

氏名	辻 極 秀 次
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2167号
学位授与の日付	平成13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	rhBMP-2/コラーゲン固定化によるST2細胞への影響とシグナル伝達系遺伝子の発現
論文審査委員	教授 鈴木 一臣 教授 滝川 正春 教授 永井 教之

学位論文内容の要旨

【研究目的】

BMP-2は骨誘導蛋白質として、将来的にも臨床応用が期待されている。当教室では現在までに、rhBMP-2の骨誘導に関して *in vivo* による基礎的研究を行ってきた。その結果、rhBMP-2の担体として I 型アテロコラーゲンが操作性、生体親和性の面から優れた生体材料であることが示された。さらに、rhBMP-2とコラーゲンのペプチド結合による固定化法を開発し、動物実験で高い骨誘導を認めることを明らかにしているが、細胞への影響は不明である。

一方、BMPは標的細胞のレセプターと結合してシグナルを伝達するが、BMPのシグナル伝達に係わる遺伝子については、SmadファミリーがBMPの細胞内シグナル伝達系に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、培養細胞におけるrhBMP-2と細胞内シグナル伝達系遺伝子を総合的に解析した研究、さらに固定化rhBMP-2の細胞内シグナル伝達に関する研究報告は見られない。

そこで、本研究ではrhBMP-2/コラーゲン固定化による細胞への影響、およびシグナル伝達系遺伝子発現の変化、また、今回用いたコラーゲンとrhBMP-2の化学的固定化の同定について検索し、固定化rhBMP-2におけるマトリクリン効果について検討した。

【材料および方法】

rhBMP-2/コラーゲン試料の作製

本研究にはrhBMP-2（山之内製薬より供与）を用いた。担体としてサクシニル化 I 型アテロコラーゲン（高研より供与）を用いた。

- ・固定化処理群：コラーゲン溶液にWater-Soluble Carbodiimid (WSC)（終濃度1mg/ml）を添加し2時間4℃で前反応を行った。その後rhBMP-2を添加24時間4℃で固定化反応を行なった。

- ・非固定化処理群：WSC非添加の溶液で固定化群と同様に処理を行った。

実験I. rhBMP-2/コラーゲン固定化の同定

rhBMP-2/コラーゲン固定化の同定は、上記の方法により固定化群、非固定化群試料を作

製した後、SDS-PAGE、抗BMP-2抗体を用いたWestern Blot法で行った。

実験II. rhBMP-2/コラーゲン固定化によるST2細胞への影響

実験II-1. ALP活性の経時的変化：ST2培養細胞に固定化群、非固定化群試料を添加し1, 3, 5, 7日後のAlkaline Phosphatase (ALP) 活性の経時的変化を観察した。

実験II-2. rhBMP-2濃度変化時のALP活性：ST2細胞に固定化群、非固定化群試料をrhBMP-2濃度 0,100,200,500,750,1000ng/mlとなるように添加、5日後のALP活性を測定した。

実験III. 定量的RT-PCRによる遺伝子発現の検索

ST-2細胞に固定化群、非固定化群試料を添加し、1, 3, 6, 12, 24, 48時間後に細胞を回収し、total RNAの抽出後、cDNAの合成を行った。その後、合成したcDNAを鋳型として、BMP-2, 4, BMPR-IA, BMPR-IB, 特異型Smad1, 5, 8, および抑制型Smad6, 7の各遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的RT-PCRを行い、各遺伝子の発現を観察した。

【結果】

実験I. rhBMP-2/コラーゲン固定化の同定

SDS-PAGEで固定化群に分子量の大きなバンドが確認され、同バンドは抗BMP-2抗体を用いたWestern Blotting法において検出された。また、Western Blottingで非固定化処理群のみにrhBMP-2のサブユニットに相当する分子量にバンドが認められた。

実験II. rhBMP-2/コラーゲン固定化によるST2細胞への影響

実験II-1.ALP活性の経時的変化：固定化群で5,7日目においてALP活性は非固定化群よりも増加した。

実験II-2.rhBMP-2濃度変化時のALP活性：全てのrhBMP-2濃度において固定化群は非固定化群と比較してALP活性は高値を示した。

実験III. 定量的RT-PCRによる遺伝子発現の検索

1. rhBMP-2添加前より高い発現を示すBMPR-IA, 特異型Smad1, 5は、固定化群では持続して長期にわたって発現した後、減少したのに対して、非固定化群では初期に急激な減少が認められた後、BMP-4の発現に伴って再び発現の増加が認められた。
2. rhBMP-2添加前より低い発現を示した特異型Smad8, 抑制型Smad6, 7は固定化群ではBMP添加直後より発現は増加し持続した後、減少したのに対して、非固定化群では、初期では発現はほとんど認められず、BMP-4の発現に伴って後期に発現が認められた。
3. BMP-4遺伝子の発現は固定化群では後期に発現が持続した後、減少したのに対して、非固定化群では初期に一過性に上昇後減少し、再び発現レベルの増加が認められた。

【まとめ】

rhBMP-2/コラーゲン固定化によるST2細胞への影響とシグナル伝達系遺伝子の発現を検索した結果、以下のことが明らかにされた。

1. I型アテロコラーゲンのサクシニル化は、rhBMP-2固定化の方法として有効であると考えられた。
2. rhBMP-2/コラーゲン固定化の細胞活性に対しての有効性が確認された。
3. 固定化rhBMP-2による固定化効果は細胞内シグナルの持続によってもたらされ、マトリクリン効果を示したと考えられた。

論文審査結果の要旨

骨誘導蛋白質（以下BMP-2）は異所性に骨組織を誘導する蛋白質として注目されている。rhBMP-2の基礎的研究ではrhBMP-2とコラーゲンのペプチド結合による固定化は、動物実験で著明な骨誘導を認めることが明らかにされている。しかしながら固定化rhBMP-2がどのようなメカニズムで細胞に作用し、著明な骨誘導能を生じるかについては不明である。

本研究は、rhBMP-2/コラーゲン固定化による細胞への影響、およびシグナル伝達系遺伝子発現の変化、また、実験に用いたコラーゲンとrhBMP-2の化学的固定化の同定について検索し、固定化rhBMP-2における細胞への作用について検討している。

rhBMP-2固定化の支持体には、I型コラーゲンをコラーゲン同志の結合を防ぐためサクシニル化したサクシニル化I型アテロコラーゲンをを用いた。1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Water-Soluble Carbodiimide : WSC)の脱水結合反応を利用して固定化を行っている。細胞への影響の検索はアルカリフォスファターゼの活性を測定することにより、また、BMPシグナル伝達に関わる遺伝子発現変化の検索は定量的RT-PCR法によって行った結果、以下の結論を得ている。

1. I型アテロコラーゲンのサクシニル化は、rhBMP-2固定化の方法として有効であると考えられた。
2. rhBMP-2/コラーゲン固定化の細胞活性に対しての有効性が確認された。
3. 固定化rhBMP-2による固定化効果は細胞内シグナルの持続によってもたらされたと考えられた。

これらの知見はrhBMP-2の骨誘導を生体に応用する場合に、rhBMP-2と支持体の固定化法が有効であってBMPの細胞への作用を遺伝子の発現レベルで解明した基礎的研究として価値ある研究業績である。よって申請者は博士（歯学）の学位論文の価値に足るものと認めた。