

# ラットにおける Bone Morphogenetic Protein-2 による 異所性骨形成に対するプロプラノロールの影響

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

骨は骨芽細胞と破骨細胞の分化と機能のバランスにより骨形成と骨吸収を繰り返す、恒常性を保っている組織である。この骨リモデリング現象は、活性型ビタミンD、副甲状腺ホルモン、カルシトニンなどの全身性ホルモンの他、骨芽細胞の分化に重要な Bone morphogenetic protein (BMP), Transforming growth factor- $\beta$ , Insulin-like growth factor などのサイトカインによっても調節されていることが知られている。最近、これらの制御因子のほかにレプチンが全身の骨量を調節していることが報告された。レプチンは1994年、Friedmanらにより通常のマウスの2倍以上に肥満する obese 突然変異遺伝性肥満マウスの原因遺伝子として単離同定された。このレプチンは、146 アミノ酸残基よりなり脂肪細胞から分泌される代表的なアディポカンと称されるホルモンの一つである。主に視床下部弓状核および腹内側核に作用して摂食とエネルギー代謝の亢進をもたらす、肥満や体重増加を抑制する機能を有すると考えられている。

このレプチンを欠損した ob/ob マウスは、肥満に加え全身の骨量が増加していることが知られている。この骨量の調節は、液性因子によるものでなく、視床下部腹内側核を介しエピネフリンならびにノルエピネフリンを神経伝達物質とする交感神経および骨芽細胞の細胞膜上の  $\beta_2$  受容体が関与していると報告されている。しかしながら、局所において交感神経系ならびに  $\beta$  受容体によって骨形成が調節されるか否か明らかではない。そこで、本研究では BMP-2 によるラット異所性骨誘導実験系を用いて、 $\beta$  受容体遮断薬の一つであるプロプラノロールが異所性骨形成に及ぼす効果について調べ、局所における交感神経系ならびに  $\beta$  受容体の骨形成における役割を明らかにすることを目的とした。

### 【材料と方法】

プロプラノロールは局所投与と全身投与に分けて実験を行った。局所投与の場合、担体として繊維性ガラス膜 (Fibrous glass membrane, FGM) を使用し、プロプラノロールならびにヒト組み換え BMP-2、ヒト組み換え Fibroblast growth factor (FGF)-2 を含浸しペレット体として凍結乾燥後、4週齢の Wistar-King AH 系雄ラットの背部皮下に埋入した。1週および2週後にペレット体を摘出し、軟X線写真撮影、カルシウム含有量、アルカリフォスファターゼ活性、RT-PCR による mRNA 量の測定、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色ならびに鍍銀染色を

行った。プロプラノロールの全身投与は、ラット1匹あたり100 µgを毎日1回3週連続して腹腔内に注射した。全身投与1週後にFGM担体にBMP-2ならびにFGF-2を含浸しラット背部皮下に埋入した。埋入2週後に摘出し、カルシウム含有量ならびにアルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。

### 【結果と考察】

FGMを担体としてFGF-2をBMP-2とともにラット皮下に埋入すると内軟骨性骨化が促進されることが報告されている。そこで担体としてFGMを用いBMP-2 0.8 µgとFGF-2 0.1 µgを加え、さらにプロプラノロール10 µgを添加と無添加のペレット体を作製し、プロプラノロールのラット異所性骨形成に及ぼす効果について検討した。プロプラノロールを添加した場合において、埋入2週後では、X線不透過度はプロプラノロールを添加しなかった場合に比較して高くなり、カルシウム含有量も大きな値となった。アルカリフォスファターゼ活性についてはプロプラノロールの添加の有無による有意な差は認められなかった。さらにペレット体内部にどのような組織が形成されたかを調べるためにHE染色を行い観察した。埋入1週後のペレット体においては、プロプラノロールの添加、無添加に関わらずFGM内部に軟骨様の組織が観察された。プロプラノロールを添加し、埋入2週後に摘出したペレット体では、プロプラノロールを添加していない場合と比べて、多くの骨様の組織が観察された。摘出したペレット体中の骨芽細胞の存在について明らかにするために、埋入2週後に摘出したペレット体よりmRNAを抽出し、 $\alpha 1(I)$ collagen, オステオカルシンならびにRunx2 mRNAの発現についてRT-PCR法を用いて調べた。ペレット体中のこれらのmRNA発現量は、プロプラノロールを添加した場合の方が、無添加の場合と比較して多かった。

以上の結果はFGMを担体としてBMP-2とFGF-2を用いた場合である。これまで異所性骨形成を誘導することが知られているBMP-2のみを用いた場合、プロプラノロールの添加がどのような効果を及ぼすかを調べた。BMP-2 0.8 µgにプロプラノロール10 µgを含浸したペレット体を作製し、ラット皮下に埋入した。埋入1週、2週いずれの時期においてもX線不透過像は認められず、カルシウム含有量においてもプロプラノロールの添加の有無による有意な差は認められなかった。

次にプロプラノロールの投与方法の違いによる影響を調べた。プロプラノロールを腹腔内注射により全身に投与した場合、局所投与で確認された埋入2週後におけるカルシウム含有量の増加は認められなかった。BMP-2とFGF-2を含浸したFGMをラット皮下に埋入すると1週後には、軟骨が誘導され続いて骨形成が開始される。この時点で、全身投与されたプロプラノロールの血中濃度が、骨芽細胞上に発現している交感神経系 $\beta$ 受容体に結合する十分量に達していない可能性が考えられた。

