ラット下顎骨延長モデルにおける Smads の動態

山 中 雅 博 ・ 吉 岡 泉 ・ 土 生 学
富 永 和 宏

九州歯科大学学生体機能科学専攻口腔顎顔面外科学講座病態制御学分野

平成 21 年 12 月 17 日受付

平成 22 年 2 月 24 日受理

Expression of Smads in Distraction Osteogenesis of Rat Mandibles

Masahiro Yamanaka, Izumi Yoshioka, Manabu Habu
and Kazuhiro Tominaga

Division of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Science,
Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Science of Physical Functions,
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

E-mail: r07yamanaka@fa.kyu-dent.ac.jp

Abstract

The transforming growth factor-beta (TGF-beta) super family includes TGF-beta and bone morphogenetic proteins (BMP) which play an important role during fracture healing and distraction osteogenesis. Smads are intracellular signal transmission mediators of BMP and TGF-beta. Smad 1, 5, 8 are receptor-regulated Smads (R-Smad) which transmits signals of BMPs. Smad 2, 3 are receptor-regulated Smads (R-Smad) which transmits signals of TGF-beta. Smad 4 is a common partner Smad (Co-Smad) which combines signal transmissions of R-Smads. Smad 6, 7 are inhibitory Smads (I-Smad) which inhibits signal transmissions of R-Smads. The aim of this study was to evaluate the expression of R-Smads, Co-Smad, I-Smads, BMP-2, 4 and TGF-beta in distraction osteogenesis of rat mandibles.

Left mandibular osteotomy was performed and fixed with an external distractor in 30 rats. After a latency period of 5 days, the mandible was lengthened at a rate of 0.4 mm/day for 8 days (total 3.2 mm). Animals were sacrificed immediately after latency, during distraction, immediately after completion of distraction and after 7 days and 14 days of consolidation. Immunohistochemical analysis was performed to investigate the expressions of R-Smads, Co-Smad, I-Smads, BMP-2, 4 and TGF-beta. Expression of Smad 1, 2, 3, 5, 8, BMP-2, 4 and TGF-beta increased during the distraction phase and gradually decreased towards the consolidation period. On the other hand, expression of Smad 6, 7 was low during the

distraction phase, while it increased during the consolidation period. Smad 1, 5, 8 showed a spatial and temporal pattern of expression similar to that of BMP-2, 4 during distraction osteogenesis. Similarly, Smad 2, 3 showed a similar expression pattern to TGF- β . The increase in expression of I-Smads after completion of distraction indicates its role in the bone remodeling and maturation process.

Key words: Distraction osteogenesis/TGF- β /BMPs/Smads/immunohistochemistry

抄 録

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) スーパーファミリーは TGF- β や Bone morphogenetic protein (BMP) などに大別され、骨折や骨延長法の骨形成に重要な役割を担っている。Smads は TGF- β や BMP の細胞内シグナル伝達因子である。このうち特異型 Smad である Smad1, 5, 8 は BMP のシグナルを、そして Smad2, 3 は TGF- β のシグナルを伝達する。共有型 Smad である Smad4 は特異型 Smad と結合し、標的遺伝子の発現を誘導する。抑制型 Smad である Smad6, 7 は特異型 Smad と共有型 Smad の結合を阻害する。本研究では下顎骨延長モデルにおける Smad, BMP, TGF- β の動態を明らかにするために、その局在と経時の変化を免疫組織化学的に検索した。

Wistar 系ラットを用い、全身麻酔下に下顎骨骨切り後、自作の延長装置を装着した。5 日間の待機期間の後、1 日 0.4 mm で 8 日間 (総延長量 3.2 mm) の延長を行い、待機期間終了後、延長開始 4 日後、延長終了直後、延長終了 7 日後、延長終了 14 日後に標本を作製した。連続切片を作製し、Smad1~8, BMP-2, 4, TGF- β を免疫組織化学的に観察した。

