



Title	Impaired expression of non-collagenous bone matrix protein mRNAs during fracture healing in ascorbic acid-deficient rats
Author(s)	Sugimoto, Mizuo
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3143816
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	すぎもとみずお 杉 本 瑞 生
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 10 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Impaired expression of non-collagenous bone matrix protein mRNAs during fracture healing in ascorbic-acid-deficient rats (アスコルビン酸欠損ラットの骨折修復過程における非コラーゲン骨 基質タンパク質 mRNA の発現障害)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 北村 幸彦 (副査) 教 授 越智 隆弘 教 授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ヒトにおいてアスコルビン酸が欠乏すると壊血病に陥いることは古くから知られている。この壊血病ではコラーゲンの合成が阻害されるため骨組織に対する影響も重篤で、成長期の小児の骨形成の障害だけでなく骨折修復も著しく障害されることがよく知られている。しかし、その病変において起こる骨組織構成細胞の遺伝子発現異常について未だ不明である。そこで、先天的にアスコルビン酸合成酵素の一つである L-gulonolactone oxidase を欠損している Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) ラットを用いて、アスコルビン酸欠乏状態における骨折修復過程での非コラーゲン骨機質タンパク mRNA の発現を in situ hybridization を用いて検討し、アスコルビン酸の骨折修復過程に与える影響について分子病理学的な解析をおこなった。

【方法ならびに成績】

実験 1) 6 週齢雌の ODS ラット 22 匹を二群に分けた。まず、C (+) 群には 1mg/ml のアスコルビン酸を含む水を与え続けたのに対し、C (-) 群には全くアスコルビン酸を含まない水を与え 10 日間飼育した。そして、両群ともに第八肋骨を外科的に切断し、これを骨折修復モデルした。骨折後、2, 4, 7, 9, 11 日後に骨折部位を採取し、組織切片を作成し、in situ hybridization をおこなった。probe として、非コラーゲン骨基質タンパクであるオステオネクチン (ON)、オステオポンチン (OPN)、オステオカルシン (OC)、マトリックスグラタンパク (MGP) cRNA を用い、これらの遺伝子の発現を観察した。骨折 4 日後、C (+) 群では、骨折部位に肉芽組織が形成され、骨折部より離れた骨膜下に未熟骨が見られ、骨折部近傍に toluidine blue 染色陽性の軟骨組織の形成が見られた。肉芽組織内の線維芽細胞には ON、軟骨細胞では ON、MGP の mRNA が発現しており、また、未熟骨の骨梁周囲の骨芽細胞には ON の発現が見られた。一方 C (-) 群では骨膜が骨皮質より出血とともに剥離し、骨折部周囲への線維芽細胞の浸潤が乏しく、また、未熟骨、軟骨組織の形成が見られなかった。ON、OPN、OC、MGP の発現はいずれの細胞にも見られなかった。骨折後 7 日から 9 日にかけて、C (+) 群では骨折部から離れた部位より骨組織の形成がみられ、軟骨組織も増大していた。この軟骨組織内ではすべての軟骨細胞に MGP の発現が見られたのに対し、ON は増殖期軟骨細胞にのみ発現があり、OPN は骨組織に置換される石灰化前線にある軟骨細胞にのみ発現が見られた。一方、C (-) 群は骨折 7 日後より骨折部位より少し離れた部位の骨皮質に沿って、少量の toluidine blue 陽

性の軟骨組織がみられ、この軟骨細胞には MGP, ON の発現を認めたが、OPN の発現は見られなかった。また、この実験群においては骨形成は全く認めなかった。C (－) 群では骨折後11日経過した後において、軟骨組織の増大が認められず、骨形成も検出されないままであった。

実験2) C (－) 群の骨折修復不全、および遺伝子発現異常がアスコルビン酸欠乏の直接的な原因によるものか、また可逆的かについて検討するため、C (－) 群ラットに骨折後7日よりアスコルビン酸を再び与え、骨折治癒過程を観察した。C (＋) 群の骨折治癒過程と同様に骨組織の形成、および軟骨組織の形成が見られ、新たに形成された骨梁周囲の骨芽周囲の骨芽細胞には ON, OPN, OC, MGP のいずれも発現していた。

【総括】

アスコルビン酸欠損状態では、骨形成能を有する骨膜細胞による膜性骨化は全過程を通じて全く見られず、この骨膜細胞は ON, OPN, OC, MGP のいずれの発現がみられなかった。また、軟骨組織の形成も大きく遅延し、時間経過とともに増大せず、この軟骨組織は骨組織に置換されなかった。この増殖期軟骨細胞は、ON, MGP の発現をしていたが、OPN の発現は認められなかった。これらの骨形成障害は、アスコルビン酸を与えることにより、再び骨膜細胞から膜性骨化による骨形成を誘導し、骨芽細胞から ON, OPN, OC, MGP を発現させることが可能であることが示された。また、同時に軟骨細胞から新たに OPN の発現させ、軟骨内骨化による骨形成も可能にした。このことは、アスコルビン酸が骨芽細胞の前駆細胞からの ON, OPN, OC, MGP の発現を誘導し、さらに、軟骨細胞の OPN の発現も誘導することが推測され、アスコルビン酸が膜性骨化および軟骨内骨化のいずれの骨形成においても重要な因子であることを示唆している。また、アスコルビン酸欠乏状態では、膜性骨化、軟骨内骨化のいずれの過程においても OPN の発現細胞が全く見られなかった。OPN は、骨形成時の石灰化のみならず、病的な石灰化（動脈硬化、乳癌、腎結石）にも広く関与していることが知られており、アスコルビン酸欠損状態での骨折修復不全の原因の一つとして、OPN の発現の阻害が考えられる。

論文審査の結果の要旨

ビタミンC欠乏状態である壊血病では、骨成長障害、骨折修復不全をきたすことが知られている。しかし、これらの病態を分子生物学的に解析した報告は皆無である。本研究は、ビタミンC合成酵素の一つである L-gulonolactone oxidase を欠損している ODS (Osteogenic Disorder Shionogi) ラットを用いて、ビタミンC欠乏状態での骨折修復不全を分子生物学的に解析し、その結果、ビタミンC欠乏状態での骨折修復過程では、石灰化に重要なタンパクの一つであるオステオポンチンが著明な抑制を受けていることを初めて示したものである。これは、現在臨床的に問題となっている偽関節という病態を検討する上で、非常に重要な発見であり、学位論文に値するものと考えられる。