神経線維を特異的に染色する鍍銀染色法を用いて、ペレット体中の神経線維の存在を検索した。FGM担体にBMP-2とFGF-2を添加し埋入2週後に摘出したペレット体では、骨芽細胞様細胞の周囲に自由神経終末と推察される組織が観察された。BMP-2のみを添加した場合においては鍍銀染色法によって染色される細胞は観察されなかった。また、BMP-2とFGF-2を添加したペレット体において神経組織のマーカータンパク質であるTrkB, neural cell adhesion molecule,

growth-associated protein-43 および  $\beta$ -2 adrenergic receptor の mRNA の発現量は BMP-2 のみを添加した場合よりも多かった。異所性に形成された骨組織においても組織内に神経終末が分布していることおよびプロプラノロールにより異所性骨形成が促進されたことから、交感神経系ならびに  $\beta$  受容体を介する骨芽細胞の機能の制御機構が、異所的に誘導された骨組織においても存在しうる可能性が示された。

#### 【結論】

本研究において、異所性に誘導された骨形成はプロプラノロールの添加により増加することを見出した。また、本研究により、 $\beta$  受容体ならびに交感神経系を介した骨形成の調節機構が全身性のみならず局所においても存在している可能性が明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 山 敦 郎

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

## ラットにおける Bone Morphogenetic Protein-2 による 異所性骨形成に対するプロプラノロールの影響

審査は、まず論文提出者に対して提出論文の内容の要旨を説明させ、論文の内容について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。

論文提出者は、局所における交感神経系ならびに $\beta$ 遮断薬投与によって骨形成が調節されるか否かを明らかにするため、Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 によるラット異所性骨誘導実験系を用いて検討した。

### [材料と方法]

プロプラノロールは局所投与と全身投与に分けて実験を行った。局所投与の場合、担体として繊維性ガラス膜 (FGM) を使用し、プロプラノロールならびにヒト組み換え BMP-2、ヒト組み換え Fibroblast growth factor (FGF)-2 を含浸しペレット体として凍結乾燥後、4 週齢の Wistar-King AH 系雄ラットの背部皮下に埋入した。1 週および 2 週後にペレット体を摘出し、軟 X 線写真撮影、カルシウム含有量、アルカリフォスファターゼ活性、RT-PCR による mRNA 量の測定、HE 染色ならびに鍍銀染色を行った。プロプラノロールの全身投与は、ラット 1 匹あたり 100  $\mu$ g を毎日 1 回 3 週連続して腹腔内に注射した。全身投与 1 週後に FGM 担体に BMP-2 ならびに FGF-2 を含浸しラット背部皮下に埋入した。埋入 2 週後に摘出し、カルシウム含有量ならびにアルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。

### [結果と考察]

FGF-2 と BMP-2 を含浸したペレット体においては、埋入 2 週後の埋入ペレット体のカルシウム含有量ならびに X 線不透過度は、プロプラノロールの添加により増加した。また、摘出した埋入ペレット体中の  $\alpha 1(I)$ procollagen, オステオカルシンならびに Runx2 の mRNA 量は、プロプラノロールを添加すると、添加しない場合に比べて発現量は多かった。組織学的にも、埋入 2 週後には、プロプラノロールを添加すると、添加しない場合に比べて豊富な骨様の組織が観察された。他方、同様の実験系において FGF-2 を加えず BMP-2 のみを用いた場合では、プロプラノロールの添加によるこれらの効果は認められなかった。また、腹腔内にプロプラノロールを連日 100  $\mu$ g/day 3 週間連続投与し同様に埋入実験を行ったが、

ペレット体のカルシウム含有量ならびにアルカリフォスファターゼ活性に変化はみられなかった。BMP-2 と FGF-2 を含浸した FGM をラット皮下に埋入すると 1 週後には、軟骨が誘導され続いて骨形成が開始されるが、この時点で全身投与されたプロプラノロールの血中濃度が、骨芽細胞上に発現している交感神経系 $\beta$ 受容体に結合する十分量に達していない可能性が考えられた。

神経線維を特異的に染色する鍍銀染色法においては、FGM 担体に BMP-2 と FGF-2 を添加し埋入 2 週後に摘出したペレット体では、骨芽細胞様細胞の周囲に自由神経終末と推察される組織が観察された。BMP-2 のみを添加した場合においては鍍銀染色法によって染色される細胞は観察されなかった。また、BMP-2 と FGF-2 を添加したペレット体において神経組織のマーカータンパク質および  $\beta$ -2 adrenergic receptor の mRNA の発現量は BMP-2 のみを添加した場合よりも多かった。異所性に形成された骨組織においても組織内に神経終末が分布していることおよびプロプラノロールにより異所性骨形成が促進されたことから、交感神経系ならびに $\beta$ 受容体を介する骨芽細胞の機能の制御機構が、異所的に誘導された骨組織においても存在しうる可能性が示された。

#### [結論]

異所性骨形成部位においても、交感神経系もしくは $\beta$ 受容体を介した骨形成の制御が存在している可能性を示唆するものと考えられた。

以上の要旨説明に引き続き質疑応答を行った。

主な質問事項は以下のとおりである。

1. FGF-2 を添加した意義とその効果。
2. FGF-2 の骨芽細胞に対する影響の可能性。
3. FGM 担体における FGF-2 を保持している期間。
4. 実験結果と考察について。
5. Ca 含有量とアルカリフォスファターゼ活性の結果の相違。
6. 全身投与における実験的手技。
7. 神経マーカータンパク質について。

論文提出者はいずれにも明快な回答と説明をし、本論文の内容に関係のある事項に対しても明確な知識を有していた。

本研究は、異所性に誘導された骨形成がプロプラノロールの添加により増加することを明らかにした。これは異所性骨形成部位における交感神経系もしくは $\beta$ 受容体を介した骨形成の制御のメカニズムについて、分子生物学的解明の可能性を示唆している。さらに今後の展望に関してもしっかりと研究立案をもっており、将来性の点においても高く評価されるものであった。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与にふさわしいものと認めた。