



Title	マウス骨肉腫細胞由来骨形成因子の生化学的特性
Author(s)	吉川, 秀樹
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33323">https://hdl.handle.net/11094/33323</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	よし 吉	かわ 川	ひで 秀	き 樹
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6010	号	
学位授与の日付	昭和58年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	マウス骨肉腫細胞由来骨形成因子の生化学的特性			
論文審査委員	(主査) 教授	小野 啓郎		
	(副査) 教授	坂本 幸哉	教授	和田 博

## 論文内容の要旨

### 〔目 的〕

骨芽細胞やtransformした骨芽細胞である骨肉腫細胞が保持する骨形成因子は、未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化誘導させる生物学的活性物質である。この骨形成因子は、trypsin等の蛋白分解酵素処理により容易にその骨誘導活性を失うことから、ある種の蛋白質であることが推測された。本研究で私はDunn骨肉腫に由来するBFO骨肉腫の培養細胞系を用いて、骨形成因子の生化学的特性に関し以下の検索を行った。

1. 内在性蛋白分解酵素の骨誘導活性に対する影響
2. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) の骨誘導活性に対する影響
3. disulfide結合 (S—S結合) 還元剤の骨誘導活性に対する影響

### 〔方法ならびに成績〕

骨形成因子産生骨肉腫細胞として、マウスDunn骨肉腫由来のBFO細胞を用いた。このBFO細胞の凍結乾燥末を同種マウス筋膜下に移植すると、約3週後、局所に高頻度に異所性骨形成が観察される。単層培養下のBFO細胞をHanks液により洗浄し、-20℃凍結によりdevitalizeし、使用直前に解凍し実験材料とした。

1. 内在性蛋白分解酵素の骨誘導活性に対する影響

(方法) 実験材料をpH5.0のacetate buffer, pH7.4のphosphate bufferにより37℃で各々2～6日間、無菌的にincubationし、凍結乾燥後同種ddYマウス筋膜下に移植した。移植後3週で試料を回収し、新生骨形成の有無をX線及び組織学的に検索した。

(結果) pH 5.0, pH 7.4のすべての実験群で強い骨誘導活性が検出された。このことから骨形成因子は、至適pH 5.0と考えられる細胞内ライソゾーム酵素や、至適pHを中性付近に持つ内在性蛋白分解酵素に対し、安定な蛋白質であることが示された。

## 2. EDTAの骨誘導活性に対する影響

(方法) 実験材料をpH 7.0, 0.2M, EDTA溶液により37℃で3～6日間、無菌的に incubation し、洗浄後凍結乾燥した。これを同種マウスに移植し、3週後の骨形成の有無を検索した。EDTAの効果確認のため、EDTAにより失活するアルカリホスファターゼ活性を測定した。

(結果) すべての実験群で強い骨誘導活性が検出され、金属イオンやEDTA可溶非コラーゲン性蛋白は、骨誘導活性発現に何ら関与しないことが明らかとなった。なお、アルカリホスファターゼ活性は、EDTA処理後には、その約99.8%が失われていた。

## 3. S—S結合還元剤の骨誘導活性に対する影響

(方法) 実験材料を4 M塩酸グアニジンにより溶解し、溶液中で5%β-mercaptoethanol, 20mM dithiothreitolをそれぞれ48時間、4℃で反応させた。反応後、脱イオン水に対し透析し、析出した沈澱を凍結乾燥し、同種マウスに移植し、3週後の骨形成の有無を検索した。

(結果) 塩酸グアニジンによる溶解処理のみの対照群では、強い骨誘導活性が検出されたが還元剤処理群では活性が全く検出されず、S—S結合還元剤による骨誘導活性の失活が示された。

### 〔総括〕

1. 骨形成因子は、内在性蛋白分解酵素に対し安定で、37℃、6日間の incubation後も強い骨誘導活性を保った。
2. EDTA処理による骨誘導活性の低下は認められなかった。
3. S—S結合の還元は、骨誘導活性の失活操作であり、骨形成因子構造内のS—S結合の存在は、骨形成因子の生物活性発現に重要な役割を果していることが推測された。

## 論文の審査結果の要旨

著者は、骨形成因子を産生するBFO骨肉腫細胞を株化することにより、完全な無菌状態を実現できる実験系を確立した。この実験系を用いて著者は、骨形成因子の骨誘導活性が、内在性蛋白分解酵素に対し耐性であること、disulfide結合の還元処理により、骨誘導活性が失活することから、骨形成因子内にdisulfide結合が存在することを初めて明らかにした。

以上の結果は、骨形成因子の精製、活性の調節機構の解明等へと研究を進める上に重要な所見であり、学位論文としての価値があることを認める。