



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 培養頭蓋冠細胞に対する増殖促進活性について                                                                                                                                                                                                                                                |
| Author(s)    | 清水, 信幸                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 1984, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33975">https://hdl.handle.net/11094/33975</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"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</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

【14】

|         |                                               |         |         |         |
|---------|-----------------------------------------------|---------|---------|---------|
| 氏名・（本籍） | し<br>清                                        | みず<br>水 | のぶ<br>信 | ゆき<br>幸 |
| 学位の種類   | 医                                             | 学       | 博       | 士       |
| 学位記番号   | 第                                             | 6394    | 号       |         |
| 学位授与の日付 | 昭和59年3月24日                                    |         |         |         |
| 学位授与の要件 | 医学研究科 外科系専攻<br>学位規則第5条第1項該当                   |         |         |         |
| 学位論文題目  | 培養頭蓋冠細胞に対する増殖促進活性について                         |         |         |         |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 小野 啓郎<br>(副査)<br>教授 坂本 幸哉 教授 松本 圭史 |         |         |         |

論文内容の要旨

（目的）

骨折や骨壊死の修復の際には、骨形成細胞の増殖および分化が局所的に起こる。骨組織に存在する骨形成細胞は、骨組織が損傷を受けると、増殖抑制状態から解放されるか、または、壊死組織から放出される活性物質に刺激されることにより増殖を開始すると考えられている。近年、塩酸グアニジン溶液を用いて、成熟ラット骨からラット胎児由来培養頭蓋冠細胞に対する増殖促進活性が直接に抽出され、分子量14,400～30,000の耐熱性、環元剤感受性、トリブシン感受性の蛋白質にこの活性が存在することが判明した。ヒト骨組織にも、同様に骨形成細胞の増殖を刺激する物質が保持されているのか否かを検討する目的で、ラット胎児由来培養頭蓋冠細胞に対する増殖促進活性の直接抽出および部分精製を試みた。

（方法）

- ① 抽出法：手術時摘出したヒト大腿骨頭から海綿骨を採取し、脱イオン水にて洗滌後、アセトン・エーテル処理により脱脂乾燥骨細片とした。これを0.6N塩酸-4M塩酸グアニジン溶液中で、48時間、4℃にて、脱灰と抽出を行なった。抽出上清を10mMPBS（pH7.2）に対して透析し、可溶分画を得、これを粗抽出分画とした。粗抽出分画は、脱塩後凍結乾燥し、以下の活性測定および、部分精製に用いた。
- ② 培養細胞：妊娠19-20日のラット胎児の大腿筋組織と頭蓋冠より、各々線維芽細胞と頭蓋冠細胞を酵素処理法を用いて無菌的に採取し、直径16mmのwell当たり $1.5 \times 10^5$ ヶ分注した。10%CO<sub>2</sub>存在下、10%ウシ胎児血清添加HamF-12培地中で、5～6日間培養後confluentとなった状態で

DNA 合成促進活性測定に用いた。

- ③ DNA 合成促進活性測定：confluent となった初代培養細胞を24時間血清無添加培地中で培養した後、検体を含む HamF-12 培地中で培養した。検体を添加後19時間より1時間、 $^3\text{H}$ -TdR のパルスラベルを行ない、DNA への $^3\text{H}$ -TdR のとり込みを測定し、ウシ血清アルブミン添加または、血清無添加培地中で培養した対照と比較した。
- ④ 分子ふるい：凍結乾燥した粗抽出分画100mgを4M塩酸グアニジン溶液5mlに再溶解し、同溶液にて平衡化した Sephacryl S-200 ゲルカラム(2.5×150cm)を用いて分子ふるいを行なった。得られた分画は、塩酸グアニジンを除去した後、活性測定に用いた。

#### (結 果)

- ① 0.6N塩酸-4M塩酸グアニジン溶液を用いて、ヒト骨組織から得られた粗抽出分画は、蛋白量30-240  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、培養頭蓋冠細胞のDNA合成を用量依存性に促進し、その効果は、ウシ胎児血清の3.5倍であった。またこの活性は、0.1%トリプシン、37℃、6時間処理により完全に失活し、10mMメルカプトエタノール、25℃、1時間処理によりほぼ消失するが、56℃、20分間および、100℃、10分間の熱処理には耐性であった。
- ② 分子ふるいにより、分子量25,000以上と以下に分画したところ、低分子量分画は、蛋白量10-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、頭蓋冠細胞に対し、高い用量依存性のDNA合成促進活性を示したが、筋組織由来の線維芽細胞に対しては、両分画ともに有意な活性を示さなかった。
- ③ 分子ふるいにより細分画した場合、分子量13,700のマーカー蛋白の溶出位置付近に高い比活性を示す分画が得られた。この分画は、蛋白量5-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、頭蓋冠細胞のDNA合成を用量依存性に促進し、その効果は、ウシ胎児血清の45倍であった。この部分精製分画を、SDS-PAGE で分析すると、分子量14,400と20,100のマーカー蛋白の間に泳動される数本の蛋白質バンドが検出された。

#### (総 括)

ヒト骨組織から、0.6N塩酸-4M塩酸グアニジン溶液を用いて、ラット胎児由来培養頭蓋冠細胞に対するDNA合成促進活性を抽出した。本活性は、ラット骨由来の増殖促進活性と同様に、Sephacryl S-200 ゲルを使用した分子ふるいにより部分精製可能であり、分子量25,000以下の耐熱性、環元剤感受性、トリプシン処理感受性の蛋白質に存在する。さらに本活性は、筋組織由来の線維芽細胞に対しては、低いDNA合成促進効果を示すのみであった。

これらの結果は、骨組織に保持されている増殖促進活性物質が、骨修復に際して動員され、骨形成細胞の増殖を局所的に促進することにより、骨再生に重要な役割を果たす可能性を示すものである。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト骨組織中に、分子量25,000以下の、組織特異的効果を有する増殖促進活性物質が保持されていることを明らかにしたものである。この結果は、骨組織が損傷を受けた際に、増殖促進活性物質が動員され、局所的な骨形成細胞の増殖を惹起し、骨再生を促進する可能性を示すものであり、本研究は、骨折および骨壊死の修復機構の解明に大きく寄与すると認める。