

氏名	志 茂 剛
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1725 号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	軟骨由来成長因子Hcs24/CTGFの血管内皮細胞におけるオートクリン, パラクリン増殖・遊走因子としての役割
論文審査委員	教授 永井教之 教授 村山洋二 教授 滝川正春

学位論文内容の要旨

〔緒言〕

ヒト軟骨細胞様培養細胞株HCS-2/8からdifferential display-PCR法によりクローニングした肥大軟骨細胞に高発現する遺伝子(*hcs24*)は結合組織増殖因子(CTGF)をコードしている。CTGFは36~38kDaのシステインに豊む蛋白質であり, CCNファミリーに属する。しかしその機能については軟骨細胞の増殖を促進することなどが報告されてはいるものの, いまだ不明の点が多い。ところで内軟骨性骨化の最終段階では石灰化した肥大軟骨細胞層に向けて骨側から血管が侵入して軟骨組織が骨に置換する。そこで, 本研究では, 肥大軟骨細胞で産生されるCTGFの, 血管内皮細胞の増殖と遊走における役割を, 抗CTGF抗体やCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを用い, 又, 遺伝子導入により血管内皮細胞にCTGFアンチセンスRNAを持続発現させて解析した。さらに, 組換えCTGF蛋白質を用い, CTGFの血管内皮細胞に対する直接的な作用を解析した。

〔材料と方法〕

細胞はウシ大動脈血管内皮細胞(BAE)を使用し, 10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むDulbecco変法Eagle培地(DMEM)中で37°C, CO₂気相下にて培養した。抗CTGF抗体はCTGFの合成ペプチドをウサギに免疫して作製し, そのIgG画分を使用した。免疫染色はAvidine: Biotinylated enzyme Complex (ABC)法と免疫蛍光抗体法を用いて行った。BAE細胞におけるCTGF mRNA発現レベルの比較はRT-PCR法とノーザンプロット法にて行なった。CTGF アンチセンスオリゴヌクレオチドは, CTGF遺伝子の翻訳開始部位の16merに決定した。なお, 対照として同一部位のセンスオリゴヌクレオチドを使用した。又, CTGFアンチセンスRNA発現ベクターは, CTGF cDNAの開始コドンから終止コドンまでを含む1050bpに相当する領域を, 真核生物発現ベクター(pRc/CMV)のCMVプロモーター領域下流に逆向きに接続して作製した。アンチセンスCTGF RNA発現ベクターのBAE細胞への遺伝子導入はエレクトロポレーション法にて行い, 導入細胞の選択にはG418を使用して, 20日後コロニーをシリンダーを用いて単離した。細胞数の算定には, 血球計算板を用い, DNA合成能の測定は³Hチミジンの酸不溶性画分への取り込み量をマイクロベータにて測定した。BAE細胞の遊走能の測定にはプラスチックシャーレ上で遊走したBAE細胞を画像解析装置を用いて定量することと, ポイデンチャンバーの変法(ケモタキセルを使用)にてメンブレン下層に遊走したBAE細胞をカウントすることで調べた。なお, 組換えCTGF蛋白質は, CTGF cDNAの開始コドンから終止コドンまでを含む1050bpに相当する領域を, 真核生物発現ベクター[pcDNA 3.1(-)]のCMVプロモーター領域下流に正方向に接続し, これをHeLa細胞に遺伝子導入して選別し, 導入細胞の培養上清からヘパリンアフィニティーカラム, CTGF抗体アフィニティーカラムにて精製したものをを用いた。

[結果]

