

氏名	完 山 学
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1588号
学位授与の日付	平成9年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	部分精製骨形成タンパク質による異所性骨誘導過程における骨基質タンパク遺伝子の発現に関する研究
論文審査委員	教授 滝川正春 教授 杉本朋貞 教授 永井教之

学位論文内容の要旨

【緒言】

顎口腔領域で臨床応用が期待されている骨形成タンパク質（Bone morphogenetic protein, 以下BMP）をラット背部皮下に埋植した際に誘導される骨様組織の骨化過程には内軟骨性骨化に類似した過程と、膜性骨化に類似した過程が存在すると報告されている。内軟骨性骨化に類似した過程における研究はこれまでに数多くなされているが、膜性骨化に類似した過程についての研究はほとんどない。本研究においては、ウシ骨由来の部分精製BMPと生体材料として用いられているI型アテロコラーゲンの複合体による、ラット背部皮下における異所性の膜性骨化に類似した直接的な骨形成過程を組織学的に明らかにした。また、その形成過程における骨基質タンパク（I型コラーゲン、オステオネクチン、オステオポンチン）の経時的な遺伝子発現様式を検索した。

【材料および方法】

材料：脱灰したウシ骨粉から4Mグアニジンにて骨タンパクを抽出し、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーで精製し、部分精製BMPとした。このBMPをI型アテロコラーゲン（高研）と混合、凍結乾燥し、複合体として埋植に用いた。

方法：実験動物は、4週令Wistar系雄性ラット35匹を使用した。ラットの背部皮下にBMP-コラーゲン複合体と、対照としてBMPを含まないコラーゲンを埋植した。埋植後、1, 2, 3, 5, 7, 10および14日目に埋植物を摘出した。摘出物は半割し、一方をH-E染色と *in situ* ハイブリダイゼーション法に用いた。他方は、液体窒素にて急速冷凍後、total RNAを抽出し、ノーザンハイブリダイゼーション法に用いた。プローブは、ジゴキシゲニン標識したI型コラーゲン（岡大.医.二宮教授から供与）、オステオネクチン、オステオポンチン（阪大.医.野村助教授から供与）のcRNA プローブを用いた。

【結果】

1. 異所性骨誘導過程の組織学的観察と各骨基質タンパク遺伝子発現細胞の同定

埋植後3日目では、塊状の複合体周囲には未分化間葉系細胞と思われる紡錘形細胞が認められ、I型コラーゲン、オステオネクチン遺伝子の発現が認められた。複合体と紡錘形細胞群の境界部には単球・マクロファージが集簇し、それらの細胞にオステオポンチン遺伝子の発現が認められた。埋植後5日目では、複合体周囲には紡錘形細胞の増殖が認められた。また、複合体における表層部は線維状、小塊状となり、離開した担体コラーゲン間に円形細胞が認められた。I型コラーゲン、オステオネクチン遺伝子の発現はこれらの細胞に認められた。埋植後7日目では、複合体周囲には被包化組織としての線維芽細胞様細胞が認められ、これらの細胞にI型コラーゲン、オステオネクチン遺伝子の発現が認められた。複合体における表層部は、線維状、小塊状の担体コラーゲンの間隙が円形細胞により占められ、その外層では担体コラーゲンに基質の添加が認められた。また円形細胞に各遺伝子の発現が認められた。埋植後10日目では、複合体における表層部外層では担体コラーゲンを封入した基質の周囲に骨芽細胞様細胞の出現と、基質の一部に石灰化が生じていた。また、内層では円形細胞と担体コラーゲンに基質の添加が認められた。各遺伝子の発現は骨芽細胞様細胞と円形細胞に認められた。埋植後14日では複合体における表層部の内、外層に線維性骨の形成を認め、骨芽細胞様細胞と骨細胞に各遺伝子の発現が認められた。また、一部の破骨細胞と思われる多核巨細胞にオステオポンチン遺伝子の発現が認められた。

2. 異所性骨誘導過程における経時的な各骨基質タンパク遺伝子発現レベルの変化

I型コラーゲンならびにオステオネクチン遺伝子の発現は、埋植後1日より認められその後14日目まで認められた。それに対して、オステオポンチン遺伝子の発現は埋植後1日より認められたがその発現量はごく僅かであった。しかし、埋植後7日目で強い発現を認め、10、14日目においても発現が認められた。

【考察および結論】

1. ウシ骨由来部分精製BMP-コラーゲン複合体による直接的な異所性骨形成では、担体コラーゲン表面に基質が直接添加され骨形成が生じることが示された。

2. 部分精製BMPによって誘導された未分化間葉系細胞は、骨芽細胞へ分化する細胞と複合体を被包化するための線維芽細胞へと分化することが示された。また、骨芽細胞の分化と骨形成は複合体における表層部の外層から内層へ進行していくことが示された。

3. 埋植後早期における単球・マクロファージと、それらが発現するオステオポンチン遺伝子が、その後の骨芽細胞分化のトリガー因子であることが示唆された。

4. ウシ骨由来部分精製BMPによる直接的な骨形成過程における各骨基質タンパク遺伝子の発現様式は、膜性骨化に類似していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は、顎口腔領域での臨床応用が期待されている骨形成タンパク質（以下 BMP）をラット背部皮下に埋植した際に誘導される骨様組織の直接的な形成過程を組織学的に明らかにし、その形成過程における、骨基質タンパク（I型コラーゲン、オステオネクチン、オステオポンチン）の遺伝子発現様式の検討を行ったものである。

材料と方法で、BMPはウシ骨より抽出・精製した部分精製物であり、担体として、ウシ真皮由来のI型アテロコラーゲンを用い、両者を複合化することで埋植に用いている。形成過程における組織学的な変化はH-E染色にて観察を行い、また、各骨基質タンパク遺伝子の発現様式は、ノーザンハイブリダイゼーション法と、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検索を行っている。

結果として、BMP-I型コラーゲン複合体のラット背部皮下における異所性の直接的な骨形成過程を以下のように示している。1) 単球・マクロファージの複合体への遊走、2) 未分化間葉系細胞の骨芽細胞と線維芽細胞への分化、3) 担体コラーゲンへの基質添加と石灰化。そして、骨芽細胞分化と骨形成は複合体表層部の外層から内層へ進行していくことが示されている。また、各骨基質タンパク遺伝子の発現様式は、文献的な考察から膜性骨化に類似するものであると結論している。

以上から、ウシ骨由来部分精製 BMP-I型コラーゲン複合体のラット背部皮下における異所性の直接的骨形成過程と、各骨基質タンパク遺伝子の発現様式が明らかとなった。これは今後の BMP の臨床応用に役立つ基礎的な業績であると考えられる。従って、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。