

学 位 論 文 題 名

骨形成タンパク質（BMP）による

細胞分化のマトリックス依存性

－多孔質ヒドロキシアパタイトにおける直接骨形成の確認－

学位論文内容の要旨

緒 言

骨不溶性基質（Insoluble Bone Matrix : IBM）を担体に用いた骨形成タンパク質（Bone Morphogenetic Protein : BMP）による異所性骨誘導実験において、その骨形成過程は軟骨性骨化をたどるものとされている。しかし、IBM は、未同定成分が残留している可能性が否定できず、性質が一部不明である。また生体内吸収性であり、形と大きさが逐次変化し一定でないため、BMP による細胞分化機序を考察する上で問題になる。

本研究では、BMP の細胞分化誘導現象を明らかにする目的で、IBM ならびに新しい担体として化学的性質が明らかで、IBM とは性質が全く異なるが生体由来物質であるアパタイトをもとにした多孔質顆粒状アパタイト（Porous Particles of Hydroxyapatite : PPHAP）を用いて異所性骨誘導実験を行ない、両群における骨形成過程を比較検討した。

材料および方法

1. BMP の精製：BMP はウシ骨を洗浄・脱脂・脱灰後、4 M グアニジン塩酸にて抽出し、3段階のカラム（Hydroxyapatite, Heparin, Sephacryl S300）にて部分精製した。
2. 担体：IBM の調製は、脱灰抽出残渣骨基質を冷蒸留水で洗浄・脱塩後、軟X線撮影・Ca 定量を行ない、完全に脱灰されていることを確認した。PPHAP は粒径0.3～0.5mmで内部貫通性の気孔（気孔径100～200 μm, 気孔率70%）を有しているものを用いた。
3. BMP と担体の複合、埋植：担体あたり BMP を0.3mg含浸させ、4 週齢、雄 Wistar 系ラット背部皮下結合組織内に埋植した。3 日～4 週後に摘出し、Ⅱ型コラーゲン、オステオカルシンとアルカリリフォスファターゼの発現を分析するとともに形態学的に観察した。

結 果

1. 形態学的観察

(1)IBM 群：埋植後 1 週で IBM 間に軟骨組織の形成が認められ、中心部の軟骨細胞は成熟し、周辺部に行くに従い未熟な軟骨が存在し、その周辺には未分化間葉細胞がみられた。2 週の非脱灰標本では、軟骨基質に点状にミネラルの沈着がみられ、軟骨は石灰化し、石灰化軟骨の表面には骨が形成されていた。3 週では管状骨の様相を呈し、周辺部には皮質骨様の厚い層板状骨がみられ、その外側は数層の薄い線維性の被膜で覆われていた。内部には、骨梁や骨髓組織を認め、骨髓は造血能を示し、赤血球や骨髓球が存在した。IBM は 3 週ではほとんど吸収されていた。

(2)PPHAP 群：埋植後 3 ～ 5 日は未分化間葉細胞が徐々に中心部に進入し、1 週で一部に骨形成を認める場合もあったが、軟骨細胞は初期より認められなかった。2 週ではアパタイト表面に接して線維性の骨が形成され、3 週になると気孔内・顆粒間に比較的大きな血管と骨髓を伴う連続した骨形成がみられ、新生骨には改造線が認められた。

2. 生化学的分析

(1)オステオカルシン量：IBM 群では、1 ～ 2 週の間はほとんど検出されなかつたが 3 週より著しく上昇 ($12.8 \mu\text{g}/\text{pellet}$) した。PPHAP 群では 1 週より増加 ($201\text{ng}/\text{pellet}$) したもの、3 ～ 4 週の値は IBM 群の約 25 分の 1 に過ぎなかつた。

(2)ALP の活性値：IBM 群では 1 週より増加し、2 週でピーク ($1.3\text{IU}/\text{pellet}$) となり以後急激に減少した。PPHAP 群では 1 週にてピーク ($0.38\text{IU}/\text{pellet}$) となり、漸次減少した。IBM 群における 1 ～ 2 週の ALP 活性値は、PPHAP 群に比べて 3 ～ 4 倍高かった。

(3)II 型コラーゲン量、全コラーゲン量：IBM 群の II 型コラーゲンは 1 週でピーク ($94.4 \mu\text{g}/\text{pellet}$) となり、以後漸次減少した。PPHAP 群の全コラーゲン量は経時に増加したもの、II 型コラーゲン量は初期より全く検出されなかつた。

考 察

IBM 群では、1 ～ 2 週の間に軟骨が多量に出現し、その後軟骨性骨化を経て骨に置換された。一方、PPHAP 群では軟骨の指標である II 型コラーゲンは検出されず、また形態学的にも明らかな軟骨細胞を認めずに、骨が形成された。以上のような両群の形質発現の相違については、PPHAP は直径 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ の連続した内部貫通性気孔を有しているため、細胞・血管の進入を妨げない血管確保多孔質構造であり、幼若間葉細胞が優先的に骨芽細胞に分化できる環境を与えたと考えられるのに対し、IBM は既存の骨構造であるハバース管・骨小腔等の微小スペース

と調製時に機械的に生じた微小亀裂のみを有する緻密質であり、また軟骨内には、血管進入阻止因子の存在が知られていることから両群の新生血管進入度に差が生じ、その結果、局所の酸素分圧に高低が生じて、骨芽細胞と軟骨芽細胞への分化に影響を与えたと考えられる。

