

学位論文題名

Anti-bone sialoprotein (BSP) monoclonal antibody  
suppressed the expression of osteoblastic phenotypes  
of bone marrow stromal cells cultured  
on type I collagen matrix.

抗 BSP モノクロナール抗体は I 型コラーゲンマトリックス上で  
培養された骨髄幹細胞の骨芽細胞への分化を抑制する

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨シアロ糖タンパク質(BSP)は、骨、象牙質そしてセメント質のみにその存在が報告される硬組織に特異的な酸性糖タンパク質である。これまで BSP は、そのアミノ酸配列やコラーゲンへの接着性などの特性から、石灰化の開始や促進、骨芽細胞の機能発現に関わっていることが明らかにされてきた。しかし骨芽細胞の分化が進行する過程において、BSP が細胞の分化にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど知られていない。本研究では、新たに開発した培養系での骨芽細胞分化モデルを用い、BSP と分化の関わりを抗 BSP モノクロナール抗体を使用することで明らかにした。

【実験方法】

1. 抗 BSP モノクロナール抗体の作製

牛骨より精製した BSP をマウス腹腔内へ注入した後、脾細胞を採取し骨髄腫細胞と融合させることでハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマを 96 マルチウェルプレートへ添加した後、抗体を産生しているクローンのスクリーニングを行った。そして抗体を産生しているハイブリドーマをマウス腹腔へ移植し、腹水を採取した。腹水に含まれる抗体は BSP を結合させたアフィニティーカラムにて精製した。

2. 骨髄細胞の培養

6 週齢のラット大腿骨より細胞を採取し、フラスコに接着性を有する細胞のみを選択的に増殖させ、骨髄細胞として本実験に用いた。骨髄細胞( $5 \times 10^5$  cells) は 35 mm ディッシュ中に作製した I 型コラーゲンマトリックス上に添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータ中で通法に従い 3 週まで培養し、細胞の形質発現を形態学的、生化学的に分析した。実験群においては、骨髄細胞をコラーゲンマトリックス上で培養するとき、培地に抗 BSP モノクロナール抗体を最終濃度で 400 倍希釈となるように加えて、3 週まで培養し各種測定に用いた。これを抗体処理群とした。対照群としては、培地にマウス

IgG を同希釈で加えたものを用いて培養を行った。その後、骨髄細胞およびマトリックスを採取し、その形質発現を生化学的に分析した。

### 【結果】

#### 1. 骨髄細胞のコラーゲンマトリックス上での培養

骨髄から採取した接着性細胞を I 型コラーゲンマトリックス上で培養すると、細胞は多角形の形態を示し、3 週間後にはマトリックス上に肉眼で確認可能な石灰化結節が出現した。その結節中にはヒドロキシアパタイトの存在が確認された。一方、通常のディッシュで培養された骨髄細胞は、単層の繊維芽細胞様の形態を示すのみで石灰化結節の形成は認められなかった。さらにコラーゲンマトリックス上で 3 週間培養された骨髄細胞は、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性や副甲状腺ホルモン(PTH)への応答性が高く、オステオカルシン(OCN)を活発に産生していた。また Western blotting 法にて、細胞の BSP 産生能を調べたところ、コラーゲンマトリックス上で 3 週間培養した骨髄細胞においてのみ、BSP の産生が確認され、その分子量は牛骨から精製した BSP とほぼ同等であることが明らかになった。

#### 2. 培地に抗 BSP モノクロナール抗体を加えた骨髄細胞の培養

抗 BSP モノクロナール抗体を含む培地を用いて、コラーゲンマトリックス上で 3 週間培養した抗体処理群の骨髄細胞は、多角形の形態を示したが、石灰化結節の形成は認めなかった。また、マウス IgG を加えた培地で培養した対照群の骨髄細胞と比較すると、細胞の ALP 活性および PTH 応答性は低く、コラーゲンマトリックス中に含まれるカルシウム量も有意に少なかった。さらに、OCN の産生も認められず、遺伝子レベルでも、抗体処理群では OCN 遺伝子の転写は認められなかった。

