

博士（歯学） 飯田俊二

学位論文題名

骨粗鬆症ラットにおける骨形成

—骨形成蛋白質（BMP）の作用低下の原因について—

学位論文内容の要旨

【目的】

高齢化に伴い骨粗鬆症をはじめとする骨疾患が社会問題になりつつある。骨粗鬆症は閉経後の女性に多く、これは女性ホルモンの分泌不全、ミネラル（特にカルシウム）の摂取不足等との関係が考えられている。骨粗鬆症の臨床的問題としては大腿骨頸部骨折や脊椎の圧迫骨折があり、“寝たきり”の原因として第二位に骨粗鬆症による上記の骨折が挙げられる。また歯科の分野では骨粗鬆症に伴う顎堤の吸収が義歯の不適合の原因となっている。補綴の分野において、このような患者に顎堤挙上などの骨再建が必要となる場合が増えており、その治療法として自家骨、あるいは人工材料を骨膜下に埋入する顎堤形成法が現在一般的に行なわれている。自家骨を埋入する場合、他部位からの移植によるため手術侵襲が大きく患者への負担が大きい。そのため、人工材料の中でも生体親和性が高く、骨と直接結合するハイドロキシアパタイトの応用が期待されている。この生体材料とTGF- $\beta$ のスーパーファミリーの一つである骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein:BMP)の複合体は骨形成を早期に誘導することが報告されている。ただ今までBMPはin vivoで骨形成を認めるのはホストの状態が正常な場合に限られており、骨粗鬆症でどのような反応が見られるかはほとんど知られていない。そこで今回卵巣を摘出(OVX)し、実験的に骨粗鬆症としたラットを用いBMPによる骨形成の変化をin vivo、in vitro両面から検討した。

【材料及び方法】

BMPの部分精製：成牛骨より骨端部を除去し、骨幹部のみとしたものから軟組織を可及的に除去し、液体窒素下で冷却しながら粉碎し直径0.8mm以下に調整したものを、洗浄、脱脂、脱灰を行なった。脱灰後の骨基質を洗浄し、グアニジン塩酸にてタンパク成分を可溶化し、この溶液を濃縮、遠心、濾過した後、カラムクロマトグラフィーにて部分精製した。三段階のカラムは Hydroxyapatite column, Heparin-Sepharose CL-6B column, Sephacryl S-300 HR columnで活性画分を各々、次のカラムに添加した。S-300カラムの活性画分をBMP部分精製物として実験に用いた。

骨粗鬆症(OVX)ラットは、4週齢のウィスター系ラットの卵巢を両側摘出し、術後低カルシウム食を与えることで作製した。対照群として偽手術(SHAM)を行なったラットを用いた。術後3週目に背部皮下と頭部頭頂骨骨膜下にBMP複合体を埋入した。担体としては背部皮下に骨不溶性基質(insoluble bone matrix, IBM)、頭部骨膜下にハイドロキシアパタイト(HAP)を用いた。骨形成の評価はアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、カルシウム(Ca)含有量、そして形態学的観察により行なった。

OVXラット大腿骨より骨髄細胞を採取し初代培養にてコンフルエントに到達後、継代培養して $\beta$ -グリセロリン酸、デキサメザゾン(DEX)存在下で培養し、骨芽細胞へと分化誘導させ、その分化能を対照群(SHAM)と比較した。分化の指標としてはALP、オステオカルシン(Oc)産生量、および $[^3\text{H}]\text{-プロリン}$ と $[^3\text{H}]\text{-グルコサミン}$ による蛋白質の生合成パターンを評価した。

### 【結果】

IBM/BMPを背部皮下に埋入した場合(異所性骨形成)、軟X線分析ではSHAMラットでは3週から6週にかけて著明な不透過像が認められたが、OVXでは不透過像は6週にかけても弱いものであった。生化学的分析でもALP値はOVXは観察期間を通じ、SHAMよりも低値を示し、Ca量はSHAMでは経時的に増加したが、OVXでは検出できなかった。組織学的には、OVXにおいて3週で軟骨形成が認められたが、その後、骨形成は確認されなかった。一方、SHAMでは実験期間を通じ、IBM周囲に旺盛な骨形成が見られた。

HAP/BMPを頭部骨膜下に埋入した場合(同所性骨形成)、OVXでは4週でHAPブロックの周囲から骨形成が確認され、中心部には軟骨性基質、肥大軟骨細胞が確認された。8週でも4週後と同様の形態を示し、アルシアンブルー染色により中心部に軟骨基質が確認された。SHAMでは4週から8週にかけて骨形成がブロック周囲からおきており、骨基質は層板状を呈していて、改造線が確認された。また骨髄形成も活発であった。

骨髄細胞の培養ではマトリックス中のALP活性、培地中のOc量ともにOVXはSHAMに比べて、3、4週にかけて、有意に低い値を示した。メタボリックラベリングではOVX、SHAMとともに $[^3\text{H}]\text{-プロリン}$ でラベリングした場合、骨芽細胞と同様のパターンを示し、さらに骨芽細胞に特有の35kDaタンパク質が認められ、 $[^3\text{H}]\text{-グルコサミン}$ でラベリングした場合も骨芽細胞に特有の60kDa付近にバンドが確認された。

### 【考察】

BMPを用いて異所性に骨形成を誘導した場合、骨粗鬆症ラットでの骨形成の低下が見られ、同所性では遅延が見られた。一方、大腿骨より採取した骨髄細胞はOVX群、SHAM群いずれも骨芽細胞としての形質を発現していたが、OVXラットでの骨芽細胞への分化能はSHAM群に比べて低下していることがわかった。以上より骨粗鬆症ラットではBMPによる骨形成能は正常より低下しており、骨形成の低下は骨芽細胞の分化新生が抑制されていることに原因の一つがあると推測された。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 川崎貴生  
副査 教授 久保木芳徳  
副査 教授 松本 章