その結果、Smad1, 5, 8 と BMP-2, 4 の発現が類似し、Smad2, 3 と TGF- β の発現が類似していた。また、Smad1, 2, 3, 5, 8, BMP-2, 4, TGF- β の発現は延長期間中に著明に認められたが、その後漸減した。逆に Smad6, 7 の発現は延長期間中には少なく、延長終了後に増加していた。延長終了後には抑制型 Smad が優位に機能し、骨の成熟に関与していると考えられた。

キーワード：顎骨延長法/TGF- β /BMP/Smad/免疫組織化学的染色

緒 言

Transforming growth factor- β (TGF- β) スーパーファミリーは骨折や骨延長法の骨形成に重要な役割を示し、TGF- β は血管新生を担い¹⁾、Bone morphogenetic protein (BMP) は未分化間葉細胞を骨芽細胞や軟骨細胞へ分化させる²⁾ とされる。

TGF- β や BMP のシグナル伝達は Smads が担い、細胞の核内で転写因子と共同し標的遺伝子の転写調節を行う³⁾。Smads は特異型 Smad, 共有型 Smad, 抑制型 Smad の 3 グループに分けられる⁴⁾。特異型 Smad は、TGF- β のシグナルを伝える Smad2, 3 と BMP のシグナルを伝える Smad1, 5, 8 に分けられる。また、共有型 Smad (Smad4) はリン酸化された特異型 Smad と複合体を形成し、細胞の核内に移行して標的遺伝子の転写調節に関与する⁵⁾。さらに、抑制型 Smad (Smad6, 7) は

特異型 Smad と共有型 Smad の結合を阻害し⁶⁻¹⁰⁾、シグナル調節を行うとされている¹¹⁾。

顎骨延長法は顎顔面領域において、顎骨の発育障害を伴う種々の先天性疾患や発育異常¹²⁾、腫瘍切除後の顎骨再建¹³⁾、萎縮した顎堤の増生¹⁴⁾ などに幅広く適用されている。しかし、顎骨延長法は一期的な骨移植術と比較して治療期間が長いという欠点を有する。近年、各種の疾患の治療にサイトカインや遺伝子導入を用いた治療法が進歩しており、骨延長法においても、より短期間に、また有効に骨形成をさせるためのサイトカイン補充療法や遺伝子治療の道を開くことは意義がある。

顎骨延長時の Smads の動態について Khanal¹⁵⁾ らはラットの下顎骨延長における Smad1, 5, 8 の発現を観察している。しかし、その他の Smads の動態は不明である。そこで、今回、ラットの下顎骨延長モデルにおける Smads 全体の動態を分析し、TGF- β や BMP の発現と

の関連を明らかにし、有効なサイトカイン補充療法などに結びつけるため、免疫組織化学的に観察を行った。

材料および方法

I. 実験材料

実験動物は生後 12 週齢、体重約 400 g の雄ラット（Wistar 系）30 匹を用いた。全身に異常がなく健康であることを確認したうえで実験に供した。

なお、本実験は「九州歯科大学における動物実験に関する指針」に従い、九州歯科大学動物倫理委員会の承認を受けた。

II. 実験方法

ラットはジエチルエーテルにて吸入麻酔を行い、抱水クロラル 3.5 mg/kg の腹腔内注射による全身麻酔を

施した後、左側下顎骨下縁に沿い皮膚切開を行い、下顎骨を露出した。骨切りは下顎最後臼歯後方で行った。骨切り部位から対称的にスクリュー（直径 1.65 mm）を経皮的に貫通させ、即時重合レジンによって自作延長装置と固定した（図 1）。骨膜は吸収性縫合糸で縫合し、皮膚は、ナイロン製非吸収性縫合糸で縫合した。待機期間 5 日間の後に下顎骨を 1 日 0.4 mm、8 日間延長（総延長量 3.2 mm）した（表 1）。なお、感染防止目的にセファゾリンナトリウム（50 mg/kg）を術後 1 回筋肉内投与した。

