

氏名	今 村 高 行
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 1327 号
学位授与の日付	平成7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	骨誘導蛋白(rhBMP-2)による異所性骨形成と骨基質蛋白 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 永井教之 教授 中井宏之 教授 滝川正春

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【緒言】

Bone Morphogenetic Protein (BMP) はTGF- $\beta$  superfamily に属する蛋白であり、未分化間葉系細胞を軟骨芽細胞、骨芽細胞へ分化させることが知られている。従来BMPを皮下に埋植した際に形成される骨組織は主に軟骨性の骨化によって誘導され、骨組織の発生過程における軟骨内骨化と類似していると考えられてきた。しかし、軟骨細胞や骨芽細胞が経時的に発現する表現形質に注目して、異所性骨形成過程における遺伝子レベルでの細胞動態の追跡はなされていない。本研究では、骨芽細胞の分化と細胞の接着などに関与していると考えられているosteopontin (OSP)、骨芽細胞のマーカーと考えられているosteocalcin (OSC) について、recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) による異所性骨形成過程と、発生期の骨形成過程におけるの経時的な遺伝子発現様式を比較検討した。

#### 【材料と方法】

rhBMP-2 複合体の調整：recombinant human BMP-2 (山之内製薬より供与) 1 $\mu$ gを用い骨不溶性基質(IBM: 粒径約0.4mm) 20mgに含浸させ複合体として使用した。

実験方法：実験動物として、4週齢Wistar系雄性ラット44匹(体重：約100g)を使用した。背部皮下4ヶ所に皮下切開を加え、rhBMP-2-IBM複合体3点と対照としてrhBMP-2を含まないIBMペレット1点を埋植した。埋植後、3日、5日および1, 2, 3週で埋植物を一塊として摘出した。対照組織として胎生16日より生後5日までのラット矢状断頭部を使用した。4%パラホルムアルデヒド溶液にてマイクロウェーブ固定後、4℃で16時間浸漬固定を行った。摘出材料及び生後2日以降のラット頭部は20%EDTA溶液にて4℃で約1週間脱灰した後、常法に従いパラフィン包埋、4 $\mu$ mの連続切片を作製した。

In situ ハイブリダイゼーション法：Probeとして約1.2kbのOSP cDNA断片、約0.47kbのOSC cDNA断片(阪大・医・野村助教授から供与)より、DIG RNA Labeling Kit (Boeringer Mannheim)を用いてDigoxigenin-11-labeled single-strand cRNA probeを各々作製した。切片を前処理後、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行い、抗原抗体反応、発色を行い光学顕微鏡下で観察した。

## 【結果】

発生期の軟骨内骨化部では、軟骨各層にはOSP mRNA, OSC mRNAはともにシグナルは認めなかったが肥大下部の軟骨細胞にOSP mRNA のシグナルが認められた。膜内骨化過程では、OSP mRNA は胎生16日目で既に線維骨梁に沿った骨芽細胞にシグナルを認め、出生後も骨梁に接したほとんどの骨芽細胞に認められた。しかし、加齢と共にシグナル数は減少していった。OSC mRNA はOSP mRNA より遅れて胎生20日目に内骨膜部に接してみられる立方形の骨芽細胞にシグナルが認められ始めた。

rhBMP-2-IBM複合体埋植後3日では、複合体周囲に線維組織の被包がみられ、IBM顆粒間に間葉系細胞の侵入はなく、線維性被包組織中の間葉系細胞にOSP mRNA, OSC mRNA のシグナルは認められなかった。埋植後5日では、IBM顆粒に接して塩基好染性の軟骨基質に埋入した軟骨細胞と軟骨基質外周部にみられる類骨様基質に接した骨芽細胞様細胞が認められた。これらの細胞にOSP mRNA, OSC mRNA のシグナルが認められた。さらに、骨組織形成がない部位のIBM顆粒間にみられる紡錘形の線維芽細胞様細胞にOSP mRNAのシグナルが認められた。埋植後1週では、複合体辺縁部に梁状の未熟な骨梁が形成され、長楕円形の骨芽細胞が骨梁に接して、あるいは埋入して認められ、軟骨細胞は減少していた。また、IBM顆粒に直接骨組織が形成されている像も認められた。骨芽細胞、軟骨細胞ともにOSP mRNA, OSC mRNA のシグナルを認めた。しかしIBM顆粒間にみられる線維芽細胞様細胞にはOSP mRNA, OSC mRNA 共にシグナルは認められなかった。埋植後2週になると、軟骨基質、軟骨細胞は消失し、複合体辺縁部で骨基質に埋入した小型類円形の骨細胞が出現し、骨梁の石灰化が顕著に認められた。さらに埋植後3週では骨梁は複合体中央部にまで形成され、骨髄組織も認められた。埋植後2週、3週のいずれの骨芽細胞、骨細胞においてもOSP mRNA, OSC mRNA のシグナルが認められたが、骨細胞を主体としてOSP mRNA シグナルは減少していく傾向がみられた。対照として、IBM単独のペレットを埋植した場合では骨形成はみられず、IBM顆粒間の線維芽細胞様細胞にもOSP mRNA, OSC mRNA のシグナルは認めなかった。

## 【考察】

rhBMP-2- IBM複合体による異所性骨誘導過程では、軟骨性骨化と添加性の骨化が同時に生じていることが示された。異所性軟骨性骨化では、軟骨細胞にOSC mRNA の発現が認められ、発生期の軟骨内骨化にみられる軟骨細胞とは異なった性状を有することが示唆された。また異所性骨形成過程では骨芽細胞におけるOSP mRNA, OSC mRNA の発現に時間的な差のないことから、発生期の膜内骨化過程に比べ骨芽細胞の分化、成熟が比較的速いことが考えられた。またrhBMP-2埋植早期において、OSP mRNA が骨組織非形成域にみられた紡錘形の線維芽細胞様細胞に発現したが、時間と共に骨組織形成域の骨芽細胞、骨細胞に限局して認められた。このことから、rhBMP-2による間葉系細胞への作用は早期に終了している可能性が示唆された。以上より、rhBMP-2-IBM複合体により誘導される異所性骨形成は、発生期の軟骨内骨化とは異なった骨化様式である可能性が考えられた。

## 論文審査結果の要旨

本研究は新しい生体材料として期待されているrhBMP-2 (recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2)により誘導された軟骨細胞，骨芽細胞の細胞動態に注目してrhBMP-2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。骨不溶性基質 (IBM)を支持体として用いrhBMP-2による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基質蛋白質であるオステオポンチン(OSP)，オステオカルシン(OSC)の経時的な遺伝子発現について検索し，発生期の骨形成過程と比較検討した。

異所性軟骨性骨化にみられる軟骨細胞は，OSCMRNAを発現することから発生期の軟骨内骨化にみられる軟骨細胞とは異なった性状を有することが示唆された。また異所性骨形成過程では骨芽細胞におけるOSP mRNA, OSC mRNA の発現に時間的な差のないことから，実験系の初期において骨芽細胞の分化，成熟が比較的速いことが考えられた。以上よりrhBMP-2-IBM複合体により誘導される異所性骨形成は，発生期の軟骨内骨化とは異なった骨化様式である可能性が考えられた。

これらの知見はrhBMP-2による異所性骨形成機構の研究に価値ある研究業績である。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。