学位論文題名

Effect of BMP on the Differentiation of Bone
Marrow Stromal Cells into Osteoblasts
in a Collagen-Gel Culture

学位論文内容の要旨

緒言

BMP (Bone Morphogenetic Protein; 骨形成タンパク質)は骨基質に存在し, 骨を誘導する生理活性を有するため, 種々の骨疾患に対する応用が期待されるが, その臨床応用の前には, 使用するBMPや, このタンパク質の *in vivo*における機能発現に不可欠であるキャリアーの選定など, いくつかの問題が残されている。近年, 久保木らは硬組織形成過程に関連する要素を①骨形成に直接寄与する細胞 ②その細胞が生成する細胞外マトリックス ③細胞外マトリックスに沈着するミネラル ④硬組織形成を制御する制御因子, の4つの要素に分類して, これら4大要素をそれぞれ詳細に分析するとともに, 各要素間の相互関係を明らかにして4大要素を総合することにより初めて硬組織形成のメカニズムを理解できると報告している。未解決の大きな問題の一つは細胞外マトリックスと有力な制御因子の一つとして考えられているBMPの相互作用である。すなわち, ラット背部皮下にBMPを埋植して骨を誘導する実験において, 種類の異なるBMPのキャリアーは骨形成に対して大きな影響を与えることが示唆されてきた。それに対し, *in vitro*系ではこれまで多くの実験者によりBMPの効果が調べられてきたが, 培地中にBMPを加え, その効果をみるという実験が多く, 細胞外マトリックスとBMPの相互作用について考慮されていなかった。そこで本研究では未分化細胞から骨芽細胞へ分化してゆくと考えられている骨髄間質細胞の培養系を

用い，典型的な細胞外マトリックスであるコラーゲンが構築する環境の下に，BMPの作用がどのように影響を受けるかを検討した。

材料と方法

6 - 8 週齢雄の WKAH 系のラット大腿骨より通法に従って骨髄細胞を採集し，15% FCS を含む α -MEM 培地（以下標準培地と称す。）中で培養し，非接着性の細胞を除去後，継代し実験に供した。この細胞を，次の 3 種の条件下で培養し，骨芽細胞への分化過程を比較分析した。すなわち，①標準培地中に種々の濃度のリコンビナント BMP2 (rBMP2) を添加した培養，② Maniopoulos らの方法に従い 10^{-8} M デキサメサゾン・10 mM β -グリセロリン酸を添加した標準培地に，さらに種々の濃度の rBMP2 を加えた条件での培養，③ 種々の濃度の rBMP2 を含む I 型コラーゲン・ゲルを敷いたディッシュの上での標準培地による培養の 3 種である。上記 3 種の培養条件下での骨髄細胞の分化過程を，位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察するとともに，骨芽細胞のマーカーとしてのアルカリフォスファターゼ活性やオステオカルシン，細胞基質のカルシウム含有量ならびに DNA 量を生化学的に分析した。

結果

1. 標準培地中（条件 1）での BMP の添加

通法通りに標準培地で培養した骨髄細胞は初代培養と類似した線維芽細胞様の紡錘形から多角形へと形態を変化させたが，コロニーの形成は認められなかった。標準培地に rBMP2 を加えても，rBMP2 の有無により細胞自体の形態に変化は認められず，結節の形成も生じなかった。

生化学的分析でも BMP の添加により ALP 活性の若干の増加のみを認めたが，その活性値は他の条件と比べ，極めて低いものであった。

2. デキサメサゾンと β -グリセロリン酸含有培地中（条件 2）での BMP の添加

デキサメサゾン・ β -グリセロリン酸添加培地にて培養された細胞は，7 日目には石灰化結節を形成しているの

が認められた。rBMP2 220 ng/mlをデキサメサゾン・ β -グリセロリン酸添加培地に加えたところ、類円形の細胞が集積した結節を形成し、その中心部に現われた不透過部位はrBMP2無添加のものより広範囲に及んでいた。