## 学位論文題名

### 骨粗鬆症ラットにおける骨形成

#### —骨形成蛋白質（BMP）の作用低下の原因について—

審査は久保木、松本および川崎審査委員全員が出席のもとに学位申請者に対し、提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問によって行った。

以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

人口の中に占める高齢者の割合の増加に伴い骨粗鬆症をはじめとする骨疾患が社会問題になりつつある。骨粗鬆症は閉経後の女性に多く、これは女性ホルモンの分泌不全、ミネラルの摂取不足等との関係が考えられている。歯科の分野で問題となるのは骨粗鬆症に伴う顎堤の吸収が義歯の安定を妨げる因子と関係していることである。このような患者には顎堤挙上などの骨再建が必要となる場合が増えている。その治療法として自家骨、あるいは人工材料を骨膜下に埋入する顎堤形成法が現在行われているが、自家骨の埋入は、患者への負担が大きいため、人工材料の応用が試みられている。その中でも生体親和性の高いハイドロキシアパタイト（HAP）の応用は期待されているところである。この生体材料とTGF- $\beta$ のスーパーファミリーの一つである骨形成蛋白質（BMP）の複合体は骨形成を早期に誘導することが報告されているが、BMPはin vivoで骨形成を認めるのはホストの状態が正常な場合に限られ

ており、骨粗鬆症でどのような反応が見られるかはほとんど知られていない。

以上の状況を踏まえ、本論文提出者は実験的に骨粗鬆症としたラットを用い、このラットにおいてBMPが骨形成にどのように関与するかを検討している。実験的骨粗鬆症ラットは4週齢のラットに卵巣摘出手術(OVX)を行い、低カルシウム食を与えることによって作成し、対照群として、偽手術(SHAM)を行い、通常食を与え続けたラットを用いている。

本研究は大きく分けてin vivo, in vitroの2つから成る。本実験で用いた部分精製BMPは、牛骨より3段階カラムクロマトグラフィーにより部分精製したものである。

in vivoでの研究の内容は、異所性骨形成と同所性骨形成の検討から成り、異所性骨形成は部分精製BMPと担体としての骨不溶性基質(IBM)の複合体をOVX, SHAM両ラット背部皮下に埋入し、生化学的、形態学的に観察することによって行っている。同所性骨形成は部分精製したBMPとHAPの複合体をOVX, SHAM両ラット頭部頭頂骨骨膜下に埋入し、その骨形成を形態学的観察により行っている。

in vitroではOVX, SHAM両ラットの大腿骨より骨髓細胞を採取し、初代培養でコンフルエントに達した細胞をさらに継代培養した。このようにして得られた骨髓細胞を $\beta$ -グリセロリン酸( $\beta$ -GP)、デキサメサゾン(DEX)存在下で培養し、骨芽細胞へと分化誘導させ、その分化能を生化学的に比較検討している。

以上のことによって得られた結果は次のとおりである。

異所性骨形成をみると、OVXのALP値はSHAMの値に比べて低い値となり、Ca量はほとんど検出されなかった。軟X線分析では、OVXの不透過像は観察期間を通じて弱いものであり、組織学的には骨形成は確認されなかった。一方、SHAMでは3週から6週にかけて軟X線分析において著明な不透過像を認めており、組織学的にも活発な骨形成を確認している。同所性骨形成をみると、OVXでは4週で骨形成、それに軟骨形成を確認している。このHAPプロック

中心部に軟骨性基質、肥大軟骨細胞の存在を確認している。8週でもこれらの組織学的所見に大きな差は見られていない。一方、SHAMでは4週でHAPブロック周囲からの活発な骨形成が確認され、骨髓形成も見られた。8週になるとさらに成熟した骨の形成が確認され、骨基質の層板状構造も観察している。OVXで認められた軟骨形成はSHAMでは4、8週ともに確認できなかった。

*in vitro*の骨髓細胞培養の実験結果では、3、4週にかけてのOVXのマトリックス中のALP活性および培地中のOc量はSHAMに比べて有意に低い値を示した。 $\beta$ -GP, DEX存在下で培養したOVX, SHAMの骨髓細胞のメタボリックラベリングは、骨芽細胞(MC3T3-E1)と同様のパターンを示すことがフルオログラムにより確認された。

これらの結果から本論文提出者は次のように考察した。

BMPを用いて異所性に骨形成を誘導することを試みても、骨粗鬆症ラットではその骨形成能は低下しており、その効果は疑問である。しかし、同所性に骨形成の誘導を試みた場合、骨形成の遅延が認められたが、骨形成は可能であることが示唆され、骨粗鬆症患者に対する臨床応用の可能性があると考えている。このような結果の原因を骨髓細胞の培養実験の結果から考察すると、OVX, SHAMいずれの骨髓細胞も骨芽細胞としての機能を発現していたが、OVXの骨髓細胞の骨芽細胞への分化能はSHAMに比べて低下していることに起因しているのではないかと考えた。

以上をまとめると、骨粗鬆症ラットではBMPによる骨形成能は正常より低下しており、骨形成の低下は骨芽細胞の分化新生が抑制されていることに原因の一つがあると推測している。

本論文提出者は実験的に骨粗鬆症を作成する要素について、さらに細分化した実験系を考えており、本研究の将来的展望も高く評価された。

次いで本論文の内容に関連のある質問が行われた。これらの試問に関してそれぞれ適切な回答が得られた。また、本研究は骨粗

鬆症の病態の一部を明らかにするものであり、かつ臨床に應用できる価値のあるものであることが認められた。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。