#### 3. 培地に BSP を加えた骨髄細胞の培養

抗体処理群の培養に用いた抗体を加えた培地にさらに牛骨から精製した BSP を添加し、通常の培地を用いて培養した骨髄細胞と比較してみた。その結果、細胞の ALP 活性およびコラーゲンマトリックス中のカルシウム量に差は認められなかった。

さらに、コラーゲンマトリックス上で骨髄細胞を、通常の培地を用いて 2 週間培養した後、培地に精製した BSP を加えて 1 週間培養し、通常の培地を用いて 3 週間培養した細胞と比較してみた。その結果、細胞の ALP 活性およびマトリックス中のカルシウム量は、培地に BSP を加えた群において有意に高い値を示すことが明らかとなった。

### 【考察】

コラーゲンマトリックス上で 3 週間培養した骨髄細胞は、石灰化結節を形成し、骨に特有なマーカータンパク質である OCN を産生することから、明らかに骨芽細胞としての形質を発現しており、本系は骨芽細胞分化モデルとして有用であると考えられる。本系の培地に抗 BSP モノクロナール抗体を加えると、骨芽細胞としての形質発現は down regulate され、骨芽細胞への分化が抑制されていることが明らかになった。また、培地に BSP を加えることで、抗体による抑制効果が中和されることから、抗体の効果は骨髄細胞に特異的であることが確認された。さらに培地に BSP を添加することで、形質発現は up regulate され、骨髄細胞の骨芽細胞への分化が促進されるこ

とが判明した。

BSP は、コラーゲン接着サイトを有し、またグルタミン酸の連続配列を介しヒドロキシアパタイトに接着性を有し、石灰化の開始、促進に関与していることが報告されている。このことより、抗 BSP 抗体を培地に加えることで、ヒドロキシアパタイトの BSP を介したコラーゲン上への結合が阻害され、石灰化は抑制されることは考えられる。しかし本結果では培地に抗体を加えることで、骨芽細胞としての形質発現が抑制されたため、石灰化が起こらなかったと考えられる。BSP 分子内には細胞接着サイトである RGD 配列が存在し、細胞膜状の  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor (vitronectin 様レセプター) と結合し、細胞機能を制御していることが報告されている。抗 BSP 抗体は、細胞の産生する BSP と特異的に結合して複合体を形成することで、BSP と細胞の結合を阻害し、その結果細胞の分化が抑制されたと考えられる。培地に BSP を加えることで、骨芽細胞の形質発現が促進されることも、BSP と細胞の結合が骨芽細胞の分化に大きく関与していることを示唆している。以上のことから、BSP は骨芽細胞の分化過程において、重要な役割を果たしていることが明らかになった。

#### 【結論】

本研究から以下のことが明らかになった。

- 1) 骨髄細胞を I 型コラーゲンマトリックス上で培養することで、骨芽細胞への分化が促進され、骨芽細胞の形質を発現した。
- 2) 抗 BSP 抗体は骨髄細胞の骨芽細胞への分化を抑制する。
- 3) BSP は骨髄細胞の骨芽細胞への分化を促進する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 宏  
副 査 教 授 松 本 章  
副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

Anti-bone sialoprotein (BSP) monoclonal antibody  
suppressed the expression of osteoblastic phenotypes  
of bone marrow stromal cells cultured  
on type I collagen matrix.

抗 BSP モノクロナール抗体は I 型コラーゲンマトリックス上で  
培養された骨髄幹細胞の骨芽細胞への分化を抑制する

審査は、主査、副査全員の出席のもとに、申請者に対して提出論文とそれに関連した分野について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

骨シアロ糖タンパク質(BSP)は、骨、象牙質そしてセメント質のみにその存在が報告される硬組織に特異的な酸性糖タンパク質である。これまで BSP は、そのアミノ酸配列やコラーゲンへの接着性などの特性から、石灰化の開始や促進、骨芽細胞の機能発現に関与することが報告されてきた。しかし幹細胞から骨芽細胞へ分化が進行する過程で、BSP が細胞の分化にどのような影響を及ぼすかはほとんど知られていない。本研究は、新たに開発した培養系での骨芽細胞分化モデルを用い、BSP が細胞の分化にどのような影響を与えるかを、抗 BSP モノクロナール抗体を使用することで明らかにした。