III. 観察方法

待機期間終了後、延長開始 4 日後、延長終了直後、延長終了 7 日後ならびに延長終了 14 日後に各群 6 匹ずつを抱水クロラルの過剰腹腔内注射にて深麻酔後、10 % リン酸緩衝化ホルマリン液にて灌流固定を行い、安楽死させた。その後、下顎骨を摘出し、10 % リン酸緩衝化ホルマリン液にて 24 時間固定を行った。標本は 10 % Ethylenediamine Tetraacetate (pH7.2) にて 6 週間脱灰した後、低温溶融パラフィンにて包埋し 6 μ m の連続切片を作製し、下記のような染色法を行った。

A. ヘマトキシリン・エオジン染色（H-E 染色）

通法にしたがって、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、組織学的所見を観察した。

B. 免疫組織化学的染色

VECTASTAIN ELITE ABC キット（VECTASTAIN 社製）を用いて以下のように免疫組織化学的染色を行った。まず切片に 0.3 % 過酸化水素メタノール溶液を作用させて内因性ペルオキシターゼ活性の除去後、正常血清（VECTASTAIN 社製）にてブロッキングを行った。一次抗体としてマウス IgG1 ポリクロナール抗体 Smad1

図1 ラット下顎骨骨切りの図。
下顎最後臼歯後方で骨切りを行った。

表1 実験スケジュール

(sc-7965), Smad4 (sc-7966), ヤギ IgG ポリクロナール抗体 Smad2 (sc-6200), Smad2/3 (sc-6202), Smad5 (sc-7443), Smad6 (sc-6034), Smad7 (sc-9183), Smad8 (sc-7442), BMP-2 (sc-6895), BMP-4 (sc-6896), ウサギ IgG ポリクロナール抗体 TGF- β (sc-146) (いずれも Santa Cruz 社製) を希釈 (100 倍) し, それぞれ室温にて 30 分間反応させ, ビオチン標識二次抗体そしてアビジン-ビオチン標識酵素複合体 (VECTASTAIN 社製) に反応させた. 次に 3-3'-diaminobenzidine 溶液と酵素反応により発色し, ヘマトキシリンにて核染色を行った.

染色細胞数の測定は顕微鏡下 (200 倍) にて, 延長断端部, 延長中央部 (新生骨梁部), 骨膜部の 3 か所で行った. グリッドが重複しないように 50 個以上の細胞を含むグリッドを 3 枠設定し, 各枠中の陽性細胞率の平均値で評価した.

結 果

I. H-E 染色所見

待機期間終了後では, 骨切り部は膠原線維と新生血管の増生を伴う肉芽組織によりほぼ満たされていた.

延長開始 4 日後では, 線維性結合組織は延長軸方向に沿って認められ, 延長中央部は線維性結合組織で満たされていた. 母骨に近接する部位には未熟な新生骨梁がわずかに認められた.

延長終了直後では, 延長中央部は延長方向に沿った線

維性結合組織によりほぼ満たされ, 延長断端部には細く幼若な新生骨梁が認められた. 母骨と近接する新生骨梁は網状構造を呈しており, 骨膜周囲と新生骨梁周囲には多数の骨芽細胞が認められた (図 2).

延長終了 7 日後では, 延長中央部には密集した線維性結合組織が認められ, 幼若な新生骨梁も少量認められた. 新生骨梁の周囲には, 骨芽細胞が認められ, 骨梁内部への骨細胞の封入を認めた. 断端部付近の新生骨梁は網状構造を呈していた.

延長終了 14 日後では, 骨芽細胞数と新生骨梁の量は延長終了 7 日後と比べて増加していた. 延長中央部の骨梁の幅が延長終了 7 日後と比べ厚くなっており, 延長断端部では延長中央部との境界が不明瞭となっていた.

II. 免疫組織化学的染色所見

新生骨梁部の免疫組織化学的染色写真を図 3 に, 免疫組織化学的染色における陽性細胞の割合を表 2 に示す.

