

氏名	此内浩信
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 1587号
学位授与の日付	平成9年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	骨形成タンパク質による異所性硬組織誘導とI型、II型、X型コラーゲン遺伝子の発現—In situ ハイブリダイゼーション法による検討—
論文審査委員	教授 杉本朋貞 教授 滝川正春 教授 永井教之

学位論文内容の要旨

【緒言】骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein : BMP)は筋肉内や皮下に埋植すると、異所性に骨組織を誘導する成長因子として注目されている。BMPによる異所性硬組織誘導過程は形態学的観察や生化学的解析から内軟骨性骨化に類似するとされてきたが、最近では直接性の骨化の存在が示唆され、またその軟骨様基質にI型コラーゲン蛋白が存在するなど、内軟骨性骨化過程とする報告に疑問が持たれる。また、BMPにより誘導された硬組織形成細胞の細胞動態を遺伝子レベルで解析した報告は少なく、骨基質の主要構成タンパク質であるI型コラーゲン、軟骨基質の主要構成タンパク質であるII型コラーゲン、さらに肥大化軟骨細胞で特異的に産生されるX型コラーゲンの遺伝子レベルでの解析はなされていない。そこで本研究では、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いてBMPによる異所性硬組織誘導において細胞形態変化とI型、II型、X型コラーゲン遺伝子の発現との相関について検討した。また、誘導された硬組織においてI型、II型コラーゲンの局在を検討した。

【材料と方法】本研究に用いたBMPはウシ骨より4Mグアニジン塩酸にて抽出、限外濾過器にて分子量1-10万に限定、ヘパリン(HEP)カラムクロマトグラフィーにて得た部分精製画分(HEP-BMP)である。担体は牛真皮由来ペプシン可溶性I型コラーゲン(高研)を用い、HEP-BMP 5mgと担体5mgとの複合体を作製した。実験動物として3週齢ICR系雄性マウス(体重:約10g)30匹を用い、背部皮下に複合体を埋植し、埋植後3日、1週、2週に組織を摘出した。摘出材料は4%パラホルムアルデヒドで固定後、2週の組織は15%EDTAで脱灰を行い、常法に従いパラフィン包埋し、厚さ4mmの薄切切片を作製した。本研究で用いたprobesはI、II、X型コラーゲンの各cDNAよりDIG RNA Labeling Kit(Boehringer-Mannheim)を用いて、Digoxigenin標識したRNA probesである。切片は脱パラ後、前処理を行い、50℃、16時間の条件下で各probesとハイブリダイズを行い、DIG Nucleic Acid Detection Kit(Boehringer-Mannheim)を用いシグナルを検出し、光顕的に観察を行った。I型コラーゲンの局在とX型コラーゲン遺伝子の発現およびII型コラーゲンの局在とX型コラーゲン遺伝子の発現を観察するため、埋植後1週の方法に2重染色を行った。2重染色法はPAP法と*in situ* ハイブリダイゼーション法を組み合わせで行った。

【結果】 1. BMP・コラーゲン複合体マウス皮下埋植後3日

組織学的所見埋植：複合体周囲に紡錘形細胞の密な増殖が観察され、一部に好塩基性の基質を有する軟骨様組織が認められた。同軟骨様組織を構成する細胞は、円形から橢円形の軟骨細胞様細胞、中央部では既に小腔を有する肥大化した軟骨細胞様細胞が認められた。

I型、II型、X型コラーゲン mRNA の発現様式：軟骨様組織周囲の紡錘形細胞、軟骨細胞様細胞、肥大化軟骨細胞様細胞の全ての細胞にI型、II型、X型コラーゲン mRNA のシグナルが認められた。

2. BMP・コラーゲン複合体マウス皮下埋植後1週

組織学的所見：埋植複合体を取り囲むように一部石灰化を示す軟骨様組織の形成が認められた。軟骨様組織中央部では肥大化軟骨細胞様細胞が主体として認められ、辺縁部では軟骨細胞様細胞と肥大化軟骨細胞様細胞が混在して観察された。

