博士（歯　学）　宮　田　康　一

学位論文題名

骨形成蛋白質による異所性骨形成へのビタミンCの影響

(Ascorbic acid regulates bone morphogenetic protein (BMP) -induced ectopic osteogenesis)

学位論文内容の要旨

【緒言】

ビタミンCは，コラーゲンのプロリン残基が粗面小胞体で水酸化される過程で，抗酸化剤として作用し，プロリン水酸化酵素の酵素活性を安定化する．このプロリン水酸化酵素が不活化した場合，コラーゲンは細胞内で三重鎖構造を形成できず分解するため，生体内においてビタミンC欠乏状態が継続すると，粗面小胞体の発達やコラーゲン合成が阻害され，細胞間基質のコラーゲン線維が減少する．ビタミンCの骨組織へおよぼす影響については，臨床的に病的骨折や骨量の減少，さらには 老人の骨粗鬆症に関与する可能性が示唆されている．また，実験的にも，ビタミンCの欠乏は骨組織の修復や改造に障害を与えることが示唆されているが，その詳細な作用機序については未だ不明な点が多い．

そこで今回，未分化間葉細胞が骨形成蛋白質 (BMP) によって軟骨芽細胞もしくは骨芽細胞に分化誘導される場合，ビタミンCがその分化誘導過程におよぼす作用の詳細について明らかにするために，L-gulonolactone oxidase 遺伝子が欠損しており，ビタミンC欠乏症状を示す *od/od* ラットを用いて BMP による異所性骨形成過程を病理組織学的，組織計量学的および生化学的に検索した．

【材料と方法】

実験動物には，生後6週齢の雄性 Wistar 系 ODS (Osteogenic Disorder-Shionogi) ラット30匹を用いた．実験群は*od/od*ラット (15匹) とし，対照群は正常遺伝子を保持している+/+ラット (15匹) とした．

実験では，不溶性骨基質 (IBM) 20 mg に rhBMP-2 (2μg/30μl)を含浸したペレット体をラットの背部皮下に埋入した。

ペレット体埋入1, 2, 3, 4週後に各群3匹づつ安楽死させ，摘出した埋入物を組織検索用

および生化学分析用の試料とした.

組織検索用の試料は, 10%中性緩衝ホルマリンにて固定後, 10%EDTA (pH7.4, 4℃) で脱灰, 通法に従いパラフィン包埋し, 5 μmの連続切片を作製した. 染色法はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色, アザン・マロリー (AM) 染色, アルシアンブルー染色, トルイジンブルー (pH7.0) 染色を用いた. これらの脱灰標本は, 光学顕微鏡を用いて, 骨の性状および骨の形成過程について病理組織学的に検索した.

生化学分析では, ペレット体埋入 2, 4 週後の摘出物を試料とし, 各埋入物におけるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性, カルシウム含有量, II型コラーゲン含有量について検索した.

なお, *od/od* ラットに関しては生後4週よりL-アスコルビン酸 3 mg を週に一度経口投与し, 慢性ビタミンC欠乏状態を維持した.

【結果】

実験期間中のODSラットの体重は, 対照群では経時的に増加していたが, 実験群では生後7週目以降体重の増加は認められなかった.

血清中ビタミンC含量は, 対照群では実験期間を通じほぼ一定の値を値を示していたが、実験群では実験期間を通じて検出基準以下でビタミンC欠乏状態が維持されていた.

組織学的には, 対照群では, 術後 1 週目において, IBM 表面での旺盛な軟骨新生および軟骨内骨化がみられ, 2週目にはIBM周辺での骨芽細胞による活発な骨新生が観察された. また, 4週目には新生骨骨組織に骨髄様の構造がみられるようになった.