A. Smad1, 5, 8

待機期間終了後では, 骨切り部の未分化間葉細胞に Smad1, 8 の発現が認められ, 延長終了直後まで Smad1, 5, 8 の陽性細胞の割合は経日的に増加していた. Smad1 は延長開始 4 日後から延長終了直後にかけて, そして Smad5, 8 は延長開始 4 日後から延長終了 7 日後にかけて延長断端部の新生骨梁内の骨細胞と周囲の骨芽細胞のほとんどで発現が認められた. 同部の Smad1, 5, 8 陽性細胞の割合は経日的に減少し, 延長終了 14 日後では, Smad1, 5 の発現はほとんど認められなかったが, Smad8 はわずかに陽性所見を認めた.

B. Smad2, 3

待機期間終了後では, 骨切り部に Smad2, 3 の発現は認められなかった. 延長開始 4 日後から延長終了直後まで, 延長中央部および骨膜周囲の未分化間葉細胞でわずかに Smad2, 3 の発現が認められ, 延長断端部の新生骨梁内の骨細胞と周囲の骨芽細胞のほとんどで Smad2, 3 の発現が認められた. また, Smad2, 3 の陽性細胞の割合は延長終了 7 日後, 14 日後と経日的に減少していた.

C. Smad4

待機期間終了後では, 骨切り部に Smad4 の発現は認められなかった. 延長開始 4 日後では, 延長中央部および骨膜周囲の未分化間葉細胞でわずかに, また, 延長断端部新生骨梁内の骨細胞と周囲の骨芽細胞のほとんどで Smad4 の発現が認められた. 延長終了直後では, Smad4 の陽性細胞の割合が延長開始 4 日後と比較して減少し, 延長終了 7 日後, 14 日後では, 延長部に Smad4 の発現は認められなかった.

図 2 延長終了直後の病理組織所見 (×40 H-E 染色).

- a: 線維性結合組織
- b: 新生骨梁
- c: 骨膜
- d: 延長中央部
- e: 延長断端部

図3 新生骨梁部の免疫組織化学的染色 (×400).

D. Smad6, 7

待機期間終了後では、骨切り部に Smad6, 7 の発現は認められなかった。延長開始 4 日後では、延長中央部および骨膜周囲の未分化間葉細胞、延長断端部新生骨梁内の骨細胞と周囲の骨芽細胞にわずかに Smad6, 7 の発現が認められた。延長終了直後では、Smad6, 7 の陽性細胞の割合が延長開始 4 日後と比較して増加し、延長終了 7 日後、延長終了 14 日後にかけて、延長断端部網状骨内

の骨細胞と周囲の骨芽細胞のほとんどに Smad6, 7 の発現が認められた。

E. BMP-2, 4

待機期間終了後では、骨切り部の未分化間葉細胞に BMP-2, 4 の発現がわずかに認められた。延長開始 4 日後から延長終了直後まで、延長中央部の未分化間葉細胞で BMP-2, 4 の陽性細胞の割合が増加していた。また、延長断端部の新生骨梁内の骨細胞と周囲の骨芽細胞のほ

