

学 位 論 文 題 名

Pleiotrophin regulates bone morphogenetic protein
(BMP) -induced ectopic osteogenesis

（骨形成タンパク質による異所性骨形成へのプレイオトロフィンの効果）

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨に含有されるタンパク質の主なものはⅠ型コラーゲンであるが、微量かつ様々な種類の非コラーゲン性タンパク質の役割は遺伝子構造の解明に伴い、明らかになりつつある。骨形成に関与する細胞と特異的に接着し、その細胞の足場となりうること、また、硬組織形成細胞との接着によって細胞の分化に関与することなどが報告され、非コラーゲン性タンパク質の効果は現在も検討されている。

プレイオトロフィン (PTN) はリジン残基を多く含むことを特徴とした分子量 18 kDa の強塩基性タンパク質である。ミドカインと相同性を有し、主に脳・子宮・骨・軟骨・類骨・象牙前質に分布し、神経突起伸長活性、細胞の分化増殖促進活性、骨細胞の分化促進活性、血管新生活性、Ⅰ型コラーゲンとの強い親和性を有し、発生、増殖、分化に関わるヘパリン結合性成長因子である。PTN の *in vitro* における骨芽細胞や軟骨細胞に対する効果は報告されているが、*in vivo* における硬組織に対する効果の報告はない。

我々は成牛骨由来の PTN をタンパク質として抽出・精製し、PTN がマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において細胞接着の促進、増殖期における DNA 量の増加、分化期におけるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇に関与することを明らかにした (H. Y. Zhou et al., Biochem Biophys Res Commun, 1992)。

さらに、我々は成牛骨粉由来の骨形成タンパク質 (BMP) の抽出、部分精製を行い、その骨形成能がリコンビナントヒト BMP-2 (rhBMP-2) に比べて非常に強いことを見だし、部分精製物になんらかの相乗因子の含有の可能性を示唆し、ウエスタンブロッティングによって部分精製物の一部に PTN が含有することを見いだした。

そこで本研究では、*in vivo* において BMP-2 により誘導された異所性骨形成に対し PTN がどのような効果を示すか検討した。

【材料と方法】

成牛乾燥骨粉を洗浄、脱脂し、12 N 塩酸 (pH 2.0) にて脱灰した。濾過後、脱灰液を Tris-HCl にて中和し (pH 7.4)、濾過により中和上清を得た。中和上清は限外濾過にて濃縮した。濃縮サンプルをヘパリンセファロースクロマトグラフィー (0.1 M と 1.0 M NaCl のステップワイズ)、S-200 HR ゲル濾過、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー (0.05 M から 1.0 M KH_2PO_4 -KOH

のグラジエント) の3段階のクロマトグラフィーにより分離した。それぞれの過程にて得られたサンプルを電気泳動し、クマシーブリリアントブルー染色、ウエスタンブロッティング法にて精製を確認し (native PTN)、以下の実験に用いた。対照群を rhBMP-2 1.2 μ g 単独とし、実験群を 5、10、50、100 μ g の native PTN と rhBMP-2 1.2 μ g の各群、5、10 μ g のリコンビナントヒト PTN (rhPTN) と rhBMP-2 1.2 μ g の各群、10 μ g の native PTN 単独の群として、それぞれを 5×10mm のガラス線維膜 (保留径 1 μ m) に含浸、凍結乾燥し、4週齢ウイスター系雄ラット背部皮下に埋入した。3週間後、屠殺、埋入物を摘出し、生化学的分析として ALP 活性、カルシウム含有量の測定と組織学的観察 (ヘマトキシリン・エオジン染色、アルシアンブルー染色) を行った。

【結果】

前述の方法により抽出し得られた濃縮サンプルをクロマトグラフィーにより分離・精製した。ヘパリンクロマトグラフィーにおいて、0.1 M と 1.0 M NaCl それぞれにおいてピークが出現した。PTN は 1.0 M 分画に存在したが、クマシーブリリアントブルー染色にてその他のタンパク質の存在も見られた。S-200 HR ゲル濾過により2つのピークが見られ、うち高分子分画に PTN の溶出が確認された。ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーによっては 0.5 M 付近にてピークが出現した。この分画のクマシーブリリアントブルー染色像がほぼ単一のバンドであること、ウエスタンブロッティングにて抗 PTN 抗体により検出されることから、成牛骨粉から native PTN が得られた。

マウス背部皮下埋植実験の結果、rhBMP-2 単独の対照群と比較して 10 μ g の native PTN 添加において ALP 活性、カルシウム含有量ともに増加の傾向が見られた。特にカルシウム含有量は、対照群の 1.6-1.7 倍を示した。一方、100 μ g の native PTN を添加した場合、ALP 活性、カルシウム含有量ともに対照群に比べ著しく減少した。もっとも骨形成を増強した用量である 10 μ g の native PTN 単独の群については ALP 活性、カルシウム含有量ともに低い値を示した。10 μ g の rhPTN 添加群では、ALP 活性、カルシウム含有量ともに対照群に比べて有意に増加した。

組織学的観察においては rhBMP-2 単独の対照群では骨と軟骨の形成が観察されるのに対し、10 μ g の native PTN、rhPTN 添加において骨のみが観察された。特に 10 μ g の native PTN 添加群においては、骨は梁状に連なる様子が見られ、骨の旺盛な形成が観察された。100 μ g の native PTN 添加では骨・軟骨共に観察されず、生化学的分析の結果と一致した。アルシアンブルー染色による軟骨の観察においても、rhBMP-2 単独の対照群では軟骨が見られるのに対し、その他の群においては軟骨は見られなかった。