一方, 実験群では, 術後1週目にはIBM表面での軟骨新生は対照群に比し著しく減弱しており, 軟骨細胞の肥大化は阻害され, 2 週目には IBM 周辺での骨新生は障害され, その新生骨辺縁にみられる骨芽細胞は萎縮し, 数も少なかった. また, 3 週目には IBM 周辺において骨新生が認められたが, 骨組織にみられる封入細胞は少なく, その辺縁に認められる骨芽細胞も 2 週と同様に萎縮し, 数も少なく, 骨新生量は対照群に比し少なかった. その後, 4 週目には IBM 周辺に 3 週と同様の骨組織が認められたが, 辺縁には殆ど骨芽細胞はみられず, 骨新生の増加傾向も認められなかった.

組織計量学的には, 対照群では軟骨新生量は術後 1〜2 週目にかけて急激に減少した. 一方, 実験群では術後 1 週目の軟骨新生量は対照群に比し著しく少ないものの, 術後 2 週目では対照群に比し有意に多くの軟骨新生が認められた. また, 骨新生量については, 組織学的に, 実験群において術後 1,2,3,4 週目で, 対照群に比し著しく少なく, 組織計量学的にも, 形成された骨組織の量は, 対照群との間に術後 1,2,3,4 週目で有意な差が認められた.

生化学的には，実験群では対照群と比較して，2 週目では ALP 活性が約 80%減少し，カルシウム含有量は殆ど認められなかった．また，Ⅱ型コラーゲン含有量は，実験群が対照群より多い傾向を示した．

【考察】

組織学的検索では，ビタミン C 欠乏状態において軟骨内骨化は阻害され，骨芽細胞の数は少なく，骨形成過程も障害されていたが，このような所見は rhBMP-2 による異所性骨形成過程にはビタミン C が関与していることを示すものと考えられた．

組織計量学的には，ビタミン C 欠乏状態において，軟骨新生および軟骨内骨化が阻害されていたが，このような所見は rhBMP-2 による未分化間葉細胞から軟骨細胞への分化および軟骨細胞の肥大化が阻害されたことによるものと推察された．また，骨新生も著しく抑制されていたが，このような所見は未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化および骨芽細胞の機能が抑制されたため，骨基質形成にも障害が生じたことを示唆するものと考えられた．

生化学的には，術後 2，4 週目では，実験群における ALP 活性およびカルシウム含有量は対照群に比し著しく低い値を示していたが，このような所見は，ビタミン C 欠乏状態において未分化間葉細胞から分化する骨芽細胞が少ないため，摘出物における ALP 活性が低く，また新生骨辺縁の骨芽細胞によって産生されるコラーゲンが少なく，産生したコラーゲン線維の成熟も障害されるため，骨基質へのカルシウム沈着が阻害されたことを示すものと考えられた．また，術後 2 週目におけるⅡ型コラーゲン含有量は，実験群が対照群より多い傾向を示していたが，このような所見は，ビタミン C 欠乏状態において，軟骨細胞の肥大化が阻害され，軟骨内骨化の障害が生じていることを示すものと推察された．

【結論】

in vivo においてビタミン C が欠乏した場合，IBM-rhBMP-2 複合体による異所性骨形成過程は障害されることが明らかになった．骨形成の障害には，ビタミン C 欠乏状態による未分化間葉細胞の骨，軟骨形成細胞への分化，増殖抑制に基づく骨，軟骨新生の障害が大きな要因となっていることを示唆するものと考えられた．

学位論文審査の要旨

主 査　教 授　森 田　学
副 査　教 授　向 後 隆 男
副 査　教 授　鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

骨形成蛋白質による異所性骨形成へのビタミンCの影響

(Ascorbic acid regulates bone morphogenetic protein (BMP) -induced ectopic osteogenesis)

審査は，3 名の審査員を一同に介して行われた．試験は口頭試問の形式で，学位申請論文の内容とそれに関連した学科目について行われた．以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる．

ビタミン C の骨組織へ及ぼす影響については，臨床的および実験的に多くの知見が蓄積されているが，その詳細な作用機序については未だ不明な点が多い．本研究では，未分化間葉細胞が骨形成蛋白質 (BMP) によって軟骨芽細胞もしくは骨芽細胞に分化誘導される場合，その分化誘導過程におけるビタミン C の作用について明らかにすることを目的とした．

