

氏 名	こ 小 西 やす 康 ぞう 三
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1755 号
学位授与の日付	平 成 13 年 7 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 題 目	Experimental study of bone induction by Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 (大腸菌由来遺伝子組み換えヒト骨形成因子-2 による骨誘導に関する実験的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 開 祐 司 教 授 中 村 孝 志 教 授 飯 塚 忠 彦

論 文 内 容 の 要 旨

新鮮豚皮から抽出したアテロペプチド I 型コラーゲン (CL) を担体として、遺伝子組み換えヒト BMP-2 (rhBMP-2) の骨誘導について、その誘導骨の早期段階での検討を行った。本実験に使用した *Escherichia coli* (*E. coli*) 由来 rhBMP-2 は、4 モル塩酸グアニジンで溶解させた後、液体クロマトグラフィーによって、純度98%以上に高精製された rhBMP-2 の変種である。この *E. coli* 由来 rhBMP-2 は、チャイニーズハムスター卵巣細胞由来などの、本来の rhBMP-2 の N 末端から12個目までのアミノ酸配列 (MAKHKQRKRLKS) を、インターロイキン 2 の N 末端から13個目までのアミノ酸配列 (MAPTSSSTKKTQL) に、置き換えられている。rhBMP-2 の骨誘導活性は、この置き換えられた N 末端から12個目までのアミノ酸配列には、存在しないことは確認されており、この部分はヘパリン結合部位であることもわかっている。このことから *E. coli* 由来 rhBMP-2 は、十分な骨誘導活性をもつことが報告されている。

E. coli 由来 rhBMP-2 10 μ g を、CL 溶液 (pH3.0, 3 mg/ml: セルマトリックス LA[®]; 新田ゼラチン, 大阪) 1 ml と混合し、凍結乾燥後、直径4.0 mm, 厚さ1.5 mm の円板状に形成付与し、10週齢 Wistar 系ラットの下腿部腓腹筋内に埋入した。対照としては、CL 溶液 1 ml のみを同様の方法にて埋入したものをを用いた。おのおの埋入10日後、4 週後に軟 X 線撮影を行った後、周囲組織を含めて摘出した。摘出標本は10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、EDTA にて脱灰した後、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色し、顕鏡した。rhBMP-2 を埋入した10日後群 (BMP I 群)、4 週後群 (BMP II 群) および対照の10日後群 (CL I 群)、4 週後群 (CL II 群) の 4 群は、おのおの 5 匹ずつとし検討した。

結果

1. 軟 X 線所見

BMP I 群では、すべてのラット筋肉内埋入物の辺縁付近に部分的に不透過像が認められた。BMP II 群ではすべてのラット筋肉内埋入物辺縁全周にわたり、不透過像が認められた。それに対し、CL I, II 群では、すべてのラット筋肉内に不透過像は認められなかった。

2. 組織所見

BMP I 群では、内方では大部分の CL が残存しているのが認められたが、この時点で既に、埋入物の辺縁付近に一部未分化間葉系細胞に囲まれた幼若な骨組織が認められた。なお、軟骨組織は認められなかった。BMP II 群では、部分的に CL は残存しているものの、埋入物内の辺縁近くの全周に新生骨組織が認められ、また、埋入物の中心部付近にも旺盛な骨形成が認められた。誘導骨の内側には1~2層の骨芽細胞が配列しているのが認められ、血管様構造を含んだ骨髓組織が形成されていた。それに対し、CL I, II 群では、埋入物内に骨形成は認められず、吸収されずに残存した CL が認められた。

本研究のように、rhBMP-2 と CL を成熟ラット筋肉内に混合埋入し、わずか10日後に幼若ではあるが骨組織が誘導されていたことは特記すべきことである。狩猟し得た範囲では、過去の *in vivo* での研究において、幼弱な動物では、1 週後に骨形成が認められたという報告はあるが、成熟動物でこのような早期に骨組織が誘導されたという報告はみられない。しかし、今回は埋入10日後と4 週後の組織のみの検討であるため、より早期に軟骨形成が起こる可能性もあり、その詳細な経時

的観察を今後検討していく必要があると考えている。

今回、CLを担体として、10 μ grhBMP-2を成熟ラット下腿腓腹筋内に埋入し、10日後、4週後にX線学的、組織学的に検討した。

rhBMP-2埋入した群の埋入4週間後ばかりか、埋入10日後という早期でさえ、全例に骨誘導が確認された。

論文審査の結果の要旨

現在のところ、一般に広く供給されている遺伝子組み換えヒト骨形成因子は、チャイニーズハムスター卵巣細胞などの哺乳類動物の細胞由来の骨形成因子である。これは下等動物の細胞を使用しての骨形成因子合成方法では、活性型の遺伝子組み換えヒト骨形成因子を得るには至らないとされてきたためである。一般に容易な遺伝子組み換え蛋白の合成方法として用いられる大腸菌では、当初やはり諸研究施設で行われていたように、遺伝子組み換えヒト骨形成因子は合成出来ても活性型にならず、困難を極めていた。しかし、申請者らは大腸菌を用い活性領域のみを大量に調整した後、一度還元状態で変成させ、緩徐に変成剤を抜きながら酸化することにより、活性型二量体の遺伝子組み換えヒト骨形成因子を得ることに成功を収めた。また、この大腸菌由来骨形成因子は、哺乳動物細胞由来骨形成因子と比較し、同等もしくはそれ以上の高い骨誘導活性を有していることも確認した。このことは、高い骨誘導活性を持つ遺伝子組み換えヒト骨形成因子が、安価で容易に大量生産可能なことを意味し、臨床応用に当たり極めて有用であると考えられる。

以上の研究は、大腸菌由来遺伝子組み換えヒト骨形成因子の骨誘導活性の解明に貢献し、容易に、安価で、大量生産可能な骨形成因子合成を可能にしたことから、骨形成因子の臨床応用に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年4月13日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。