1. 抗CTGFペプチド抗体で、マウス肋軟骨・骨移行部を免疫染色すると、肥大軟骨細胞の他に骨側の血管内皮細胞、特に軟骨内へ侵入しつつある血管の内皮細胞が強染された。
2. BAE細胞のCTGF mRNA 発現レベルをRT-PCR法で調べると、コンフルエントに達した静止期に比べ対数増殖期で非常に高かった。
3. コンフルエントに達したBAE細胞層を半分セルスクレーパーで剥がし12時間培養後免疫染色すると、剥がした部位へ遊走・伸展している細胞のみが抗CTGF抗体で強染された。
4. 対数増殖期のBAE培養細胞にCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加しCTGF mRNAの発現量を調べると、CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加して24, 48時間後に著明な抑制効果がみられた。また、CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加した群では、26時間後に対照と比較して濃度依存的にDNA合成が抑制された。
5. コンフルエントに達したBAE細胞層を半分セルスクレーパーで剥がし、同時にCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加して培養すると、剥がした部位へのBAE細胞の遊走・伸展が対照と比較して著明に抑制された。また、ケモタキセルを用いてポイデンチャンパーの変法にてbFGFの遊走亢進作用に対する影響を調べたところ、CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した場合は対照と比較してBAE細胞の遊走が有意に抑制された。
6. CTGFアンチセンスRNAを持続的に発現させたBAE細胞においては、ベクターのみを導入したコントロールBAE細胞と比較してCTGF mRNAの発現レベルは低く、増殖能や遊走能が持続的に阻害された。
7. 組換えCTGF蛋白質をBAE細胞培養系に添加すると、BAE細胞の増殖は促進され、この促進作用は抗CTGF抗体の添加により、完全に阻害された。また、組換えCTGF蛋白質を用いてチェッカーボード解析を行うと、濃度勾配に従ってBAE細胞の遊走が促進された。
8. bFGFをBAE細胞培養系に添加し、BAE細胞のCTGF mRNA 発現レベルの経時的变化を調べると、12時間後をピークに、最大で添加前の約3.8倍に増加した。さらに、組換えCTGF蛋白質をBAE細胞培養系に添加し、BAE細胞のCTGF mRNA 発現レベルの経時的变化を調べると、12時間後をピークに、最大で添加前の約3.2倍に増加した。

[考察および結論]

1. CTGF mRNAの発現レベルが対数増殖期のBAE細胞で高く、抗CTGF抗体が*in vivo* ならびに*in vitro* で浸潤あるいは遊走している血管内皮細胞を強染したことから、増殖・遊走刺激を受けた血管内皮細胞がCTGFを産生することが明らかとなった。
2. 血管内皮細胞のCTGFの発現はbFGFで促進され、さらにCTGFが自分自身の発現を促進することが判明した。
3. CTGFの発現をアンチセンスオリゴヌクレオチドや、アンチセンスRNA発現ベクターの遺伝子導入によって阻害するとBAE細胞の増殖と遊走が阻害されたことから、CTGFは血管内皮細胞のオートクリン増殖・遊走因子として機能していることが明らかとなった。
4. 組換えCTGF蛋白質がBAE細胞の増殖と遊走を直接的に促進したことから、CTGFはパラクリン的にも作用することがわかった。CTGF mRNAの発現が肥大軟骨細胞で最も高いという既報と、今回の結果と合わせると、CTGFが肥大軟骨細胞で産生され、骨側の血管内皮細胞に向けて放出されて、内軟骨性骨化の最終段階での骨側から軟骨側への血管の侵入を誘導する因子として重要な機能を担っていることが示唆される。

論文審査結果の要旨

本研究は、肥大軟骨細胞で産生される結合組織増殖因子 (CTGF) の血管内皮細胞における役割を、抗CTGF抗体を用いた免疫組織化学的手法と、ウシ大動脈血管内皮 (BAE) 細胞培養系にCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加し、又、CTGFアンチセンスRNA発現ベクターをBAE細胞へ遺伝子導入することにより、さらには、組換えCTGF蛋白質を直接BAE細胞培養系に添加することにより解析したものである。

本研究の結果から、増殖・遊走刺激を受けた血管内皮細胞がCTGFを産生し、又、bFGFで産生誘導されるCTGFがBAE細胞におけるCTGF産生能を促進するという正のフィードバック機構が存在することが明らかとなった。又、CTGFはBAE細胞の自己増殖・遊走因子として機能し、さらに、CTGFはBAE細胞に対してパラクリン因子としても作用することが明らかとなった。

これらの結果は、CTGFが内軟骨性骨化の最終段階での骨側から軟骨側への血管の侵入を誘導する因子として重要な機能を担っていることを強く示唆するのみならず、内軟骨性骨化以外の正常な発育過程における血管新生や、関節炎や腫瘍等の病的な血管新生のメカニズムを理解する上でも極めて重要な知見となると考えられる。

よって本研究者は博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。