表 2 免疫組織化学的染色の陽性細胞表

		時期	線維性結合組織	新生骨梁	骨膜周囲
特異型 Smad	Smad 1	待機期間終了後	18.47±0.02	/	22.57±0.07
		延長開始 4 日後	23.87±0.05	89.10±0.03	25.83±0.01
		延長終了直後	23.53±0.04	89.93±0.07	22.47±0.09
		延長終了 7 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
	Smad 5	待機期間終了後	0.00±0.00	/	18.08±0.07
		延長開始 4 日後	19.93±0.03	86.30±0.10	26.40±0.03
		延長終了直後	54.67±0.08	77.37±0.06	27.87±0.05
		延長終了 7 日後	/	24.57±0.02	23.67±0.02
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
	Smad 8	待機期間終了後	22.90±0.01	/	24.33±0.07
		延長開始 4 日後	53.20±0.07	92.63±0.03	61.13±0.02
		延長終了直後	57.50±0.07	86.67±0.02	57.67±0.10
		延長終了 7 日後	/	24.60±0.04	61.93±0.05
		延長終了 14 日後	/	17.33±0.11	0.00±0.00
共有型 Smad	Smad 2	待機期間終了後	0.00±0.00	/	0.00±0.00
		延長開始 4 日後	22.97±0.01	86.97±0.09	24.50±0.04
		延長終了直後	22.47±0.04	56.27±0.11	23.53±0.04
		延長終了 7 日後	/	28.07±0.03	0.00±0.00
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
	Smad 3	待機期間終了後	0.00±0.00	/	0.00±0.00
		延長開始 4 日後	27.67±0.05	80.23±0.04	22.60±0.03
		延長終了直後	27.50±0.05	52.47±0.14	20.93±0.02
		延長終了 7 日後	/	24.90±0.04	0.00±0.00
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
	Smad 4	待機期間終了後	0.00±0.00	/	0.00±0.00
		延長開始 4 日後	7.47±0.03	80.80±0.03	25.03±0.07
		延長終了直後	11.53±0.09	52.20±0.01	19.27±0.03
		延長終了 7 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
抑制型 Smad	Smad 6	待機期間終了後	0.00±0.00	/	0.00±0.00
		延長開始 4 日後	25.23±0.01	29.57±0.00	24.87±0.08
		延長終了直後	45.90±0.06	51.50±0.11	44.37±0.15
		延長終了 7 日後	/	75.00±0.07	22.17±0.05
		延長終了 14 日後	/	79.00±0.13	0.00±0.00
	Smad 7	待機期間終了後	0.00±0.00	/	0.00±0.00
		延長開始 4 日後	26.80±0.01	28.23±0.03	22.67±0.05
		延長終了直後	27.20±0.05	54.30±0.08	23.67±0.02
		延長終了 7 日後	/	78.30±0.09	51.03±0.02
		延長終了 14 日後	/	87.87±0.02	22.30±0.06
	BMP-2	待機期間終了後	20.50±0.03	/	21.57±0.08
		延長開始 4 日後	58.03±0.03	81.47±0.07	26.97±0.02
		延長終了直後	51.70±0.09	80.20±0.08	15.20±0.03
		延長終了 7 日後	/	23.90±0.03	0.00±0.00
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
	BMP-4	待機期間終了後	26.97±0.02	/	16.30±0.02
		延長開始 4 日後	54.20±0.07	91.07±0.03	18.93±0.02
		延長終了直後	52.13±0.04	77.07±0.07	23.53±0.05
		延長終了 7 日後	/	22.73±0.07	0.00±0.00
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00
	TGF-β	待機期間終了後	20.63±0.01	/	19.17±0.03
		延長開始 4 日後	14.93±0.02	85.40±0.05	19.40±0.01
		延長終了直後	24.87±0.03	56.70±0.05	18.57±0.08
		延長終了 7 日後	/	20.90±0.02	0.00±0.00
		延長終了 14 日後	/	0.00±0.00	0.00±0.00

/ : 該当組織の存在なし

とんどで BMP-2, 4 の発現を認めた。延長終了 7 日後から延長終了 14 日後にかけて、骨膜周囲の骨芽細胞および延長断端部の網状骨内の骨細胞と周囲の骨芽細胞で BMP-2, 4 の陽性細胞の割合が経日的に減少していた。

F. TGF- β

待機期間終了後では、骨切り部での未分化間葉細胞に TGF- β の発現がわずかに認められた。延長開始 4 日後では、延長断端部の新生骨梁内の骨細胞と周囲の骨芽細胞のほとんどで TGF- β の発現が認められた。待機期間終了後から延長終了直後まで、延長中央部および骨膜周囲の未分化間葉細胞でわずかに TGF- β の発現が認められた。延長終了直後から延長終了 14 日後にかけて延長断端部網状骨内の骨細胞と周囲の骨芽細胞で TGF- β の陽性細胞の割合が経日的に減少していた。

