

# 論 文 要 旨

Effect of aging on the osteoinductive activity of  
recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rats  
(ヒト組換え骨形成タンパク 2 によるラット骨誘導能への加齢の影響)

関西医科大学 形成外科学講座  
(指導：楠本 健司 教授)

原 朋也

## 【目的】

骨形成タンパク(Bone morphogenetic protein: BMP)は骨基質中に存在し、*in vivo*で未分化間葉系幹細胞を軟骨芽細胞や骨芽細胞に分化させ異所性に骨を誘導するタンパク質である。また、骨格形成、骨折治癒、骨リモデリングなどのあらゆる生理的骨形成に必須の役割を担うことが明らかになっており、骨再建・再生分野への応用に有用であると期待されている。なかでも BMP-2 が異所性骨形成能が最も高く、我々はこれまでにヒト組換え骨形成タンパク 2(recombinant human BMP-2: rhBMP-2)のラット下腿筋肉内における異所性骨誘導の実験系を確立し種々の検討を進めている。なかでも rhBMP-2 の担体として最適な I 型コラーゲンとの組み合わせで rhBMP-2 異所性骨誘導能の研究を行ってきた。加齢により細胞の代謝活性は低下し、生体反応性に影響があることが知られているが、加齢が rhBMP-2 の異所性骨誘導能にどのような影響を与えるのかはいまだ明らかではない。今回我々は、加齢による rhBMP-2 の骨誘導能の影響を検討するために週齢の異なるラットを用いて研究を行った。

## 【方法】

rhBMP-2 5 $\mu$ g を I 型コラーゲン 1mL(3mg/mL)と混和、凍結乾燥した。その後、圧縮成形し直径 4.2mm 厚み 1.5mm の円形のペレットを作成した。このペレットを生後 3、8、48 週齢の Wistar/ST 雄ラット(n = 12)の下腿腓腹筋内に埋入した。3 週後に異所性誘導骨を摘出し、軟 X 線撮影によって硬組織形成の有無を確認した。誘導骨の骨質の評価のために 2 重エネルギー X 線吸収測定法(dual energy X-ray absorptiometry: DXA)によって骨塩量、骨面積を測定し、骨密度を算出した。その後、組織学的な誘導骨量を定量化するために凍結非脱灰標本で von Kossa 染色を行った。パラフィン脱灰標本で hematoxylin-eosin(H-E)染色を行い組織学的に評価した。誘導骨周囲の増殖期にある骨芽細胞様細胞を定量化するために proliferation cell nuclear antigen(PCNA)免疫組織染色を行った。

## 【結果】

軟 X 線撮影で、全例に楕円形の骨形成を認めた。また、加齢群ほど弱く小さい X 線不透過像を認めた。DXA では、骨密度は 3 週齢で  $29.40 \pm 5.47$ 、8 週齢で  $24.15 \pm 2.33$ 、48 週齢で  $19.01 \pm 2.02$  mg/cm<sup>2</sup> と加齢により有意に低下した(P < 0.05)。von Kossa 染色で加齢群ほど有意に骨形成面積が小さいことを確認した(P < 0.01)。H-E 染色では、加齢群ほど骨梁が薄く連続性がなかった。PCNA 免疫染色では加齢群ほど骨梁周囲の骨芽細胞様細胞に陽性細胞が有意に少ないことを確認した(P < 0.01)。これら全ての結果が加齢により rhBMP-2 の異所性骨誘導能が低下することを示した。

## 【考察】

加齢に伴う未分化間葉系幹細胞の減少また rhBMP-2 により誘導された骨芽細胞が少ないことにより、ラット腓腹筋内における異所性誘導骨は量的、質的に

減少したと推察された。また、これまで **BMP** の異所性骨誘導能の研究では組織学的なアプローチのみで骨質の定量的な評価をしているものがなかったが、今回 **DXA** を用いることでより定量的で客観的な評価を行うことができた。そのため今後、同じような実験モデルや **rhBMP-2** の臨床応用の際には **DXA** による評価が有用であると考えられる。また、高齢者および若年者に対する **rhBMP-2** を用いた骨再建・再生の際には、加齢による生体反応性の違いを考慮に入れる必要性が示唆された。