

氏名	西 田 崇
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 1857号
学位授与の日付	平成11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	軟骨由来の成長因子Hcs 24/CTGFの特異的受容体を介する軟骨細胞増殖・分化促進作用
論文審査委員	教授 山本照子 教授 古田裕昭 教授 滝川正春

学位論文内容の要旨

[目的]

内軟骨性骨化において、成長軟骨細胞は増殖・成熟し、基質を産生した後に肥大化すると共に、基質の石灰化がおり、最終的に軟骨は骨に置換する。この過程で多くの成長因子が作用しているが、これらの成長因子は内軟骨性骨化の一部分を促進するのみで、内軟骨性骨化全般にわたって働く成長因子は今まで見い出されていなかった。先に中西らは、この過程で主要な役割を果たす機能分子を単離すべく、軟骨細胞に特異的に発現している遺伝子 *hcs24* をクローニングしたが、この *hcs24* は特に肥大軟骨細胞に高発現し、結合組織成長因子(CTGF)をコードする遺伝子であった。CTGFはCCNファミリーに属する成長因子で、線維芽細胞の増殖と遊走を促進すること、創傷治癒過程や線維腫で高発現することなどが知られているが、その詳細な機能は知られていない。また、その受容体に関しては血小板由来増殖因子(PDGF)受容体を共有する可能性が示唆されているものの未だ同定されていない。本研究では、組換えCTGFタンパク質(rCTGF)を用いて、軟骨細胞に対するCTGFの作用について調べると共に、CTGFに特異的な受容体の同定とその軟骨細胞の分化に伴う受容体レベルの変動について解析し、内軟骨性骨化におけるCTGFの生理的意義の解明を試みた。

[材料と方法]

ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8は10%牛胎仔血清(FBS)含有ダルベッコ変法イーグル培地で培養し、初代ウサギ肋軟骨成長軟骨細胞(RGC)はコラゲナーゼ処理により分離後、10% FBS含有 α 変法イーグル培地で培養した。rCTGFは志茂の方法に準じて作製した。細胞の増殖能は ^3H チミジンの取り込みおよび細胞数から判定した。又、プロテオグリカン合成は ^{35}S 硫酸の取り込みにより、アルカリホスファターゼ(ALPase)活性はBesseyの方法に準じて測定した。rCTGFの細胞に対する結合試験はrCTGFを ^{125}I 標識した ^{125}I -rCTGFをHCS-2/8細胞培養系に添加して、細胞に結合した放射活性を γ -カウンターで測定することにより行った。又、HCS-2/8細胞に結合した ^{125}I -rCTGFをdisuccinimidyl suberate(DSS)で架橋し、細胞を溶解後、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーによりリガンド・受容体複合体を同定した。さらに、 ^{32}P 正リン酸でラベルしたHCS-2/8細胞をrCTGFで刺激し、DSSで架橋後、抗CTGF抗血清で免疫沈降し、SDS-PAGEを行い、リン酸化されたCTGF受容体を同定した。

[結果]