考 察

TGF- β スーパーファミリーは多彩な生理作用を有するサイトカイン群であり、哺乳類では現在までに 30 種類以上が知られ、TGF- β 、Activin/Nodal、BMP などが含まれる¹⁾。TGF- β は細胞増殖の抑制と分化の促進、細胞外マトリックスをはじめさまざまな蛋白の合成促進、免疫抑制など多くの機能を有する¹⁰⁾。BMP は骨組織や軟骨組織における細胞分化に密接に関係し、未分化間葉細胞から骨芽細胞または軟骨細胞へ、あるいは前骨芽細胞から骨芽細胞への分化に関わることが知られ、^{17, 18)}、骨折や骨延長法の治癒にも重要な役割を果たす¹⁹⁻²⁵⁾。

Smads は細胞内シグナル伝達因子であり、哺乳類では 8 種類が知られ、特異型 Smad、共有型 Smad、抑制型 Smad に分類される。特異型 Smad である Smad1, 5, 8 は BMP によって活性化され、Smad2, 3 は TGF- β 、Activin/Nodal によって活性化される¹⁾。リガンドは II 型受容体と複合体を形成し、この複合体は I 型受容体を活性化する。さらに、活性化した I 型受容体は特異型 Smad をリン酸化する²⁶⁾。その結果、活性化された特異型 Smad は、共有型 Smad と結合可能となり、形成された複合体は核へ移行する。核において他の転写因子と結合し、標的遺伝子のプロモーターに作用する²⁶⁾。

骨延長法における Smads の動態を調べた免疫組織化学的研究は少なく、長管骨では Haque ら²⁷⁾、顎骨では Khanal ら¹⁵⁾ と Farhadieh ら²⁸⁾ の報告があるのみである。このなかで Khanal ら¹⁵⁾ はラットの骨折モデルと顎骨延長モデルで Smad1, 5, 8 と BMP-2, 4 の発現が類似していることを報告しているが、本研究でも Smad1, 5, 8

は BMP-2, 4 の発現と類似していた。また本研究で顎骨延長法での Smad2, 3 と TGF- β の発現が類似していることが明らかとなった。

Khanal ら¹⁵⁾ はラットの下顎骨骨折モデルの研究で、Smad1, 5, 8 および BMP-2, 4 は骨折後 3 日目に多く発現し、骨折初期の治癒に関与していると報告している。本研究で Smad1, 5, 8 は延長中に高い発現を示し、延長終了直後まで高い発現を維持していた。また、Smad2, 3 および TGF- β は骨折初期に高く発現するとされているが、本研究では骨切り後、一定期間経過した延長中に高い発現を示し、延長終了 7 日後まで高い発現を維持していた。さらに Smad4 は Yu ら²⁹⁾ の研究で骨折 3 日目に高く発現していたが、本研究では延長開始 4 日後から発現を示し、延長終了直後まで発現を維持していた。このように特異型 Smad、および共有型 Smad の発現時期が骨折よりも顎骨延長法で長期化していることから、特異型 Smad および共有型 Smad の発現に骨延長による機械的伸張力が関与していることが示唆された。

一方、抑制型 Smad は、活性化された I 型受容体に結合して特異型 Smad の活性化と競合することによってシグナルを抑制する。さらに抑制型 Smad は特異型 Smad と結合し、特異型 Smad と共有型 Smad の複合体形成も阻害する。このように抑制型 Smad は TGF- β や BMP の標的遺伝子として誘導され、負のフィードバックによってシグナル調整を行う¹¹⁾。

