷椎体にvacuum cleftといわれる透亮像を認めるものか、前後屈にて可動性を認めるものを偽関節例(以下、偽関節群)とし、骨癒合がみられた症例(以下、骨癒合群)と比較検討を行った。まず両群の受傷時年齢の差異について検討した。受傷原因について、外傷歴がはっきりしない症例と転倒な

ど外傷歴が明白な症例に分類した。さらに、外傷機転を自己転倒などの軽度なものと、階段からの転倒などの重度なものに分類して検討した。

次に単純X線側面像において、骨折高位と骨折椎体上下の前縦靭帯骨化の有無を検討した。また隣接椎体の前方椎体高に対する骨折椎の前方椎体高の比率を算出し、前方椎体圧潰率として検討を加えた(図1)。

全例、受傷早期にMRIを実施していたが、受傷日からMRI撮影までの日数は平均11.2日で、44例中28例は1週間以内に行われていた。

MRI T1強調矢状断像の椎体正中像における低輝度領域にて3タイプに分類を行った。低輝度領域が限局しているのを部分型partial typeとし、椎体全体に変化が及んでいる症例群においては、傍正中中部での輝度変化の広がりによってさらに分類を行った。正中中部とそれより2スライス辺縁の傍正中中部における低輝度領域をNIH imageを用いて面積を測定し、低輝度領域の面積が正中中部の変化と比較して50%以上の症例をtotal type、50%未満をsubtotal typeとして検討を加えた(図2)。

さらにT2強調矢状断像においては、椎体中央での輝度変化、領域にて4タイプに分類を行った。椎体に輝度変化を認めないN type、高輝度変化のものをH typeとした。低輝度変化を認めるものを局所的なものと同範囲にみられるものに分類し、それぞれLP type、LW typeとした(図3)。椎体後壁損傷の有無に対する検討は、T2強調矢状断正中像で行い、受傷椎体の後壁が椎体上下端から明らかに膨隆しているものを後壁損傷ありとした。

統計学的検討にはMann-WhitneyのU検定を用いて危険率5%未満で有意差ありとした。

結果

骨癒合群は34例38椎体に認め、偽関節群は11例12椎体に認められた。受傷時の平均年齢はそれぞれ72.9歳、76.2歳で、後者のほうが高齢であったが有意な差は認めなかった。またそれぞれの症例群の中で70歳以上の占める割合は、骨癒合群で22例(65%)、偽関節群で9例(82%)で

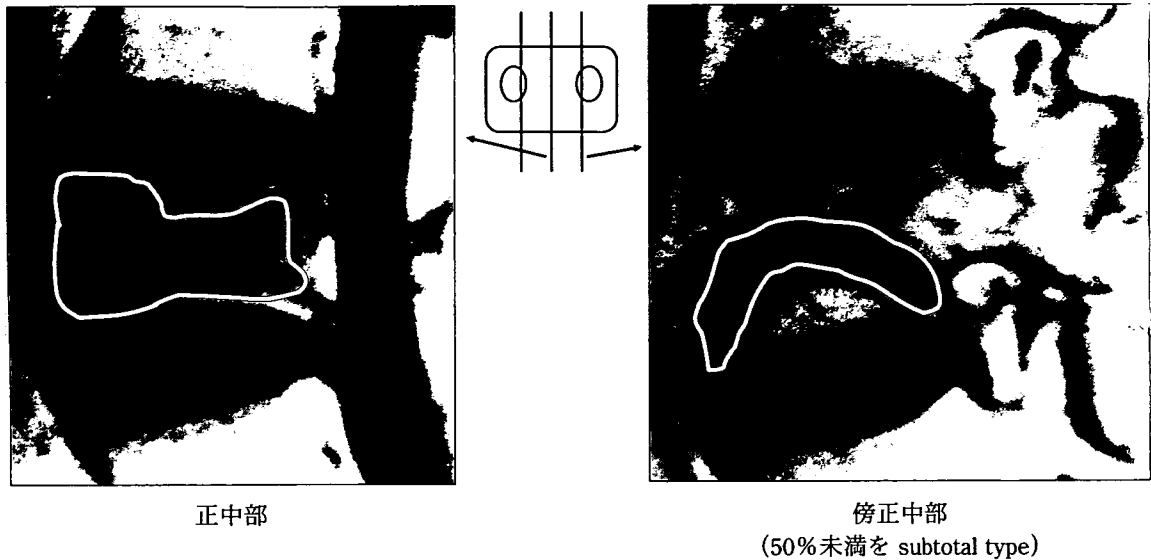


図 2 MRI T1 強調矢状断像での分類, 評価

正中中部とそれより2スライス辺縁の傍正中中部における低輝度領域の面積を NIH image を用いて測定する。低輝度領域の面積が正中中部の変化と比較して 50% 以上の症例を total type, 50% 未満を subtotal type と分類した。



図 3 MRI T2 強調矢状断像での分類
椎体中央矢状断像での輝度変化, 領域にて 4 型に分類した。

- a : 変化なし (N type)
- b : 高輝度型 (H type)
- c : 低輝度局所型 (LP type)
- d : 低輝度広範囲型 (LW type)

あった。

偽関節群には、既往歴として、軽度の慢性腎不全、喘息、糖尿病を持つものを 1 例ずつ含むが、

ステロイドの治療歴や骨代謝疾患を有するものはなく、骨癒合群と比べて、特に骨癒合を遅延させる要因を持つものはなかった。