

氏名 縄 稚 久 美

授与した学位 博士

専攻分野の名称 歯 学

学位授与の番号 博 甲 第 2 4 8 1 号

学位授与の日付 平 成 1 5 年 3 月 2 5 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 1. Tyrosine kinase-type receptor ErbB4 in chondrocytes : interaction with connective tissue growth factor and distribution in cartilage
(チロシンキナーゼ型レセプターErbB4遺伝子の軟骨における発現: 結合組織成長因子(CTGF/Hcs24)との関連と軟骨細胞での分布)2. マクロファージコロニー刺激因子受容体遺伝子(*m-csfr/c-fms*)の軟骨細胞における発現

論文審査委員 教授 杉本 朋貞 教授 山本 照子 教授 滝川 正春

学位論文内容の要旨

【目的】

内軟骨性骨化は長管骨の長軸方向の骨化を決定する複雑な生物学的過程であり、この過程は膨大な数の成長因子やサイトカインの制御下にある。その中心的成長因子の一つに結合組織成長因子

(CTGF)があり、*in vitro*において軟骨細胞に対して増殖分化から成熟まで全てに過程を促進し、*in vivo*において肥大軟骨細胞特異的に発現していること、さらに血管新生を誘導することも知られている。最近の報告によれば、ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株HCS-2/8にはCTGFの特異的受容体が存在し、それはCTGF刺激によりチロシンリン酸化を受けると考えられている。一方 α -2 マクログロブリンレセプターがCTGFの特異的レセプターであるとの報告もあるが、同レセプターはリン酸化シグナルを媒介しない。したがって、CTGFがたとえ α -2 マクログロブリンレセプターに結合するにしてもリン酸化シグナルを媒介するCTGFレセプターは存在するものと考えられる。さらに、軟骨細胞の成長分化を制御する成長因子やサイトカインの受容体がすべて同定されたわけではなく、未だ知られぬ細胞表面受容体の中に、軟骨の成長分化にとって重要なものがいくつか存在する可能性も考えられる。

そこで本研究では、HCS-2/8細胞に発現しているチロシンキナーゼ型レセプターを探索し、その結果新たに軟骨細胞での発現が確認されたErbB4遺伝子(*erbB4*)およびマクロファージコロニー刺激因子受容体遺伝子(*m-csfr/c-fms*)の軟骨細胞における発現様態を解析した。

【材料と方法】

I. 細胞培養：4種類のヒト細胞株を使用した。HCS-2/8細胞、扁平上皮癌由来細胞株A431細胞、乳癌由来細胞株MDA231細胞、線維肉腫由来細胞株HT1080細胞は10%FBSを含むDMEM中で培養した。CTGFによる刺激を行う場合はHCS-2/8細胞をコンフルエントに達するまで培養し、50 ng/mlの組み換えCTGF(rCTGF)を添加した。

マウス軟骨細胞前駆細胞株ATDC5細胞は5%FBSを含むDMEM/Ham's F-12(1:1)hybrid 培地中で培養した。分化誘導のためにはATDC5細胞を 6×10^4 cells/wellの濃度で6 wellプレートに播種し、10 μ g/mlのインシュリンを含む培地で22日目まで培養した。全ての培養は、37℃、5%CO₂、気相下にて行った。

II. レセプターの同定とそのcDNA断片のクローニング：コンフルエントまで培養したHCS-2/8細胞からRNAを抽出し、チロシンキナーゼ型レセプターのキナーゼ領域の保存された断片を得るためのオリゴヌクレオチドプライマーを使用してRT-PCRを行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で精製し、pPCR-script Amp SK (+) プラスミドベクターに組み込んでクローニングを行った。PCRによりクローン化断片を確認できたものについて塩基配列を決定し、それぞれのクローンの本体をDDBJ Homology Search system BLAST で検索した。

Ⅲ. RT-PCR 解析 : HCS-2/8細胞の場合, コンフルエントまで培養した後, rCTGF添加後経時的に, A431細胞, MDA231細胞, HT1080細胞については標準培養条件で回収し, RNAを抽出した。これらの試料についてGAPDH, HEK8, ErbB4 各cDNAを認識するプライマーを使ってRT-PCRを行った。ATDC5細胞からは, コンフルエントに達した後分化誘導培地で培養し, 経時的にRNAを抽出し, X型コラーゲン, CTGF, ErbB4, およびM-CSFR cDNAを認識するプライマーを使ってRT-PCRを行った。

