

学 位 論 文 題 名

ヒト骨基質からの成長因子の精製と  
その局所性因子としての検討

学位論文内容の要旨

研究目的

骨量の調節には全身性のホルモンのみならず、骨基質に存在する局所の成長因子が重要な役割を担っていると考えられる。これまで骨基質から精製された成長因子として、Skeletal Growth Factor, Transforming Growth Factor- $\beta$ ,  $\beta_2$ -Microglobulin, Fibroblast Growth Factor, Insulin-like Growth Fractor-I が知られている。本研究では、ヒト骨基質より骨芽細胞の増殖を促進する成長因子を精製した。この成長因子は、アミノ酸配列から insulin-like growth factor-II (IGF-II) と考えられ、IGF-II が骨基質に貯留していることが示された。次に、IGF-II が骨芽細胞によって産生され、かつ分泌されるか否かについて、石灰化能を有する骨芽細胞株、MC3T3-E1細胞（E1細胞）、を用いて検討した。

実験方法

成長因子の精製

ヒト海綿骨をEDTAによって脱灰し、その可溶性画分を50-75%のアセトンで処理した。生じた沈澱を熱処理し、その可溶性画分を4Mグアニジンを含む20mM トリス-塩酸緩衝液に溶解し、HW-50Fカラムを用いてゲル濾過した。増殖活性のある画分をSephadex G-75superfineカラムを用いてゲル濾過した。

増殖活性のある二つの画分のうち、低分子の画分を5mM 重炭酸アンモニウム溶液に溶解し、MONO-Q陽イオン交換カラムに添加した。カラムに結合した蛋白質を、5mM から500mM に至る重炭酸アンモニウム塩の濃度勾配によって溶出した。

増殖活性のある画分を0.1%トリフルオロ酢酸を含む6%アセトニトリルに溶解し、C18逆相HPLCカラム(Nucleosil)に添加した。カラムに結合した蛋白質を、6%から60%に至るアセトニトリルの濃度勾配によって溶出し、増殖活性のある画分をC18逆相HPLCカラム(Vydac)

に添加した。カラムに結合した蛋白質を6%から60%に至るアセトニトリルの濃度勾配によって溶出し、最終精製標品を得た。

精製した成長因子について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行ない、銀染色により蛋白質を染色した。さらに、アミノ酸の配列はガス相シーケンサー (Applied Biosystem, 470A) を用いて分析した。尚, Phenyl Thio Hydantoin アミノ酸は、逆相 HPLC によって同定した。

### 細胞増殖活性の測定

鶏胚頭蓋冠より骨芽細胞を分離し、DMEM 中で培養後、各精製段階の試料を添加した。 $[^3\text{H}]$ -チミジンを加えて培養後、トリクロール酢酸を加え、沈澱した DNA に取り込まれた  $[^3\text{H}]$ -チミジン量を測定した。

### E 1 細胞の免疫染色

E 1 細胞を培養し、Periodate-Lysine-Paraformaldehyde 溶液中で固定後、1% Triton X-100 溶液で処理した。一次抗体としてマウス抗 IGF-II モノクローナル抗体を加えて反応させ、次いで、二次抗体と反応させたのち、ジアミノベンチジンによって発色させた。対照としては一次抗体として非免疫マウス IgG を用いた。

### E 1 細胞の培養液中の IGF-II の定量

E 1 細胞を一定期間培養後、FCS を含まない培養後で2日間培養して得た培養液を、C18Sep Pack カラムで分離した。6%から60%のアセトニトリルで溶出される画分を、IGF-II に対するモノクローナル抗体を含む緩衝液に溶解した。次いで、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを架橋した IGF-II を加え、ヤギ抗マウス IgG 抗体を結合した CNBr Sepharos カラムに添加した。o-ニトロフェニール- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドをカラムに加えた後、0.05M 炭酸ナリウム溶液を加えて、反応後の吸光度 (A420nm) を測定した。

## 結 果

### 骨基質からの成長因子の精製

HW-50 F 画分の Sephadex G-75superfine カラムによるゲル濾過で、増殖活性は低分子側 (分子量約 6 kd に相当) と高分子側 (分子量約 20kd に相当) の2つのピークとして認められた。低分子側の画分は、MONO-Q イオン交換カラムに結合し、170mM から280mM の範囲の重炭酸アンモニウム塩で溶出された。MONO-Q 画分の C18 逆相 HPLC カラム (Nucleosil) による分離では、約35%のアセトニトリルで溶出された画分に高い増殖活性が認められた。この画分

