

論文内容の要旨

博士論文題目

Development of Materials for Bone Regeneration Using Novel BMP-2-derived Peptides
(新規な骨形成因子(BMP-2)由来ペプチドを用いた骨再生材料の開発)

氏名 齋藤 充弘

(論文内容の要旨)

骨組織に大きな欠損が生じた場合には、自家骨移植や人工骨置換が行われる。しかし、自家骨移植では採取部の欠損が、金属やセラミック系の人工骨では、組織と材料の接合部のゆるみや骨の破損が問題となる。これらを解決するものとして、骨組織のもつ再生能力を促進し、修復後には分解・吸収されるような骨修復材料が望まれている。

Bone morphogenetic protein (BMP) は異所性骨誘導作用を示すタンパク質として骨基質から単離・同定され、骨修復促進材料への応用が期待されている。しかし BMP は、多様な生理活性を持つこと、タンパク質であることに由来する不安定性などの問題がある。

本研究では、BMP-2 とその受容体の複合体の構造から、活性中心と予測した領域のアミノ酸配列を基に、BMP-2 由来ペプチドを設計し、この骨芽細胞活性化と骨誘導活性の検討と骨修復材料へ応用を目的とした。

BMP-2 の刺激によって骨芽細胞様細胞に分化する能力を有するマウス線維芽細胞株 C3H10T1/2 に対して、BMP-2 由来ペプチドは、(i) 細胞膜表面の BMP 受容体に特異的に結合し、(ii) アルカリホスファターゼ 活性の上昇と、(iii) オステオカルシン mRNA 等の発現を促進した。即ち、BMP-2 由来ペプチドは未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導することが明らかとなった。

次に BMP-2 由来ペプチドを結合した共有結合架橋アルギン酸ゲルをラット筋肉内に埋植すると、ヒドロキシアパタイトからなる石灰化物を誘導した。比較として用いた rhBMP-2/collagen の石灰化は、3週間目が最大で、5週目にはほとんど消失したが、BMP-2 由来ペプチド/アルギン酸ゲルでは5週目以降も石灰化部位は減少しなかった。即ち、アルギン酸ゲルに BMP-2 由来ペプチドを固定化することによって、活性を局所に安定に保持したため、未分化間葉系細胞が連続的な刺激を受けて、骨芽細胞への分化と活性化が持続したと考えられる。

ラット脛骨に作製した欠損部に、BMP-2 由来ペプチド/アルギン酸ゲルを埋植した結果、ゲルの周囲への新生骨の誘導と欠損部の縮小が観察された。さらに、未分化間葉系細胞を含む骨髄細胞と、BMP-2 由来ペプチド/アルギン酸ゲルを混合したものは、早期に欠損部が修復された。

本研究によって、BMP-2 由来ペプチドが BMP 受容体を介して未分化間葉系細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、ラット筋肉内および骨欠損部において骨組織を誘導することが示された。一般に BMP などのタンパク質は生体内では不安定で、急速にその生理活性を失う。本研究で作製した BMP-2 由来ペプチドは化学的に安定で、材料に固定化して強い活性を維持できることから、骨修復促進材料として有用であると考えられる。

(論文審査結果の要旨)

高齢化社会において骨折の早期治療の実現は、患者の速やかな社会復帰を可能にするために極めて重要な課題である。本論文では骨形成に関与するタンパク質の構造情報に基づいて新規な骨形成ペプチドを創成し、有用な骨修復促進材料を開発することを目的として、以下に示す成果を挙げた。

- (1) 骨形成因子である BMP-2 を含む TGF β ファミリーのアミノ酸配列の類似性と、BMP-2/BMP 受容体の複合体の X 線結晶構造解析結果に基づいて活性中心と予測される新規なペプチドを合成した。このペプチドが骨芽細胞前駆細胞上の受容体に特異的に結合し、骨芽細胞のマーカー酵素活性の増大と骨基質タンパク mRNA の発現を促進し、BMP-2 と同様のメカニズムで骨芽細胞の前駆細胞を活性化することを示した。
- (2) 得られた合成ペプチドを共有結合架橋アルギン酸ゲルに結合した材料は、動物体内で骨形成を誘導した。rhBMP-2 とコラーゲンによって誘導された骨が3週目以降急激に消失するのに対し、本ペプチドでは7週間以上骨形成が持続した。このことから、合成ペプチドがタンパク質よりも安定性に優れており、担体に結合することによりその活性を局所に限定して長期間発揮し得ることを示したものである。
- (3) 合成ペプチドを結合した材料の形状を微粒子状にすることで、骨欠損部においても、骨形成を材料内部に誘導し有意な骨修復の促進が認められた。また、骨髄細胞を上記材料とともに骨欠損部に埋植するとさらに顕著な骨修復が達成されたことから、本材料が動物体内においても骨芽細胞の分化と活性化を局所で誘導し得ることを示した。

以上のように本論文は、骨形成タンパク質の構造情報に基づいて作製した合成ペプチドの骨形成作用を、細胞を用いる実験と動物実験の両方で確認した。本論文はタンパク質の構造に基づく活性中心の予測法の提唱とその妥当性を検証するとともに、安定性の向上と活性の持続という合成ペプチド結合材料の優位性を示し、今後の新規な組織工学・再生医療担体の開発指針を与えるものであり、その独自性と有用性から、学術上および実用上の貢献が大である。よって、審査委員一同は本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。