実験動物には，生後 6 週齢の雄性 Wistar 系 ODS ラット 30 匹を用いた．実験群は L-gulonolactone oxidase 遺伝子が欠損しており，ビタミン C 欠乏症状を示す *od/od* ラット (15 匹)，対照群は正常遺伝子を保持している+/+ラット (15 匹) とし，2 群間で BMP による異所性骨形成過程を病理組織学的，組織計量学的および生化学的に比較した．

実験では，不溶性骨基質 (IBM) 20 mg に rhBMP-2 (2 μg/30 μl) を含浸したペレット体をラットの背部皮下に埋入した．ペレット体埋入 1, 2, 3, 4 週後に各群3 匹づつ安楽死させ，摘出した埋入物を組織学的検索用および生化学的分析用の試料とした．組織学的検索用の試料は，10%中性緩衝ホルマリンにて固定後，10%EDTA (pH7.4, 4℃) で脱灰，通法に従いパラフィン包埋し，5 μmの連続切片を作製した．染色法はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色等を施し，骨の性状および骨の形成過程について病理組織学的に検索した．生化学的分析では，ペレット体埋入 2, 4 週後の摘出物を試料とし，各埋入物におけるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性，カルシウム含有量，Ⅱ型コラーゲン含有量について検索した．

なお，*od/od* ラットに関しては生後4 週より L-アスコルビン酸 3 mg を週に一度経口投与し，慢性ビタミン C 欠乏状態を維持した．

組織学的には，対照群では，術後 1 週目において，IBM 表面での旺盛な軟骨新生および軟骨内骨化がみられ，2 週目にはIBM 周辺での骨芽細胞による活発な骨新生が観察された．また，4 週目には新生骨骨組織に骨髄様の構造がみられるようになった．一方，実験群では，術後 1 週目には IBM 表面での軟骨新生は対照群に比し著しく減弱しており，軟骨細胞の肥大化は阻害され，2 週目には IBM 周辺での骨新生は障害され，その新生骨辺縁にみられる骨芽細胞は萎縮し，数も少なかった．また，3 週目には IBM 周辺において骨新生が認められたが，骨組織にみられる封入細胞は少なく，その辺縁に認められる骨芽細胞も 2 週と同様に萎縮し，数も少なく，骨新生量は対照群に比し少なかった．その後，4 週目には IBM 周辺に 3 週と同様の骨組織が認められたが，辺縁には殆ど骨芽細胞はみられず，骨新生の増加傾向も認められなかった．

組織計量学的には，対照群では軟骨新生量は術後 1～2 週目にかけて急激に減少した．一方，実験群では術後 1 週目の軟骨新生量は対照群に比し著しく少ないものの，術後 2 週目では対照群に比し有意に多くの新生軟骨が認められた．また，骨新生量については，実験群において術後 1,2,3,4 週目で，対照群に比し著しく少なく，どの週でみても，対照群との間に有意な差が認められた．

生化学的には，実験群では対照群と比較して，2 週目では ALP 活性が約 80％減少し，カルシウムの含有は殆ど認められなかった．また，II型コラーゲン含有量は，実験群が対照群より多い傾向を示した．

以上の結果から，ビタミン C が欠乏した場合，IBM-rhBMP-2 複合体による異所性骨形成過程は遅延することが明らかになった．骨形成の遅延には，ビタミン C 欠乏状態による未分化間葉細胞の骨，軟骨形成細胞への分化，増殖抑制に基づく骨，軟骨新生の障害が大きな要因となっていることを示唆するものと考えられた．

論文の審査にあたっては各審査委員と申請者の間で，本論文の内容とその関連事項について質疑応答がなされた．設問は未分化間葉細胞を対象とした組織学的研究を行うことの意義，病理組織学的・生化学的検索法，本研究と予防歯科領域との関連について詳細にわたって行われ，申請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．本研究で得られた基礎的実験の手法を臨床応用する展望についても深く考察しており，将来性の高いものと評価された．従って本論文申請者は博士（歯学）にふさわしいものと認められた．