顎骨において、Smad6, 7 は骨折の初期は発現が低く、仮骨形成期に上昇するとされている²⁹⁾。本実験では、延長中には Smad6, 7 の発現は低く、延長終了後の骨が成熟する時期に高い発現が認められた。これらのことから延長終了後には抑制型 Smad が優位に機能し、骨の成熟に関与していると考えられた。

骨延長法では骨移植術と比較して、より大きい骨形成が得られる。また、軟組織も延長されるなどの利点があるが、治療期間が長いという欠点が見られる。このため骨延長法において recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) の局所投与により骨形成の促進を図る研究が散見される。しかし、rhBMP の投与時期についての統一的理解はなく、Li ら³⁰⁾ はウサギの四肢の骨延長モデルで固定期間に rhBMP-2/ACS (absorbable collagen sponge) を持続的に投与している。一方、Mizumoto ら³¹⁾ は rhBMP-7 の投与時期を骨切り時として実験的研究を行っており、両者とも骨延長法に rhBMP を投与することの有効性を報告している。今回の結果からは Smad1, 5, 8、BMP-2, 4 の発現が

延長を行っている時期に高いレベルで認めており、延長中に rhBMP を投与することが効率的であると考えられた。

結 論

ラット下顎骨延長モデルにおける Smad1~8, BMP-2, 4, TGF- β の局在とその動態を免疫組織化学的染色で観察し、延長部の新生骨梁において以下の結果を得た。

1. Smad1, 5, 8 と BMP-2, 4 は延長開始 4 日後から延長終了直後まで高い発現を認め、その後は発現が減少していた。
2. Smad2, 3 と TGF- β は延長開始 4 日後に高い発現を認め、その後は経日的に発現が減少していた。
3. Smad4 は延長開始 4 日後に高い発現を認め、延長終了直後には発現が減少し、延長終了 7 日後には発現が認められなくなっていた。
4. Smad6, 7 は延長中にわずかに発現を認め、その後発現が増加し、延長終了 14 日目まで強い発現が続いていた。

今後は、このような骨延長時に生じる各種因子の発現経過を把握した上で、骨延長時の骨形成を促進するための効率的なサイトカイン補充療法の検討を行っていく予定である。

引用文献

- 1) 斎藤 朗, 宮園浩平: TGF- β スーパーファミリーと Smad による細胞増殖分化の制御, シグナル伝達 集中マスター (山本雅, 仙波憲太郎編). 羊土社, 東京, 2008, 96-105.
- 2) 山口 朗: 骨芽細胞の分化・機能の制御と骨の再生, 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患 (松本俊夫編). 羊土社, 東京, 2002, 38-49.
- 3) 今村健志, 村上 暁: 骨・軟骨細胞の分化制御シグナルと転写因子, 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患 (松本俊夫編). 羊土社, 東京, 2002, 50-59.
- 4) Kloen, P., Doty, S. B., Gordon, E., Rubel, I. F., Goumans, M. J. and Helfet, D. L.: Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. J Bone Joint Surg Am. 84: 1909-1918, 2002.
- 5) 加藤光保: トランスフォーミング増殖因子 β による転写制御, 蛋白質 核酸 酵素 48, 16, 共立出版株式会社, 東京, 2003, 2248.
- 6) Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A. Jr., Wrana, J. L. and Falb, D.: The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of