のC18逆相 HPLC カラム (Vydac) による分離では、36.8%のアセトニトリルに相当する部分に蛋白質の鋭いピークが認められ、増殖活性もこのピークに一致していた。この最終精製蛋白質は3.6  $\mu$ g回収され、精製倍率は4830倍であった。

最終精製蛋白質は、SDS-PAGE (20%) において分子量約6 kdに相当する部分に単一のバンドとして泳動された。又、N末端から30番目までのアミノ酸配列はヒト血清由来のIGF-IIと一致していた。

#### 骨芽細胞によるIGF-IIの産出

IGF-IIの抗体を用いた免疫染色において、光学顕微鏡による観察ではE1細胞の胞態が瀰漫性に染色されていたが、非特異的抗体ではほとんど染色されなかった。さらに、電子顕微鏡による観察では、E1細胞の小胞体膜の細胞質側に沿ってIGF-IIの抗体に対する反応が認められた。

#### 骨芽細胞によるIGF-IIの分泌

IGF-II定量の標準曲線から、本測定法では1 ngから50 ngの範囲で定量可能であると考えられた。E1細胞がconfluentの状態になった後、さらに1日、3日、6日間培養した後のそれぞれ2日間におけるIGF-IIの分泌量は、1ウェル当たり $23 \pm 0.7$  ng,  $95 \pm 8.6$  ng,  $215 \pm 21.7$  ngであった。

### 考 察

ヒト骨基質から骨芽細胞の増殖活性を指標に精製した成長因子は、そのアミノ酸配列からIGF-IIと考えられた。精製した成長因子の骨芽細胞に対する作用については、細胞がsparseな状態で、その増殖を濃度依存性に促進することを示された。今回の精製結果より、骨組織に存在する本成長因子の濃度は少なくとも $480 \text{ ng/ml}$ と予想されるのでIGF-IIは、骨局所において生理的に作用することが予想される。

IGF-IIに対する抗体を用いた免疫染色において、光学顕微鏡による観察でE1細胞の胞体が染色されたこと、さらに電子顕微鏡による観察で小胞体の膜に反応したことは、E1細胞がIGF-IIを産出していることを示している。

E1細胞において産出されたIGF-IIが細胞外に分泌されていることは、E1細胞の培養液中にIGF-IIが定量されことから示された。又、培養期間とともにその後の一定期間に分泌されるIGF-IIが増加したことは、E1細胞の成熟にともなって、細胞のIGF-IIの分泌能力が増大することを示唆している。

以上のことから IGF-Ⅱ は、骨組織における局所性の成長因子と考えられ、生体における骨量の調節機構は IGF-Ⅱ を含めたいくつかの局所性因子と PTH、ビンミン D<sub>3</sub> などの全身性因子との複雑な作用の上に成り立っていると考えられる。

## 結 語

ヒト骨基質から EDTA 抽出, アセトン処理, ゲル濾過, イオン交換カラムクロマトグラフィー, および, 逆相 HPLC によって骨芽細胞の増殖を促進する成長因子を精製した。この成長因子は SDS-PAGE で, 分子量約 6000 に相当する部分に単一のバンドとして泳動され, その N 末端から 30 番目までのアミノ酸配列はヒト血清由来は IGF-Ⅱ として一致していた。IGF-Ⅱ に対する抗体を用いた免疫染色において骨芽細胞の胞体が瀰漫性に染色され, 電子顕微鏡による観察では小胞体の膜に沿って反応が認められた。また, 酵素免疫測定法による検討では, 骨芽細胞の培養液中には IGF-Ⅱ が分泌されていた。

以上, IGF-Ⅱ が骨芽細胞によって産出され, 細胞外に分泌され, 骨基質中に貯留し, 骨芽細胞に作用することを明らかにした。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 田 清 志  
副 査 教 授 阿 部 和 厚  
副 査 教 授 大 浦 武 彦

骨量の調節には全身性のホルモンのみならず, 骨基質に存在する局所の成長因子が重要な役割を担っていると考えられる。これまで骨基質から精製された成長因子として, Skeletal Growth Factor, Transforming Growth Factor- $\beta$ ,  $\beta_2$ -Microglobulin, Fibroblast Growth Factor, Insulin-like Growth Factor-I が知られている。本研究では, ヒト骨基質より骨芽細胞の増殖を促進する成長因子を精製した。この成長因子は, アミノ酸配列から insulin-like growth factor-Ⅱ (IGF-Ⅱ) と考えられ, IGF-Ⅱ が骨芽細胞に貯留していることが示された。次に, IGF-Ⅱ が骨芽細胞によって産出され, かつ分泌されるか否かについて, 石灰化能を有する骨芽細胞株, MC 3 T 3 - E 1 細胞 (E 1 細胞), を用いて検討した。