本研究に用いた細胞は、6 週齢のラット大腿骨より幹細胞を採取し、培養フラスコに接着性を有する細胞のみを骨髄細胞として実験に用いた。骨髄細胞を、I 型コラーゲンマトリックス上で 3 週まで培養し、細胞の形質発現を形態学的、生化学的に分析した。その結果、培養 3 週間後には、マトリックス上にヒドロキシアパタイトを有する石灰化結節が形成され、その結節中に骨髄細胞様の細胞の存在が確認された。また 3 週培養した骨髄細胞は、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性や副甲状腺ホルモン(PTH)への応答性が高く、骨に特有なマーカータンパク質であるオステオカルシン(OCN)を産生していることが判明した。そこで BSP 産生能を、Western blotting にて調べたところ、コラーゲンマトリックス上で 3 週培養した骨髄細胞で BSP の産生が確認

された。なお、本研究に用いた抗 BSP モノクロナール抗体は、牛骨より精製した BSP を用いて通法に従い作製し、BSP を結合させたアフィニティーカラムにて精製した。これらより、コラーゲンマトリックス上で 3 週間培養した骨髄細胞は、骨芽細胞の形質を発現することが明らかになった。そこで骨髄細胞をコラーゲンマトリックス上で培養するとき、培地に抗 BSP モノクロナール抗体を最終濃度で 400 倍希釈となるように加えて培養したものを抗体処理群、培地にマウス IgG を同希釈で加え培養したものを対照群として、骨髄細胞の形質発現を分析した。その結果、対照群では石灰化結節の形成を認めたが、抗体処理群においては結節の形成は認めなかった。また抗体処理群では、細胞の ALP 活性、PTH への応答性およびマトリックスに含まれる Ca 量が有意に低く、OCN の産生も遺伝子の転写も認められなかった。これらより、培地に抗体を加えることで、骨髄細胞の骨芽細胞への分化が抑制されることが明らかになった。そこで、抗体処理群の細胞に、さらに牛骨から精製した BSP を培地に加えて培養したところ、細胞の ALP 活性およびマトリックス中の Ca 量は対照群とほぼ同程度に上昇した。さらに、コラーゲンマトリックス上で通常の培地を用いて 2 週培養した細胞に、牛骨から精製した BSP を加え 1 週培養すると、骨髄細胞の ALP 活性およびマトリックス中の Ca 量は、通常の培地で 3 週培養した細胞と比較し有意に高い値を示すことが明らかになった。これらの結果より、骨髄細胞の骨芽細胞への分化は、BSP により促進されることが示唆された。

本研究から 1) 骨髄細胞を I 型コラーゲンマトリックス上で培養することで、骨芽細胞への分化が促進され、骨芽細胞の形質を発現した、2) 抗 BSP 抗体は骨髄細胞の骨芽細胞への分化を抑制する、3) BSP は骨髄細胞の骨芽細胞への分化を促進していることが明らかになった。BSP 分子内には RGD 配列があり細胞膜上の  $\alpha v \beta 3$  integrin receptor (vitronectin 様レセプター) と結合して細胞機能を制御していることが報告されている。抗 BSP 抗体は細胞が産生する BSP と特異的に結合して複合体を形成することにより BSP と細胞の結合を阻害し、その結果細胞分化が抑制されたと考えられる。以上から骨芽細胞の分化過程においても BSP は重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

論文の審査にあたって、学位申請者による研究内容の説明後、本研究ならびに関連する分野について主査および副査より質問が行われた。いずれの質問についても、申請者からそれぞれ適切かつ明快な回答が得られた。また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、骨芽細胞の分化に与える BSP の影響を明らかにしただけでなく、接着性タンパク質と細胞との Interaction を研究するうえで貴重な情報を提供し高く評価される。以上のことから、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。