Ⅳ. *in situ* hybridization : 3週齢のICRマウスを使用した。動物の大腿骨及び下顎骨を取り出し, 4%パラフォルムアルデヒド浸漬固定を行った。次に, 10%EDTAにて2週間脱灰し, パラフィン包埋し, 4 μ mの切片を準備した。各切片につきErbB4とM-CSFR cDNAの翻訳領域のDIGラベルアンチセンスリボプローブでハイブリダイゼーションを行った。ネガティブコントロールにはセンスプローブを用いた。核染色はメチルグリーンで行った。

【結果】

I. HCS-2/8細胞からチロシンキナーゼファミリーの遺伝子断片をクローニングした。その結果, 3種類のクローンが得られた。39コロニー中29コロニーは, macrophage colony stimulating factor I receptor (M-CSFR), 9コロニーは, human EPH-like receptor-tyrosine kinase(HEK8), 1コロニーは, ErbB4をコードすると思われる遺伝子断片が得られた。

II. 各遺伝子のmRNAを認識するプライマーによる半定量RT-PCRの結果, このうちErbB4 mRNAがCTGFにより誘導された。ウサギ肋軟骨成長軟骨細胞を用いた同様の実験においても類似の結果が得られた。A431, MDA231, HT1080等の非軟骨細胞においてもCTGFとErbB4 mRNAの発現パターンは類似していた。

III. ATDC5細胞の分化段階において, X型コラーゲンmRNAは比較的早期から発現は上昇し, CTGF mRNAは8日後から経時的に発現が上昇した。対照的にErbB4 mRNAは時間に関係なく強い発現を示した。M-CSFR mRNAに関しては16日目に強い発現が見られた。

IV. マウス大腿骨成長板軟骨組織においてCTGF mRNAは肥大軟骨細胞に多く発現しているのに対して, ErbB4 mRNAの発現は肥大軟骨細胞以外の分化ステージのほとんど全ての段階に見られ, M-CSFR mRNAに関しては前肥大軟骨細胞層に特に強く, 肥大軟骨細胞層にも弱い発現がみられた。下顎骨関節軟骨においてはErbB4 mRNAの発現は最表層から深層に至るまでの軟骨細胞にみられた。膝関節軟骨においてはM-CSFR mRNAは最表層にはその発現は見られなかったが, 中間層から深層に至るまでの軟骨細胞に発現がみられた。

【結論】

2つのチロシンキナーゼ型レセプター, *erbB4*と*m-csfr (c-fms)*が成長板軟骨, 関節軟骨の軟骨細胞に発現していることが本研究ではじめて明らかとなった。

これらのうち*erbB4*はCTGF刺激により発現が上昇し, CTGFとの関連が示唆された。また*erbB4*の発現様態は軟骨細胞の分化課程で変化なかったことから軟骨細胞の基本的な機能維持に関連している可能性が考えられる。

一方, *m-csfr*はその発現が前肥大化期に特に強く発現していたことから, 軟骨細胞の肥大化に向かう分化段階でなんらかの役割を果たしている可能性が考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究は受容体型チロシンキナーゼファミリー遺伝子を特異的に増幅するプライマーを使用したPCR法により、ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株HCS-2/8細胞上に存在するチロシンキナーゼ型レセプターを探索し、軟骨細胞における発現様態を調べたものである。

その結果、マクロファージコロニー刺激因子受容体遺伝子 (*m-csfr/c-fms*), human EPH-like receptor-tyrosine kinase(*hek8*), ErbB4遺伝子 (*erbB4*)の3種類の遺伝子をコードすると思われる遺伝子断片が得られた。このうちErbB4 mRNAが結合組織成長因子(CTGF)により誘導され、また非軟骨細胞において*ctgf*と*erbB4*の発現パターンに類似性がみられたことから*erbB4*と*ctgf*の関連が示唆された。さらに軟骨細胞の分化過程における*erbB4*及び*m-csfr (c-fms)*遺伝子の発現の変動をATDC5細胞のmRNAを用いたRT-PCR法及び軟骨組織を用いた*in situ*ハイブリダイゼーションにより調べるとErbB4 mRNAは肥大軟骨細胞以外の軟骨細胞に、M-CSFR mRNAは前肥大軟骨細胞～肥大軟骨細胞に局限して発現していたことから、両レセプターが軟骨細胞の分化に何らかの役割を示していることを示唆した。

以上、本研究は2つのチロシンキナーゼ型レセプター、*erbB4*及び*m-csfr (c-fms)*が軟骨細胞に発現していることを明らかにし、その生理的意義の解明に端緒を開いた点で極めて斬新な研究である。よって、本申請論文は学位論文としての価値を有するものと認めた。