

学 位 論 文 題 名

Time-Dependent Expression of Bone Sialoprotein Fragments
in Osteogenesis Induced by Bone Morphogenetic Protein

BMP 誘導骨形成における低分子型骨シアロタンパク質の出現とその意義

学位論文内容の要旨

【目的】 骨マトリックスタンパク質は、その構成要素を主成分であるI型コラーゲンと非コラーゲン性タンパク質に大別することができる。これらの構成成分の殆どは骨芽細胞が産生したものである。骨の形成機序を生化学的に考えるにあたり、骨芽細胞を含めた4大因子論が提唱されている。それらは、1) 骨形成に関与する細胞(骨芽細胞を含む)、2) 細胞外マトリックス、3) 体液のミネラルイオン、4) 制御因子、の4つの因子である。ここにあげた4つの因子が有機的に統合されて骨の形成が生じるものと考えられる。この観点から著者らは、制御因子である骨形成タンパク質(BMP)と細胞支持体として一種の細胞外マトリックスとしての機能をはたしていると考えられる担体のくみあわせに注目し、異所性骨誘導実験を行ってきた。Reddiらは担体として骨不溶性基質(IBM)を用い、BMPと複合して皮下もしくは筋肉内といった骨の無い部位に埋植した際に、軟骨性骨化の過程を経て骨が誘導され、さらに骨吸収の過程へといたる一連の変化が生じることを明らかにした。こうした理由から、この実験系は骨形成の過程において生じる細胞外マトリックスの変化を生化学的に追求するための最適なモデルと考えられた。現在、骨の細胞外マトリックスとして注目されているものに、骨に特有の非コラーゲン性タンパク質で石灰化、骨芽細胞制御による骨形成、および、破骨細胞の制御による骨吸収への関与が報告されている骨シアロタ

ンパク質（BSP）がある。そこで本研究では、BMP異所性骨誘導系におけるBSPの出現状況の経時的変化を追求し、その機能について考察した。

【方法】 成牛脱灰骨より4Mグアニジン塩酸にて抽出後、3段階クロマトグラフィーを行ないBMPの部分精製を行なった。部分精製 BMP0.1mgをIBM 20mgに含浸し、WKAH系、オス、4週齢ラット背部皮下に埋植した後、1、2、3、4、5、6、8、10、20週に摘出し形態学的、生化学的分析を行なった。形態学的分析としては、摘出物を10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、ヘマトキシリンエオジン染色を行なった。生化学的分析としては、骨形成のマーカーとしてBMP異所性骨誘導系において確立されたアルカリフォスファターゼ活性測定、カルシウム、およびオステオカルシンの定量を行なった。BSPについては、抗BSPモノクローナル抗体を用いて摘出物中におけるウエスタンブロッティング法による同定、ELISA法による定量を行なった。また、摘出物中に確認されたBSPの合成状況を確認するために5週摘出物に対して $[^3\text{H}]$ prolineにより代謝的に標識した。さらに、BSPの局在状況を検討するために、5週摘出物を4%パラホルムアルデヒドにて固定、0.5M EDTA, 0.05M Tris-HCl, pH 7.4 による脱灰を行なった後、抗BSPモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的分析を行なった。

【結果】 生化学的分析結果と組織学的分析の結果とをあわせて1週から20週までの異所性に誘導した骨の形成状況を経時的に追求したところ、BMP誘導骨中において骨がリモデリング期に移行しはじめたことが認められた5週においてウエスタンブロッティング法により53kDa、および30kDaに抗BSPモノクローナル抗体に対して強い反応が認められた。これらは正常のウシ骨およびラット骨の抽出物に認められる57kDaのBSPと異なるものであった。そこで、ウシBSPを用いた競争試験を行なったところバンドが消失し、双方ともBSPの低分子の代謝産物であることが確認された。そこで、これらのBSPフラグメントの合成状況を確認するために $[^3\text{H}]$ prolineによる代謝的標識を行なった結果、53kDa、30kDa双方の分泌が認められた。摘出

物中のBSPをELISA法によって定量を行なったところ、埋植後5週目において急激に増加し以後リモデリングが生じて骨が維持されている時期においてほぼ一定の値を保つことがわかった。また、抗体染色の結果より、骨マトリックスの辺縁に特異的にBSPの局在が確認された。

【考察】本研究において、骨に特異的なマトリックスタンパク質であるBSPのBMP誘導骨中における発現状況を時間経過をおって検討した。その結果、骨にリモデリングが生じ始めると同時に、BSPが低分子型フラグメントとして出現することが明らかとなった。低分子型のフラグメントについては、以前より複数の報告がなされており、それらのフラグメントは骨芽細胞もしくは破骨細胞の産生する内因性プロテアーゼによる代謝産物とされてきたが、本研究における代謝的標識の結果により、BSPはフラグメントの形で培養上清中に検出された。。このことから、BSPは骨芽細胞により合成されたのち早期のうちに内因性プロテアーゼによる代謝をうけ、その後に骨表層のマトリックスに局在するように取り込まれるものと考えられる。

機能的な観点においては、BSPは石灰化、とくに初期石灰化に関与するとのIn vitro実験系での報告が以前よりなされている。本研究では、4週でカルシウム量が増加のピークを迎えたのに対してBSPは骨のリモデリングが生じ始める5週で急激に増加するという結果となった。このように、BSPの増加傾向とカルシウムの増加傾向と比較して1週間の遅れが認められた。また、リモデリング開始期の5週において、抗体染色によりBSPが骨芽細胞が接している骨辺縁部のマトリックスに局在していることも明らかになった。以上の結果を総合するとBSPは骨形成における初期石灰化ではなく細胞制御による骨リモデリングへの関与が示唆される。