結 論

1. 多孔質顆粒アパタイトを BMP の担体として用いた場合は、1～2週より骨形成が確認されたが、II型コラーゲンは検出されず、形態学的にも明らかな軟骨細胞を認めなかった。
2. 骨不溶性基質を BMP の担体として用いた場合には、II型コラーゲンが多量に検出され、その骨形成過程は軟骨性骨化の様相を呈していた。
3. II型コラーゲン形成量が多い程、アルカリフォスファターゼ活性値は高く、オステオカルシン量も高値を示した。

以上の結果は、多孔質顆粒状アパタイトを担体とした BMP 埋植体は、軟骨形成を経ずに直接骨を誘導することを示している。このことは、従来 BMP が軟骨誘導因子のようにいわれていたことに対して、今回の結果より BMP は、未分化間葉細胞に作用して骨・軟骨に共通の前駆細胞へ分化誘導する因子であり、その後の骨芽細胞・軟骨芽細胞への分化の振り分けは、マトリックスの作り出す局所細胞環境に依存しているものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 雨 宮 璇
副 査 教 授 久保木 芳 德

審査は雨宮、久保木、および戸塚審査員全員の出席のもとに、申請者に対し口頭試問により、提出論文の内容とそれに関連した学科目につき行われた。

骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein : BMP) による異所性骨誘導実験において、その骨形成過程は軟骨性骨化をたどるものと考えられているが、その所見はすべて骨不溶性基質 (Insoluble Bone Matrix : IBM) を担体に用いて得られたものである。IBM は、未同定成分が残留している可能性が否定できず、性質が一部不明であるため、BMP による細胞分化誘

導現象を考察する上で問題となる。本研究は、このような問題点を排除して、BMP の細胞分化誘導現象を検討する目的で、新しい担体として化学的性質が明らかな多孔質顆粒状アパタイト (Porous Particles of Hydroxyapatite : PPHAP) を用いて異所性骨誘導実験を行い、IBM を用いた場合の骨形成過程と比較検討したものである。

本実験では、BMP を精製するためにウシ骨を洗浄・脱脂・脱灰後、4 M グアニジン塩酸にて抽出し、3 段階のカラム (Hydroxyapatite, Heparin, Sephacryl S300) にて部分精製した。IBM の調製は、脱灰抽出残渣骨基質を冷蒸留水で洗浄・脱塩後、軟X線撮影・Ca 定量を行い、完全に脱灰されていることを確認した。PPHAP は粒径0.3～0.5mmで内部貫通性の気孔（気孔径100～200 μ m, 気孔率70%）を有しているものを用いた。担体あたり BMP を0.3mg含浸させ、4 週齢、雄 Wistar 系ラット背部皮下結合組織内に埋植し、経時に摘出した。摘出物について、軟骨に特異的なⅡ型コラーゲン、骨に特異的なオステオカルシンの発現を定量分析するとともに形態学的に観察した。

その結果、BMP/IBM 群では、1 週後に軟骨が多量に出現し、2 週後に軟骨は石灰化し、その後軟骨性骨化を経て骨に置換された。Ⅱ型コラーゲン量は、1, 2 週に多量に検出され、オステオカルシン量は3 週より著明に上昇し、形態学的所見と一致した。一方、BMP/PPHAP 群では、軟骨の指標であるⅡ型コラーゲンは検出されず、また形態学的にも明らかな軟骨細胞を認めずに、1 週から骨が形成された。オステオカルシン量は2 週でコントロールの約2 倍の増加がみられ、初期からの骨形成を示唆していた。

以上の結果は、多孔質顆粒アパタイトを担体とした BMP 埋植体は、軟骨形成を経ずに直接骨を誘導することを示している。従来、BMP は軟骨誘導因子のようにいわれていたが、本研究結果より、BMP は未分化間葉細胞に作用して骨・軟骨に共通の前駆細胞へ分化誘導する因子であり、その後の骨芽細胞・軟骨芽細胞への分化の振り分けは、担体の作り出す局所細胞環境に依存しているものと考えることができる。

以上のような両群の形質発現の相違については、PPHAP は直径100～200 μ m の連続した内部貫通性気孔を有しているため、細胞・血管の進入を妨げない血管確保多孔質構造であり、間葉細胞が優先的に骨芽細胞に分化できる環境を与えたと考えられるのに対し、IBM はハバース管等の微小スペースと調製時に生じた微小亀裂のみを有する緻密質であり、このような微小空間部は形態学的に軟骨細胞出現の場であることから、担体に由来する細胞環境の相違によって両群の新生血管進入度に差が生じ、その結果局所の酸素分圧に高低が生じて、骨芽細胞と軟骨芽細胞への分化に影響を与えたものと考察している。

論文の審査は、論文提出者による要旨の説明後、主査および副査より質問がなされたが、いずれの質問についても明快な回答が得られた。本研究は、BMPのみならず、担体の作り出す細胞環境にも注目し、新しい担体を用いることにより、初めて生化学的にも直接骨形成を示した点が高く評価された。以上のような本研究の業績は、骨形成機構の解明に重要な示唆を与え、口腔外科学の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に価するものと認められた。