



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Transient and localized expression of bone morphogenetic protein-4 messenger RNA during fracture healing                                        |
| Author(s)    | 中瀬, 尚長                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1995, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38979">https://hdl.handle.net/11094/38979</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">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

|               |                                                                                                                                             |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | なか せ なかのぶ<br>中 瀬 尚 長                                                                                                                        |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 8 1 3 号                                                                                                                               |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 7 年 3 月 23 日                                                                                                                             |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学研究科外科系専攻                                                                                                              |
| 学 位 論 文 名     | Transient and localized expression of bone morphogenetic protein- 4 messenger RNA during fracture healing<br>(骨折治癒過程における骨形成因子- 4 遺伝子の発現と局在) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 越智 隆弘<br>(副査)<br>教 授 青笹 克之    教 授 北村 幸彦                                                                                         |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

骨形成因子 (bone morphogenetic protein : BMP) は、骨に存在する異所性骨誘導を起こす活性物質として注目されてきたが、その骨折治癒過程における意義は殆どわかっていない。近年次々と BMP の遺伝子がクローニングされそれらが Transforming growth factor (TGF) - $\beta$  のスーパーファミリーに属することが明らかにされた。高岡らもマウス骨肉腫からマウス BMP-4 をクローニングしたが、本研究ではその cDNA を用い、骨折治癒過程における BMP-4 の役割について検討する目的で in situ hybridization (ISH) 法および RT-PCR 法により骨折治癒過程における BMP-4 messenger RNA (mRNA) の局在と発現について観察した。また同時に分化した骨芽細胞のマーカーである bone Gla protein (BGP) の mRNA の発現についても ISH 法を用いて観察した。

#### 【方法ならびに成績】

5 週令 ICR マウスの右第 8 肋骨に骨折を起こし、骨折前と共に経時的に骨折部及びその近傍部を採取し、4 % パラホルムアルデヒドにて固定、EDTA にて脱灰の後パラフィン切片を作成した。マウス BMP-4、BGP の cDNA の塩基配列の特異的な部位をテンプレートとしてジゴキシゲニンラベルした非放射性 RNA プローブを作成し上述の切片を用い ISH を行った。また骨折部及びその近傍部より経時的に mRNA を採取し、RT-PCR にて各時期における BMP-4 mRNA の発現の有無について検討した。肋骨骨折の治癒過程を組織所見をもとに以下の 3 期に分類した。

I. 初期 (骨折後 12 時間目から 3 日目): 骨膜の増殖や類骨形成を認めるが仮骨の形成は明らかでない時期。II. 中期 (骨折後 5 日目から 8 日目): 軟骨形成や、膜性骨化による骨梁骨の形成が明らかとなる時期。III. 後期 (骨折後 12 日目から 20 日目): 内軟骨性骨化が明らかとなりリモデリングが開始され骨癒合に至る時期。BMP-4 の発現は骨折前には認められなかったが、骨折後 12 時間目に骨折部に近接した骨膜の細胞に、2 日目には肥厚した骨膜の細胞と、骨折部近傍の髄腔内及び血腫付近の線維芽細胞様の細胞に認められた。また 3 日目には未熟な新生骨の表層の細胞の一部にも発現を認めた。これら初期における肥厚した骨膜の細胞や未熟な新生骨の表層の細胞には BGP の発現は認められなかった。中期以降、BMP-4 の発現は認められなかった。この時期から仮骨の形成は顕著となり、新生骨梁の骨芽細胞は BGP の mRNA を発現していた。RT-PCR でも BMP-4 は骨折前に認められず骨折後 12 時間目から 3 日目に認められ、5 日目以降には認められなかった。また PCR で得られたバンドが BMP-4 のものであることは BMP-4 マウスに特異的な cDNA をプローブとしたサザンブロットングにより確認された。

## 【総括】

本実験により骨折治癒過程における BMP-4 遺伝子の発現と局在が明らかとなった。骨折前には認められなかった BMP-4 mRNA は骨折後、初期にのみ著明に発現し、その局在は骨折部近傍の骨膜細胞、髄腔内、筋肉内の線維芽細胞様の細胞であった。BMP-4 の発現細胞は分化した骨芽細胞のマーカである BGP は発現しておらず、また、BGP を発現している細胞は BMP-4 を発現していなかった。すなわち骨折治癒過程における BMP-4 の発現細胞は未分化な細胞あるいは未熟な骨原性の細胞であると考えられる。また、経時的な組織学的観察によると、BMP-4 のシグナルが認められた骨膜、髄腔内、筋肉内には中、後期になって著名な仮骨が形成されていた。従来から BMP-4 は骨軟骨誘導因子として知られており、これらの結果は骨折に伴い新たに産出された BMP-4 が骨折治癒の初期において、局所での仮骨形成の制御因子として働いている可能性を示唆するものである。

## 論文審査の結果の要旨

骨形成因子 (BMP : bone morphogenetic protein) は従来から異所性骨形成を誘導する物質として注目されていたが、その骨折治癒過程との関連は不明であった。本論文では著者らが新たに開発した脱灰組織における *in situ* ハイブリダイゼーション法と RT-PCR 法を用い、5 週齢マウス肋骨の骨折治癒過程における BMP-4 遺伝子の発現と局在について検討している。著者らは BMP-4 のメッセンジャー RNA は、骨折前の肋骨には認められないが、骨折後初期に、将来仮骨が形成される部位である骨膜、骨折部近傍部の髄腔内、筋肉内の細胞に認められ、仮骨形成が明らかとなる中期以降には認められなくなるを見だし、骨折にともない新たに産出された BMP-4 が骨折治癒過程の初期における仮骨形成の制御因子である可能性を示唆している。今回得られた結果は骨折治癒過程における BMP-4 遺伝子の発現と局在を明らかにし、骨折治癒と BMP の関係を考えるうえで非常に重要な知見を提示しており、将来の整形外科領域における BMP の臨床応用に寄与するところ大と考えられるので博士論文に値すると思われる。