以上の結果より生体内において 10 μ g の PTN 添加で骨形成は増強され、これより少量又は多量では阻害の傾向が見られた。

【考察】

rhBMP-2 誘導異所性骨形成量は、10 μ g の native PTN 又は rhPTN 添加では増加し、50、100 μ g の native PTN 添加では減少した。rhBMP-2 誘導異所性骨形成における PTN の増強、阻害効果は用量に依存的であると言える。

PTN による骨形成増強のメカニズムは現段階では明らかではないが、血管内皮細胞や毛細血管細胞の刺激による可能性が最近の報告から示唆される。rhBMP-2 誘導骨形成において担体の構造の違いが骨又は軟骨を優先的に誘導することは報告されているが、その機序として血管形成の差が考えられている。本研究で用いた担体・ガラス線維膜は、その構造より血管誘導が生じに

く、骨形成は減少し軟骨形成は旺盛となることが報告されている。血管を誘導しにくい故に軟骨を優先的に誘導する担体に、血管新生、血管侵入を刺激する PTN を添加することにより血管が誘導され、骨形成が促進したことが推測される。

また、PTN は軟骨細胞や骨芽細胞に作用することも明らかになっている。軟骨細胞の成熟度による PTN の効果発現に違いがあること、成熟した軟骨細胞への応答は用量依存的であることが報告されている。また、PTN のレセプターとして N-シンデカンやプロテインチロシンホスファターゼが明らかになっているが、骨芽細胞やその前駆細胞の細胞膜上のこれらレセプターとの関係と同一細胞上に存在する BMP-2 レセプターとのシグナルの相互作用による調整の可能性も考えられる。

以上のように、*in vivo* における異所性骨形成へ PTN が及ぼす影響の機序について今後一層の追究が必要とされる。PTN のように骨に含有される微量な非コラーゲン性タンパク質の機能を知ることは今後の骨組織の再生へ応用する上で意義深いことと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 畑 昇
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Pleiotrophin regulates bone morphogenetic protein (BMP) -induced ectopic osteogenesis

(骨形成タンパク質による異所性骨形成へのプレイオトロフィンの効果)

審査は田村、鈴木および大畑審査委員全員が出席のもとに、まずは論文提出者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、提出論文の内容に関する審査委員の口頭試問を行った。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

1. 提出論文の要旨

プレイオトロフィン (PTN) は高リジン含有強塩基性タンパク質である。主に脳・子宮・骨・軟骨・類骨・象牙前質に分布し、神経突起伸長活性、細胞の分化増殖促進活性、骨細胞の分化促進活性、血管新生活性、I型コラーゲンとの強い親和性を有し、発生、増殖、分化に関わるヘパリン結合性成長因子である。我々は成牛骨粉からタンパク質としてPTNを抽出・精製し、PTNが骨芽細胞において増殖を促進、かつ分化にも関与することを明らかにしたが、詳細はいまだ明らかではない。そこで本研究では、生体内において骨形成タンパク質 (BMP) により誘導された異所性骨形成に対し PTN がどのような効果を示すか検討した。

成牛骨粉より得た脱灰液を中和し、抽出したPTNを3段階のクロマトグラフィーにより精製 (native PTN)、ウエスタンブロッティング法にて確認した。対照群を rhBMP-2 1.2 μ g 単独とし、実験群を 5、10、50、100 μ g の native PTN と rhBMP-2 1.2 μ g の各群、5、10 μ g のリコンビナントヒトPTN (rhPTN) と rhBMP-2 1.2 μ g の各群、10 μ g の native PTN 単独の群として、それぞれをガラス線維膜に含浸、凍結乾燥し、4週齢ウイスター系雄ラット背部皮下に埋入した。3週間後、屠殺、埋入物を摘出し、生化学的分析としてアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、カルシウム含有量の測定と組織学的観察 (ヘマトキシリン・エオジン染色、アルシアンブルー染色) を行った。

3段階のクロマトグラフィーを経て、native PTN は精製された。対照群と比較して 10 μ g の rhPTN、native PTN 添加において ALP 活性、カルシウム含

有量ともに増加の傾向が見られた。特に native PTN においてカルシウム含有量は対照群の 1.6- 1.7 倍を示した。一方、100 μg の native PTN を添加した場合、ALP 活性、カルシウム含有量ともに対照群に比べ著しく減少した。native PTN のみのものについては ALP 活性、カルシウム含有量ともに低い値を示した。組織学的観察においては対照群では骨と軟骨が観察されるのに対し、10 μg の rhPTN、native PTN 添加において骨のみが観察された。100 μg の native PTN 添加では骨・軟骨共に観察されず、生化学的分析と一致した。

以上の結果より生体内において 10 μg の PTN 添加で骨形成は増強され、これより少量又は多量では阻害の傾向が見られ、PTN が BMP-2 誘導骨形成においてこれを調節する因子の一つであると考えられる。

2. 審査委員からの質問

- (1) PTN のサブタイプとレセプターへの結合様式について
- (2) PTN が骨形成に対して至適濃度で奏効し、高用量になると阻害に働くメカニズムについてどのように考察するか
- (3) PTN 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスの特徴について
- (4) PTN が骨形成促進に働く機序を血管新生や軟骨細胞に対する作用からどのように考察できるか
- (5) PTN の同所性の骨誘導に関する考察について
- (6) PTN の臨床的な活用法とその展望について

以上のような質問について、論文提出者はそれぞれに的確に解答し、考察・展望について明確に言及した。

論文提出者は、PTN の骨形成に対する効果の報告が少ない中で、特に生体内における効果を検討した。本研究のような基礎的見解を今後の臨床へ応用する展望についても深く考察しており、将来性の点においても評価できる。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいと認めた。