実験方法： ヒト海綿骨を EDTA によって脱灰し、50-75%のアセトンで処理した。その可溶性画分より HW-50 F カラム及び sephadex G-75 superfine カラム, MONO-Q 陽イオン交換カラム, C18逆相 HPLC カラム(Nucleosil) 及び, C18逆相 HPLC カラム (Vydac) によって成長因子の精製を試みた。精製過程における増殖活性は鶏胚頭蓋冠由来の骨芽細胞を用いて DNA 合成促進活性を指標とした。成長因子について SDS-PAGE を行ない、銀染色により蛋白質を染色した。アミノ酸の配列はガス相シーケンサー (Applied Biosystem, 470A) を用いて分析した。E 1 細胞の免疫染色は、E 1 細胞を培養し、一次抗体としてマウス抗 IGF-II モノクローナル抗体を加えて反応させ、次いで、二次抗体と反応させたのち、ジアミノベンチジンによって発色させた。E 1 細胞の培養液中の IGF-II の定量は、E 1 細胞を一定期間培養後、FCS を含まない培養液で 2 日間培養して得た培養液を、IGF-II のモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法によって定量した。

結果および考察： HW-50 F 画分の Sephadex G-75superfine カラムによるゲル濾過で、増殖活性は低分子側（分子量約 6 kd に相当）と高分子側（分子量約 20kd に相当）の 2 つのピークとして認められた。低分子側の画分は、MONO-Q イオン交換カラムに結合し、170mM から 280 mM の範囲の重炭酸アンモニウム塩で溶出された。C18逆相 HPLC カラム (Nucleosil) による分離では、約 35%のアセトニトリルで溶出された画分に増殖活性が認められた。C18逆相 HPLC カラム (Vydac) による分離では、36.8%のアセトニトリルに相当する部分に蛋白質の鋭いピークが認められ、増殖活性もこのピークに一致していた。この最終精製蛋白質は 3.6 $\mu$ g 回収され、精製倍率は 4830 倍で SDS-PAGE (20%) において分子量約 6 kd に相当する部分に単一のバンドとして泳動され、N 末端から 30 番目までのアミノ酸配列はヒト血清由来の IGF-II と一致していた。

このことから、IGF-II ヒト骨基質中に存在し、骨芽細胞に対して、細胞が sparse な状態で、その増殖を濃度依存性に促進することが示された。今回の精製結果より、骨組織に存在する IGF-II の濃度は少なくとも 480 ng/ml 以上であるので IGF-II は、骨局所において生理的に作用することが予想される。IGF の抗体を用いた免疫染色において、E 1 細胞の胞体が瀰漫性に染色され、電子顕微鏡による観察では、E 1 細胞が小胞体膜に沿って IGF-II の抗体に対する反応が認められた。E 1 細胞が confluent の状態になった後、さらに 1 日、3 日、6 日間培養した後のそれぞれ 2 日間における IGF-II の分泌量は、1 ウェル当たり  $23 \pm 0.7$  ng,  $95 \pm 8.6$  ng,  $215 \pm 21.7$  ng であった。これらのことより、IGF-II が骨芽細胞によって産出され、細胞外に分泌されていることが明らかとなった。

以上のことから IGF-Ⅱ は、骨組織における局所性の成長因子と考えられ、生体における骨量の調節機能は IGF-Ⅱ を含めたいくつかの局所性因子と全身性因子との複雑な作用の上に成り立っていると考えられる。

これらの発表に対し、大浦武彦教授から IGF-Ⅱ の生理的効果の可能性と他の成長因子の作用との差異について、阿部和厚教授から免疫染色の染色部位について、宮崎保教授から osteopetrosis のモデルである op/op マウスの治療に有効な M-CSF と IGF-Ⅱ の効果の検討に関する質問があり申請者は大旨妥当な解答をした。その後申請者は阿部和厚教授、大浦武彦教授から個別に審査を受け合格と判定された。

本研究は骨基質中の成長因子を精製し、IGF-Ⅱであることを決定し、IGF-Ⅱが骨芽細胞の増殖を促進し、骨芽細胞によって産出され、分泌されることを示した。IGF-Ⅱが骨における局所性因子であることを示したものであり、骨の代謝に寄与するものであり、博士（医学）の学位に値するものと認定された。