- TGF- β signaling. Cell. 89: 1165-1173, 1997.
- 7) Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K.: Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. Nature. 389: 622-626, 1997.
- 8) Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H. and ten, Dijke, P.: Identification of Smad7, a TGF- β -inducible antagonist of TGF- α signalling. Nature. 389: 631-635, 1997.
- 9) Souchelnytskyi, S., Nakayama, T., Nakao, A., Moren, A., Heldin, C. H., Christian, J. L. and ten, Dijke, P.: Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor- β receptors. J Biol Chem. 273: 25364-25370, 1998.
- 10) Lebrun, J. J., Takabe, K., Chen, Y. and Vale, W.: Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling. Mol Endocrinol. 13: 15-23, 1999.
- 11) 斎藤 朗, 宮園浩平: TGF- β スーパーファミリーと Smad による細胞増殖分化の制御, シグナル伝達 集中マスター (山本雅, 仙波憲太郎編). 羊土社, 東京, 2008, 96-105.
- 12) Muraki, Y., Tominaga, K., Yosioka, I., Fuzita, M., Khanal, A., Matsushita, S. and Fukuda, J.: Mandibular reconstruction with bone transport in a patient with osteogenesis imperfecta. Int J Oral Maxillofac Surg. 37: 870-873, 2008.
- 13) 柳田泰志, 土生 学, 吉岡 泉, 富永和宏: 再発エナメル上皮腫に対して Segmental Bone Transport 法を用いて下顎骨再建を行った 1 例. 九州歯会誌 62: 238-243, 2008.
- 14) Block, M. S., Chang, A. and Crawford, C.: Mandibular alveolar ridge augmentation in the dog using distraction osteogenesis. J Oral Maxillofac Surg. 54: 309-314, 1996.
- 15) Khanal, A., Yosioka, I., Tominaga, K., Furuta, N., Habu, M., and Fukuda, J.: The BMP signaling and its Smads in mandibular distraction osteogenesis. Oral Dis. 14: 347-355, 2008.
- 16) 佐藤靖史: TGF- β と血管病変, TGF- β スーパーファミリー TGF- β ・アクチビン・骨形成因子 (宮園浩平, 上野直人, 野田政樹). 羊土社, 東京, 1992, 94-98.
- 17) Yamaguchi, A., Komori, T. and Suda, T.: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and Cbfa. Endocr. 21: 393-411, 2000.
- 18) Urist, M. R.: Bone formation by autoinduction. Science. 150: 893-899, 1965.
- 19) Wozney, J. M. and Rosen, V.: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orthop. 346:

- 26-37, 1998.
- 20) Schmitt, J. M., Hwang, K., Winn, S. R. and Hollinger, J. O.: Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res.* 17: 269-278, 1999.
 - 21) Groeneveld, E. H. J. and Burger, E. H.: Bone morphogenetic protein in human bone regeneration. *Europ J Endocri.* 14: 9-21, 2000.
 - 22) Sakou, T.: Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone.* 22: 591-603, 1998.
 - 23) Bostrom, M. P., Lane, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S. B., Glaser, D. and Rosen, V. M.: Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res.* 13: 357-367, 1995.
 - 24) Nakase, T., Nomura, S., Yosikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K. and Takaoka, K.: Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 9: 651-659, 1994.
 - 25) Einhorn, T. A.: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 355S: S7-S21, 1998.
 - 26) Izzi, L. and Attisano, L.: Regulation of the TGF β signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene.* 23: 2071-2078, 2004.
 - 27) Haque, T., Mandu-Hrit, M., Rauch, F., Lauzier, D., Tabrizian, M. and Hamdy, R. C.: Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein-signaling Smads during long-bone distraction osteogenesis. *J Histochem Cytochem.* 54: 407-415, 2006.
 - 28) Farhadieh, R. D., Gianoutsos, M. P., Yu, Y. and Walsh W. R.: The role of bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-4 and their related postreceptor signaling system (Smads) in distraction osteogenesis of the mandible. *J Craniofac Surg.* 15: 714-718, 2004.
 - 29) Yu, Y., Yang, J. L., Chapman-Sheath, P. J. and Walsh, W. R.: TGF- β , BMPs, and their signal transducing mediators, Smad, in rat fracture healing. *J Biomed Mater Res.* 60: 392-397, 2002.
 - 30) Li, G., Bouxsein, M. L., Luppen, C., Li, X. J., Wood, M., Seeherman, H. J., Wozney, J. M. and Simpson, H.: Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 20: 779-788, 2002.
 - 31) Mizumoto, Y., Moseley, T., Drews, M., Cooper, V. N. and Reddi, A. H.: Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A Suppl 3: 124-130, 2003.