I型、II型、X型コラーゲン mRNA の発現様式：I型コラーゲン mRNA は軟骨細胞様細胞に強く認められ、肥大化軟骨細胞様細胞で減弱を認めた。II型コラーゲン mRNA は軟骨細胞様細胞を、X型コラーゲン mRNA は肥大化軟骨細胞様細胞を主体に認める傾向を示した。

I型、II型コラーゲンの局在：I型、II型コラーゲン共に軟骨様基質全域で陽性所見が認められた。

3. BMP・コラーゲン複合体マウス皮下埋植後1週

組織学的所見：軟骨様基質を核にした梁状の線維性骨様組織形成が観察された。軟骨様・骨様組織移行部では、基質内に封入された肥大化軟骨細胞様細胞が観察されると共に、骨髄様組織に向かって小腔を開放した肥大化軟骨細胞様細胞が認められた。骨様組織辺縁では骨芽細胞様細胞の配列が認められ、基質内には骨細胞様細胞が認められた。

I型、II型、X型コラーゲン mRNA の発現様式：I型コラーゲン mRNA のシグナルは、肥大化軟骨細胞様細胞、骨芽細胞様細胞、骨細胞様細胞に観察された。X型コラーゲン mRNA のシグナルは軟骨様・骨様組織の肥大化軟骨細胞様細胞に認められると共に小腔を開放した肥大化軟骨細胞様細胞においても観察された。さらに、一部の骨芽細胞様細胞にシグナルが観察された。しかし、線維性の骨様組織形成が進んだ部位の骨芽細胞様細胞ではシグナルを認めなかった。尚、II型コラーゲン mRNA のシグナルは観察されなかった。

【考察と結論】 1) 組織学的に異所性硬組織誘導は、急速に形成された軟骨様組織を介した骨様組織誘導過程であり、いわゆる内軟骨性骨化に類似する過程であった。

2) 各コラーゲン遺伝子の発現から観ると、初期に誘導された異所性硬組織形成細胞は、未分化な紡錘形細胞の段階から既に骨芽細胞、軟骨細胞、肥大化軟骨細胞の形質を同時に獲得していることが示唆された。BMP・コラーゲン複合体による異所性硬組織誘導は内軟骨性骨化の各コラーゲン遺伝子の発現様式とは異なる過程であった。

論文審査結果の要旨

骨形成タンパク質（以下 BMP）は異所性に骨を誘導するタンパク質として注目されている。その誘導過程は組織学的に内軟骨性骨化と考えられているが、その詳細は明らかでない。本研究は BMP により誘導された硬組織形成細胞の細胞動態に注目して BMP 誘導異所性骨形成の特徴を明らかにすることを目的としている。I 型アテロコラーゲンを担体としてウシ骨抽出部分精製画分 BMP によるマウス背部皮下埋植、異所性骨誘導実験を行ない、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて骨・軟骨基質蛋白質である I 型、II 型、X 型コラーゲンの経時的な遺伝子発現について検索を行うと共に軟骨様基質の I 型、II 型コラーゲンの局在を検索している。

異所性硬組織の形成過程は組織学的に紡錘形細胞の増殖に始まり、軟骨様組織の形成、その基質を核にした骨様組織形成が観察され、組織学的に内軟骨性骨化に類似する過程であることが示された。しかし、紡錘形細胞、軟骨細胞様細胞、肥大化軟骨細胞様細胞は I 型、II 型、X 型コラーゲン遺伝子を全て発現していることが示され、I 型、II 型コラーゲンについては軟骨様基質にタンパク質の局在も示された。以上の各コラーゲン遺伝子の発現様式およびタンパク質の局在から、ウシ骨抽出部分精製画分 BMP によるマウス背部皮下異所性骨形成過程は内軟骨性骨化とは異なった過程であることが示唆された。

これらの知見は BMP による異所性骨形成機構の基礎的研究として価値ある研究業績であり、よって申請者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。