細胞制御の面においては、BSP中におけるRGD配列の存在およびBMP誘導骨における局在状況から、骨芽細胞の細胞接着に関与しているものと考えられる。そしてBSPが骨マトリックスと骨芽細胞間に介在し骨芽細胞の制御に関与しているのではと考えられる。さらに、最近BSPは破骨細胞に対しても接着性を示し、その活性を上昇させるとの報告がなされ、一方、オ

ステオカルシンは従来から破骨細胞の制御への関与が報告されている。本研究の結果は、リモデリング期に移行した時期よりオステオカルシンとBSPの増加傾向にほぼ一致が認められ、さらにBSPが骨の表層に高いレベルで局在していることから破骨細胞の支持および細胞制御にも関与すると考えられる。

以上の結果を総合して、BSPは骨のリモデリングの制御を含む多様な機能を示すタンパク質であることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 久 保 木 芳 徳
副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Time-Dependent Expression of Bone Sialoprotein Fragments in Osteogenesis Induced by Bone Morphogenic Protein

BMP 誘導骨形成における低分子型骨シアロタンパク質の出現とその意義

審査は、久保木、松本および戸塚審査員の出席のもとに、申請者に対し、提出論文の内容とそれに関連した授業科目について、口頭試問により行われた。

本研究は、骨に特有の非コラーゲン性タンパク質の1つである骨シアロタンパク質（BSP）の骨形成における役割を明らかにすることを目的として、BMP異所性骨誘導系の骨形成の一連の過程におけるBSPの出現状況の経時的变化を追求したものである。

本実験では、BMPの精製は、成牛脱灰骨から4Mグアニジン塩酸にて抽出後、3段階クロマトグラフィーにより部分精製した。部分精製BMP 0.1mgを担体である骨不溶性基質（IBM）20mgに含浸し、WKAH系、オス、4週齢ラット背部皮下に埋植した後、1、2、3、4、5、6、8、10、20週に摘出し、形態学的ならびに生化学的に分析した。生化学的分析は、骨形成のマーカースとしてアルカリフォスファターゼ活性測定、カルシウムおよびオステオカルシンの定量を行った。BSPについては、抗BSPモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティング法による摘出物中のBSPの同定とELISA法による定量を行った。また、BSPの合成状況を確認するため5週摘出物を $[^3\text{H}]$ prolineにて代謝的に標識し、さらにBSPの局在を検討するため抗BSPモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的分析を行った。

その結果、BMP誘導骨において骨がリモデリング期に移行し始めた埋植5週以降において、ウェスタンブロッティング法により53KDaおよび30KDaに抗BSPモノクローナル抗体に対して強い反応が認められた。これらは正常のウシ骨およびラット骨の抽出物に認められる57KDaのBSPとは異なるものであるが、ウシBSPを用いた競争試験でともに消失し、双方ともBSPの低分子代

謝産物であることが確認された。また、 $[^3\text{H}]$ prolineによる代謝的標識においても、53KDaおよび30KDa双方の分泌が認められた。ELISA法による定量の結果、BSPは埋植5週目に急激に増加し、以後リモデリングが生じて骨が維持されている期間ほぼ一定の値を保つことが明らかとなった。オステオカルシンの量はBSPとほぼ同様の変化を示したが、カルシウム量は埋植4週目に急激に増加し以後ほぼ一定の値を保持していた。一方、BSPの局在については、抗体染色の結果から、骨マトリックス辺縁に特異的に存在していることが確認された。

以上の結果は、BSPは、BMP異所性骨誘導系の骨形成において、骨のリモデリングに関与していることを示唆している。これまで、BSPの骨形成における役割はよく分かっておらず、初期石灰化への関与を示唆する報告もあったが、本研究結果から、BSPは、骨形成において、細胞制御により骨リモデリングに関与していることが明らかとなった。なお、細胞制御については、BSP中におけるRGD配列の存在ならびにBMP誘導骨におけるBSPの局在から、骨芽細胞の細胞接着に着目し、BSPが骨マトリックスと骨芽細胞間に介在して骨芽細胞の制御に関与しているものと考察している。また、BSPとオステオカルシンの増加傾向がほぼ一致していることや、オステオカルシンと破骨細胞との係わりなどから、BSPは破骨細胞の支持ならびに細胞制御にも関与している可能性があると推測している。

論文の審査は、論文提出者による要旨の説明の後、本研究内容ならびに関連する学問領域の知識について、主査および副査からの口頭試問の形で行われ、いずれの質問についても明解な説明ないし解答がえられた。

骨の形成機序を生化学的に考えるに当たり、骨形成に関与する細胞、細胞外マトリックス、体液のミネラルイオン、制御因子、の4つの因子からなる「4大因子論」が提唱されている。このうち、細胞外マトリックスの機能については、従来から考えられていた細胞の支持のほか、最近ではレセプターを介した細胞制御への関与が論議されているが、その事実を証明した研究はこれまで全く報告されていない。本研究は、細胞外マトリックスの骨形成に果たす機能的役割に着目し、骨に特有の非コラーゲン性タンパク質の1つである骨シアロタンパク質（BSP）が、骨形成において、細胞制御により骨リモデリングに関与していることを生化学的に初めて明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、骨形成機序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が大きく、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。