- (1) rCTGFは濃度依存的にHCS-2/8細胞およびRGC細胞の増殖を促進した。この際、抗CTGF抗体を添加すると増殖促進作用は阻害された。
- (2) HCS-2/8細胞およびRGC細胞にrCTGFを添加するとプロテオグリカン合成が亢進し、さらに、RGC細胞において分化のマーカであるALPase活性の上昇が認められた。
- (3) PDGF受容体を発現しているHCS-2/8細胞をPDGFで刺激すると、PDGF受容体の発現は著明に亢進したが、CTGFで刺激を加えてもPDGF受容体の発現量の増加は認められなかった。
- (4) HCS-2/8細胞への¹²⁵I-rCTGFの結合は、非標識rCTGFの共存下で濃度依存的に阻害されたが、非標識PDGF-BBあるいは塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)共存下では結合の阻害は認められなかった。結合試験の結果をScatchard解析したところ、解離定数(Kd)18.6nMと259nMの親和性の異なる2種類の受容体の存在が明らかとなった。
- (5) ¹²⁵I-rCTGFをHCS-2/8細胞に結合させて架橋実験を行った結果、280kDaのバンドが認められ、このバンドは非標識rCTGF添加により濃度依存的に消失した。しかし、同じ濃度のPDGF-BBおよびbFGFを添加してもこのバンドは消失しなかった。さらに、架橋した¹²⁵I-rCTGF・受容体複合体を抗CTGF抗血清によって免疫沈降して電気泳動すると、架橋実験で得られた結果と同じ位置にバンドが認められたが、抗PDGF受容体抗血清で免疫沈降してもこのバンドは認められなかった。
- (6) HCS-2/8細胞を[³²P]正リン酸でラベルし、rCTGFで刺激後DSSで架橋し、抗CTGF抗血清で免疫沈降して電気泳動すると、リン酸化されたCTGF受容体のバンドが検出された。
- (7) RGC細胞にPTHを添加して、細胞を成熟させると¹²⁵I-rCTGFの細胞への結合量は減少した。一方、IL-1βを添加し、細胞の成熟を抑制すると¹²⁵I-rCTGFの細胞への結合量は増加した。又、RGC細胞をコラーゲンコートしたディッシュ上で5週間培養するとRGC細胞は増殖・分化するが、CTGF mRNAの発現量は分化のマーカであるALPase活性の上昇に伴い増加したのに対し、細胞への¹²⁵I-rCTGFの結合率はALPase活性の上昇に伴い減少した。

[考察]

以上の結果から、CTGFは、軟骨細胞において特異的受容体を介してその増殖、成熟さらには肥大化を促進する多機能因子であることが明らかとなった。CTGF受容体の分子量は約240kDaと推定され、親和性の異なる2種類の受容体が存在すると考えられた。又、CTGF受容体は軟骨細胞の分化に伴って変動し、この変動が軟骨細胞に対するCTGFの作用を制御している可能性が示唆された。

[結論]

CTGFは、特異的受容体を介して軟骨細胞の各分化段階で作用し、内軟骨性骨化全体を促進する多機能因子であることがわかった。

論文審査結果の要旨

本研究は、ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞株HCS-2/8およびウサギ肋軟骨成長軟骨細胞の培養系に組換え結合組織成長因子(CTGF)タンパク質を添加することにより、肥大軟骨細胞で産生されるCTGFの軟骨細胞における作用を直接的に解明したものである。また、従来、血小板由来増殖因子(PDGF)受容体を共有するといわれたCTGF受容体について、結合試験や架橋実験、免疫沈降などにより生化学的に解析し、CTGFに特異的な受容体が存在する可能性について検討すると共に、軟骨細胞におけるCTGFの役割を受容体レベルからも検討したものである。

本研究の結果から、CTGFは、増殖期の軟骨細胞に対して細胞の増殖を促進させ、成熟期および肥大期の軟骨細胞に対してはプロテオグリカン合成およびアルカリホスファターゼ活性を上昇させることが明らかとなった。又、それらの作用は、従来考えられていたPDGF受容体を介するのではなく、CTGFに特異的な受容体を介して行われることが明らかとなった。さらに、CTGF特異的受容体の発現レベルは前成熟期の軟骨細胞で多く、肥大期の軟骨細胞で減少することが明らかとなった。

これらの結果は、肥大軟骨細胞から産生されたCTGFが、軟骨細胞の増殖・分化および成熟に作用し、内軟骨性骨化を促進する多機能因子であることを示唆している。又、CTGFに特異的受容体が存在することを世界に先駆けて明らかにしたものであり、本研究で得られた結果は、内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖と分化における制御機構を分子レベルで解明する上で極めて重要な知見になると考えられる。

よって、本論文は博士(歯学)の学位の授与に値するものと判定した。