The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨・軟骨分化における TGF-βおよびBMP-2の作用 : 骨膜高密度培養系を用いて
Author(s)	岩崎, 幹季
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39294
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 32 】

氏　　名	岩　崎　幹　季（いわさきもとき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11555　号
学位授与年月日	平成6年10月5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	骨・軟骨分化におけるTGF－βおよびBMP－2の作用 －骨膜高密度培養系を用いて－
論文審査委員	(主査) 教授　越智　隆弘 (副査) 教授　遠山　正彌　　教授　北村　幸彦

論文内容の要旨

【目　的】

骨膜は骨の横径成長や骨折治癒において重要な役割を担っている。骨折治癒過程では，骨膜由来細胞が軟骨や骨に増殖・分化していくが，それにはさまざまな因子が調節し *in vivo* の系ではそれぞれが複雑に関連していると推測され，その個々の作用を調べることは難しい。骨膜の高密度培養系は骨膜に存在する未分化な細胞が増殖しさらに軟骨や骨に分化していく過程が観察できる優れた *in vitro* のモデルである。transforming growth factor－β（TGF－β）やbone morphogenetic protein（BMP）の骨や軟骨に対する作用が最近報告されているが，骨膜に存在する未分化な細胞に対する作用は明かではない。本研究の目的は，TGF－βとBMPが未分化な骨膜細胞の増殖・分化に及ぼす作用を明かにすることである。

【方　法】

ヒヨコ脛骨骨膜から分離した骨膜細胞を高密度に播種すると細胞は増殖して重層し培養の上層は骨組織に，下層は肥大軟骨へと最終分化する。この培養系に0.01～10ng／mlのブタ血小板由来のTGF－β1および1～100ng／mlのヒトリコンビナントBMP－2を培養初期より持続的に作用させ経時的に組織学的検討を行った。さらに軟骨特異的プロテオグリカンであるAggrecanおよびII型コラーゲンの抗体を用いて軟骨分化を，またbone Gla protein（BGP）の抗体を用いて骨への分化を免疫組織化学的検討を行った。軟骨形成のタイムコースを調べる目的でRT－PCR法を用いてII型コラーゲンmRNAの遺伝子発現を経時的に調べた。また，軟骨基質合成の指標としてのウロン酸含量，DNA量，アルカリフォスファターゼ活性，カルシウム含量を経時的に定量した。

【結　果】

コントロールでは培養当初，骨や軟骨のマーカーで陰性の線維芽細胞様の細胞が培養8日目で，AggrecanおよびII型コラーゲンで陽性を示す軟骨に分化する。また培養12日目頃からBGPで陽性を示す骨に分化する。TGF－βを添加するとAggrecanの発現は促進され，BGPの発現でみた骨形成は抑制された。一方，BMP－2を添加すると培養辺縁部では骨形成が，培養中央部では軟骨形成が主として見られたが，コントロールに比し骨形成は促進され，軟骨

形成には明白な作用を及ぼさなかった。Ⅱ型コラーゲン mRNA の発現は，TGF－βにより時間的に早められたが，BMP－2ではコントロールと変化はなかった。ウロン酸含量は，TGF－βにより増加したが，BMP－2ではコントロールと変化はなかった。DNA 量でみた増殖は，それぞれ抑制された。アルカリフォスファターゼ活性は，TGF－βにより抑制され，BMP－2では骨形成に先立つ時期で促進された。カルシウム含量は，TGF－βにより抑制されたが，BMP－2では促進された。

【総　括】

TGF－βは骨膜細胞の軟骨への分化を BMP－2は骨への分化を促進した：TGF－βは軟骨形成を時間的にも量的にも促進させる一方で，骨形成を抑制した。また BMP－2は軟骨形成に影響せず骨形成を時間的にも量的にも促進させた。今回の結果により，骨膜が重要な役割を果たす骨の横径成長や骨折治癒過程で TGF－βは軟骨への分化において，BMP－2は骨への分化において重要な役割を果たしていると考える。

論文審査の結果の要旨

骨の横径成長や骨折治癒において重要な役割を担っている骨膜の増殖および分化調節に関する活性因子の効果はまだあきらかになっていない。本研究は骨膜の高密度培養系を用いて骨膜に存在する未分化な細胞の増殖や軟骨，骨への分化過程に対する活性因子（TGF－β，BMP－2）の効果を *in vitro* で観察したものである。1週令 chick 脛骨骨膜をコラゲナーゼ処理して得た骨膜細胞を高密度（2.0×10^6 cells／ml）に培養すると未分化な線維芽細胞様の細胞が増殖して重層し培養の上層は骨組織に，下層は肥大軟骨へと最終分化する。ここに TGF－βを添加すると骨膜細胞の軟骨への分化を促進した。一方，BMP－2を添加すると骨膜細胞の骨への分化を促進した。この事実は骨膜が重要な役割を果たす骨折治癒や脚延長における TGF－βや BMP－2によるコントロールの可能性を示唆するもので，将来難治性の偽関節や脚延長を治療できる可能性を明らかにしたことに関して大変有意義であり，学位に値すると考える。