

Title	マウス骨肉腫由来骨誘導物質（骨形成因子）の精製
Author(s)	高岡, 邦夫
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35520">https://hdl.handle.net/11094/35520</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">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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	高岡邦夫
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7487 号
学位授与の日付	昭和 61 年 12 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	マウス骨肉腫由来骨誘導物質(骨形成因子)の精製
論文審査委員	(主査) 教授 小野 啓郎
	(副査) 教授 坂本 幸哉 教授 杉本 侃

### 論文内容の要旨

#### [目的]

骨形成因子(Bone morphogenetic protein, BMP)は、骨芽細胞や骨肉腫細胞によって産生される生物学的活性物質であり、未分化間葉系細胞に作用して骨形成細胞(osteoprogeniter cell)へ分化誘導する。骨形成細胞はさらに軟骨細胞や骨芽細胞へと分化する。したがって、骨形成因子によってin vivoで異所性に骨組織を誘導することが可能である。

この骨形成因子を抽出精製し、その生化学特性を明らかにすることが、この研究の目的である。

#### [方法]

##### 1. 骨形成因子産生骨肉腫

CBAマウスまたはC3Hマウスで可移植性であるDunn骨肉腫を用いた。この腫瘍の小細片(2mm×2mm×2mm)を宿主の皮下に移植すると、約4週間で1.5~2gramの腫瘍の形成がみられる。これを回収して冷凍保存したものを材料とした。

##### 2. 骨形成因子の骨誘導活性検定法

標品が水不溶性で1mg以上の場合には、遠沈ペレットとし、これを凍結真空乾燥して、同種マウス(ddYマウス)の背部筋膜下に移植した。標品が1mg以下であるか、または水可溶性の場合には、担体として精製コラーゲン(ブタ皮膚コラーゲンをペプシン消化してtelopeptideを除いたもの)を用いた。標品とコラーゲン混合液(2.4mgのコラーゲンを含む)を凍結乾燥し、これを圧縮してペレット状として、同様に移植した。移植後3週目にペレットを回収し、骨形成の有無を軟レントゲン写真と組織切片で検索した。

### 3. 比活性検定

精製過程の画分の比活性は、コラーゲン (atelocollagen) での希釈によって検索した。骨形成がみられた最大希釈率の逆数をその画分の比活性として表現した。

### 4. 精製標品の純度検定

精製画分の純度は、SDSポリアクリルアミド電気泳動法、等電点ゲル電気泳動法によって検定した。またそれらの方法によって、骨形成因子の分子量と等電点を推定した。

#### [成 績]

#### 1. 骨形成因子の精製

Dunn骨肉腫40gramをpotter型ホモジナイザーでhomogenizeし、遠沈で水不溶分画を得た。これを冷アセトン(-20°C)で脱脂し、乾燥した。この粉末を4M塩酸グアニジン(pH5.0)で4°C48時間抽出した。可溶化分画を遠沈(10000×G)で回収し、同量のアセトンを加えた。上清を回収し、0.01M緩衝液に対して透析した。透析後析出分画を回収し、20% Acetonitrileを含む0.05Mグリシン塩酸緩衝液に溶解し、食塩による塩析を行った。0.5M NaClと2M NaClの間で析出した分画を回収した。この分画を塩酸グアニジン(生化学用pH5.0)3mlに溶解し、同液で平衡化した。Sephacryl S-200ゲル(直径2.8cm,長さ150cm)で分画した。分子量20K部分のピーク分画を回収した。これを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した。この分画を32%アセトニトリルを含む0.1% TFA液に溶解し、逆相高速液体クロマトグラフィーにて分画した。溶出は32%~48% Acetonitrileの直線勾配をかけて行った(流速1ml/分,溶出時間60分)。保持時間30分部分の小さいpeakを骨形成因子画分として回収した。収量は20μgであった。

#### 2. SDSポリアクリルアミド電気泳動

SDS PAGEで、精製画分は単一バンドを呈した。泳動距離から算定した分子量は約22Kであった。

#### 3. 等電点電気泳動

等電点電気泳動でも単一バンドを呈した。PIは9.2~9.4と推定した。

#### 4. 精製骨形成因子による骨形成

精製分画2.5μg以上を、コラーゲン2.5mgと混合して移植することによって、異所性骨形成がみられた。

#### [総 括]

1. マウスDunn骨肉腫に含まれる骨誘導物質(骨形成因子)の精製を行った。
2. 骨形成因子は、塩基性ポリペプチドであり、その分子量は、22Kと推定した。
3. その少量をコラーゲンと混ぜて移植することによって、異所性骨形成が生じた。

## 論文の審査結果の要旨

骨形成の過程は解明されておらず、この過程を明らかにすべく多くの研究がなされている。骨形成の過程には骨を誘導する活性物質の存在が重要な働きをしていると考えられており、この物質、即ち骨形成因子の分離・精製は重要な課題である。本研究ではDunn骨肉腫を用い、骨形成因子の精製法を明らかにし、骨形成因子を精製した。分離・精製された因子は分子量20,000の蛋白質で、著明な骨誘導活性を有する。従来、報告されていたこのような活性を有する物質の純度はきわめて低く、またその活性も十分でない。本研究で得られた物質はその純度・活性からみて骨の成長因子として評価できる物質である。

従って、本研究は博士論文に値するものである。