

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization  |
| Author(s)    | 平川, 公昭  |
| Citation     | 大阪大学, 1995, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39235">https://hdl.handle.net/11094/39235</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。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 平川公昭  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 11955 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2項該当  |
| 学位論文名      | Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization<br>(In situ ハイブリダイゼーション法を用いた骨折治癒過程における骨基質蛋白質 mRNA の局在について) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 北村 幸彦<br>(副査)<br>教授 米田 悦啓 教授 青笹 克之   |

#### 論文内容の要旨

##### 【目的】

骨折の治癒過程は、骨膜付近の未分化間葉系細胞が軟骨細胞あるいは骨芽細胞へ分化することに始まり、骨の再構築を経てもとの構造に復することで終結する。この現象は古くから組織形態学的に観察されてきたが、分子病理学的な研究はほとんどなされていない。これは骨組織のような硬組織への in situ ハイブリダイゼーション法の応用が困難なためであり、これまではノーザンブロット法以外には骨折治癒過程に出現する遺伝子発現を観察する方法はなかった。本研究の目的は、脱灰硬組織標本を用いた in situ ハイブリダイゼーション法を確立し、骨折治癒過程にかかわる骨基質蛋白遺伝子の経時的な発現を細胞レベルで明らかにし、骨折治癒過程における遺伝子発現と形態学的な変化との相関を明らかにすることである。

##### 【方法ならびに成績】

6週齢の F344/DuCrj 系雌ラットの大腿骨骨幹中央部をペントバルビタールナトリウム麻酔下にダイヤモンドディスクで切断し、術後 1, 3, 5, 7, 14, 28日後に骨折部を含む大腿骨骨幹を3匹ずつ経時的に摘出した。4%パラホルムアルデヒドで灌流後、さらに4℃にて一晩固定した。クロロホルム脱脂したのち、20%EDTA溶液にて4日間脱灰し、パラフィン切片を作製した。in situ ハイブリダイゼーションにより検討した遺伝子は、代表的な非コラーゲン性骨基質蛋白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)、Matrix Gla protein (MGP) で、プローブは in vitro transcription により合成したディゴキシゲニンラベル RNA プローブを用いた。

骨折後1日目の骨折部付近の変化としては、出血のほかは紡錘状の未分化間葉系細胞の増生がみられるのみであるが、この未分化な細胞にはすでに ON mRNA の発現がみられた。一方、OPN、OC 及び MGP mRNA の発現は1日目では検出できなかった。骨折後3日目には骨折部付近の外骨膜に未熟な骨が形成され、その部の骨芽細胞様細胞に ON、OPN 及び OC の mRNA の発現が同時期にみられた。骨折後5日以降になり、はじめて骨折部近傍の外骨膜に軟骨の形成がみられ、この未熟な軟骨細胞には ON 及び MGP の mRNA 発現が認められたが、OPN 及び OC の mRNA の発現はみられなかった。同じ時期から内骨膜部には膜性骨化により新生骨が形成され、この部の骨芽細胞様細胞にも ON、OPN 及び OC の mRNA 発現がみられた。骨折後14日以降では外骨膜の軟骨形成部に肥大軟骨細胞の出現がみられ、この肥大軟骨細胞には OPN 及び MGP mRNA の発現を認めた。骨折後14日から28日までに外骨膜

部の軟骨内骨化と膜性骨化, 内骨膜部の膜性骨化がほぼ完成し, 新生骨の骨芽細胞様細胞には ON, OPN 及び OC の mRNA の発現が, 骨細胞には OPN mRNA の発現がみられた。

#### 【総括】

我々は, EDTA 脱灰を用いた硬組織における in situ ハイブリダイゼーション法を確立し, これにより骨折の治癒過程における骨基質蛋白遺伝子の発現の経時的变化・分布を細胞レベルで明らかにした。すなわち, 骨折の修復過程においてそれぞれの骨基質蛋白遺伝子を発現している細胞の種類は胎生期の骨発生過程での発現細胞の種類と極めて類似しており, 同様の細胞特異的な調節機構を利用しているのではないかと考えられた。しかし, OC mRNA の発現が胎生期のように OPN mRNA の発現に遅れることなく, OPN mRNA の発現とほぼ同時にみられたことは, 遺伝子発現の時間的調節機構は胎生期と異なることを示唆した。この EDTA 脱灰組織に対する in situ ハイブリダイゼーション法は, 骨折治癒過程における遺伝子発現への薬物や成長因子の影響, 骨形成異常動物における遺伝子発現の変化などの検索に応用が可能であり, 非常に有用であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

骨折の治癒過程は, 骨膜付近の未分化間葉系細胞が軟骨細胞あるいは骨芽細胞へ分化することに始まり, 骨の再構築を経てもとの構造に復することで終結する。この現象の分子病理学的な研究は, 硬組織への in situ ハイブリダイゼーション法の応用が困難であるため, ノーザンプロット法以外には骨折治癒過程に出現する遺伝子発現を観察する方法はなかった。今回, 平川公昭君は, 20% EDTA 溶液による脱灰硬組織標本を用いた in situ ハイブリダイゼーション法を確立し, ラット大腿骨を用いて骨折治癒過程にかかわる代表的な非コラーゲン性骨基質蛋白遺伝子であるオステオネクチン, オステオポンチン, オステオカルシン, Matrix Gla protein の経時的な発現を細胞レベルで明らかにした。平川公昭君はこれにより, 骨折の修復過程においてそれぞれの骨基質蛋白遺伝子を発現している細胞の種類は胎生期の骨発生過程での発現細胞の種類と極めて類似していることを見いだした。つまり骨折治癒過程における遺伝子発現は胎生期の骨発生と同様の細胞特異的な調節機構を利用しているのではないかと考えられた。しかし, OC mRNA の発現が胎生期のように OPN mRNA の発現に遅れることなく, OPN mRNA の発現とほぼ同時にみられたことは, 遺伝子発現の時間的調節機構は胎生期と異なることを示唆した。本研究により EDTA 脱灰組織に対する in situ ハイブリダイゼーション法が確立され, 骨折の修復過程における骨基質蛋白遺伝子の発現調節機構の一端が明らかになったので, これは学位論文に値すると思われる。