この条件では、添加したBMPの用量に依存してALP活性、Ca量が増加し、骨芽細胞への分化が促進されたものと思われた。

3. 各濃度のBMPを含有するコラーゲン・ゲルの上での培養（条件3）

BMPを含まないコラーゲンゲル上では骨髄細胞は通法の場合と同様に増殖し、コンフルエントの状態に至った後、形態を多角形で敷石状へと変化させた。その後も細胞は緩やかに増殖を続け結節を形成し、約2週で結節内部に不透過像を認めるようになった。BMPを440 ng/ml以上含むゲルでは、その結節形成および不透過像の形成が早まり、約7～10日で認められた。結節は肉眼的には白色の不透過物として認められ、rBMP2の濃度が上昇するにつれ、その不透過部も拡大した。

種々の濃度のrBMP2を含むコラーゲンゲル上で、骨髄細胞を10日間培養したところ、ゲル内rBMP2濃度が44 ng/ml以上において、マトリックス中のCa含有量が無添加群よりも有意に増加し、440 ng/ml以上ではALP活性が用量依存的に明瞭に増加した。

コラーゲンゲル上培養での経時的変化を検討したところ、BMPを含まないコラーゲンゲル上で培養された細胞でもALP活性は徐々に上昇が観察されたが、それに対しrBMP2 440 ng/ml添加のコラーゲン上で培養されたものは無添加群にくらべて非常に早期にALP活性値が上昇し、1週で無添加群の約1.5倍という高い活性を示し、2週、3週で低下する傾向を示した。

マトリックス中のCa量はBMPの有無にかかわらず経時的に増加したが、無添加群では1週ではCaがほとんど検出されなかったのに対し、添加群では100 μ g/dishのCaを示した。

オステオカルシン量はrBMP2を添加した群では、1週で無添加群に比べ約6倍量のオステオカルシンを産生しているのが認められ、2週でピークに達しその後減少し

た。一方、無添加群のオステオカルシン量は、1週ではわずかに検出されるのみであり、その後、徐々に上昇し、3週目で添加群にほぼ近い値に至った。

以上の結果より、BMPを含むコラーゲンゲル上にて骨髄細胞を培養した場合には、BMPを含まないコラーゲンゲル上で培養した場合よりも、ALP活性、Ca量、オステオカルシンの産生が有意に早まり、骨芽細胞への分化が顕著に加速されることが示唆された。

考察および結論

骨髄細胞の骨芽細胞への分化は、さまざまな制御因子や細胞外基質およびそれらの組み合わせによって支配されると考えられている。顕著な局所制御因子としてBMP、および典型的マトリックス成分のコラーゲンもそれらの一部である。一方、強力な合成グルココルチコイドであるデキサメサゾンが骨芽細胞への分化を促進させる因子であることは本研究でも確認されたが、この制御因子はそのままの形では生体に存在しない。そこで本研究では、生体成分であるコラーゲンのゲルがデキサメサゾンの作用に代わり得ることを確認した上で、コラーゲン・ゲル培養系を用いてBMPの効果を追求した。その結果、BMPとコラーゲンの両者の組み合わせが、コラーゲン単独での効果を顕著に加速させることが示された。この結果はBMPのような局所的制御因子が細胞外マトリックスと相互反応して、独自の効果を発揮するものであることを明瞭に示すものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 下河辺 宏 功

副 査 教 授 久保木 芳 徳

副 査 教 授 松 本 章

学位論文題名

Effect of BMP on the Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Osteoblasts in a Collagen-Gel Culture

審査は、最初に三審査担当者全員によって、提出論文について申請者に口頭による試問がなされた。次いで久保木審査員により、生化学分野の筆記試験が行われた。口頭試問については、論文の緒言、実験方法、結果、考察、結論等の内容の説明を求め、各項目毎に詳細に質疑応答する形式でなされた。本論文の要旨は以下のとおりである。

BMP (Bone Morphogenetic Protein; 骨形成タンパク質)は骨基質に存在し、骨を誘導する生理活性を有するため、種々の骨疾患に対する応用が期待されるが、その臨床応用の前には、いくつかの問題が残されている。近年、久保木らは硬組織形成過程に関連する要素を①骨形成に直接寄与する細胞 ②その細胞が生成する細胞外マトリックス ③細胞外マトリックスに沈着するミネラル ④硬組織形成を制御する制御因子、の4つの要素に分類して、硬組織形成のメカニズムを理解できると報告している。ラット背部皮下にBMPを埋植して骨を誘導する実験において、種類の異なるBMPのキャリアーは骨形成に対して大きな影響を与えることが示唆されてきた。それに対し、*in vitro*系ではこれまで多くの実験者によりBMPの効果が

調べられてきたが，培地中にBMPを加え，その効果をみるという実験が多く，細胞外マトリックスとBMPの相互作用について考慮されていなかった。そこで本研究では未分化細胞から骨芽細胞へ分化してゆくと考えられている骨髄間質細胞の培養系を用い，典型的な細胞外マトリックスであるコラーゲンが構築する環境の下に，BMPの作用がどのように影響を受けるかを検討した。

【材料と方法】

6 - 8 週齢雄のWKAH系のラット大腿骨より通法に従って骨髄細胞を採集し，15% FCSを含む α -MEM培地（以下標準培地と称す。）中で培養し，非接着性の細胞を除去後，継代し実験に供した。この細胞を，次の3種の条件下で培養し，骨芽細胞への分化過程を比較分析した。すなわち，①標準培地中に種々の濃度のリコンビナントBMP2(rBMP2)を添加した培養，②Maniatopoulosらの方法に従い 10^{-8} Mデキサメサゾン・ $10\text{mM}\beta$ -グリセロリン酸を添加した標準培地に，さらに種々の濃度のrBMP2を加えた条件での培養，③種々の濃度のrBMP2を含むI型コラーゲン・ゲルを敷いたディッシュの上での標準培地による培養の3種である。上記3種の培養条件下での骨髄細胞の分化過程を，位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察するとともに，骨芽細胞のマーカールとしてアルカリフォスファターゼ活性やオステオカルシン，細胞基質のカルシウム含有量ならびにDNA量を生化学的に分析した。

【結果および考察】

第1条件にて培養された未熟な骨髄細胞にrBMP2を添加した場合，ALP活性は上昇したが，石灰化結節の形成はみられなかった。一方，第2,3の条件，すなわちDex・ β -GPを含む培地中ならびにI型コラーゲン・ゲルにrBMP2を添加して培養した場合にはALP活性の上昇，オステオカルシン産生が早まり，骨芽細胞への分化が明確に促進された。

骨髄細胞の骨芽細胞への分化は，さまざまな制御因子

や細胞外基質およびそれらの組み合わせによって支配されると考えられている。顕著な局所制御因子としてBMP, および典型的マトリックス成分のコラーゲンもそれらの一部であり, BMPとコラーゲンの両者の組み合わせが, コラーゲン単独での効果を顕著に加速させることが示された。この結果はBMPのような局所的制御因子が細胞外マトリックスと相互反応して, 独自の効果を発揮するものであることを明瞭に示すものである。

以上の研究内容について, 主査および副査から以下のような質問がなされた。

(1) 本研究は, 培養条件により種々な細胞へ分化すると報告されている骨髄間質細胞を用い, 骨芽細胞への分化を検討しているが, 今回の培養条件では軟骨細胞への分化は認められなかったか, どのような指標をもって軟骨細胞の有無を検討したか。

(2) *in vitro* での骨芽細胞への分化および骨形成についてどのように考えるか, またどのような指標を用いて骨芽細胞へ分化したとみなしたか。

(3) 本研究の結果の臨床的意義等について, 説明を求めた。

これらの質問に対して, 申請者から, 専門領域における学識の理解のもとに明快な回答ならびに説明が得られ, また関連学科目についても幅広い学識を有していることが認められた。さらに久保木審査員による筆記試験にも合格と判定された。

以上の結果, 本研究は歯科医学の発展に十分貢献するものであり, 審査の結果, 審査担当者全員によって, 本研究の論文は歯学博士の学位を授与されるものとして値することが認められた。