



Title	培養軟骨細胞におけるcyclic AMP levelと基質合成に及ぼすMSA (Multiplication stimulating activity) の影響
Author(s)	辻, 光子
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33810
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	つじ	みつ	こ
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	6 2 3 0	号
学位授与の日付	昭 和 58 年 12 月 1 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
学位論文題目	培養軟骨細胞におけるcyclic AMP level と基質合成に及ぼす MSA (Multiplication stimulating activity) の影響		
論文審査委員	(主査)		
	教 授 熊原 雄一		
	(副査)		
	教 授 坂本 幸哉 教 授 和田 博		

論 文 内 容 の 要 旨

（目 的）

成長ホルモンは骨・軟骨の成長に重要な役割を果たしているが、このホルモンはソマトメジンを介して作用する事がよく知られている。しかしソマトメジンが骨・軟骨にどのように作用するのかは明確にされていない。そこで私は、Buffalo ラット肝細胞の細胞培養液よりソマトメジンの 1 種である MSA を分離精製し、ウサギの肋軟骨・骨移行部よりとり出した成長軟骨細胞を用いて、MSA の軟骨基質合成に及ぼす影響並びに細胞内 cyclic AMP (cAMP) level に及ぼす影響を検討した。

（方法ならびに成績）

MSA は Buffalo ラット肝細胞の血清無添加培養液より、Moses らの方法に準じて精製した。精製した MSA は Collaborative Research 社より購入した MSA と同じ比活性を軟骨細胞の DNA 合成および軟骨基質合成に対して示した。

実験に用いた軟骨細胞は、幼若雄ウサギの肋軟骨・骨移行部より成長軟骨部を無菌的に取り出し、EDTA・トリプシン・コラゲナーゼ処理を行い細胞を分離し、Eagle の MEN 培養液（10% ウシ胎仔血清含有）で培養したものを用いた。線維芽細胞は生後 3 ヶ月の乳児の皮膚より採取したもので、4 代から 10 代目を用いた。

Confluent に達した成長軟骨細胞を血清無添加培地で 24 時間前処置した後、培地を交換し、MSA と $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ を同時に添加して、軟骨基質合成への影響を検討すると、MSA は $0.2 - 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で著明に基質合成を促進した。

一方 Parathyroid hormone (PTH) も軟骨細胞の基質合成を促進することが知られており、この作用

は細胞内 cAMP を介して行なわれる事が判明している。そこで MSA を添加して軟骨細胞内および培養液中の cAMP level を測定した。MSA $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、細胞内・培養液中の cAMP に変化は認められなかった。

Anderson らは 1979 年ニワトリ胚の線維芽細胞で、MSA が prostaglandin E_1 (PGE_1) によって上昇した cAMP level を抑制すると報告している。そこで、軟骨細胞に PTH と MSA を添加して PTH により上昇した cAMP level に及ぼす MSA の影響を検討した。PTH 単独では cAMP は添加後 5 分で最高となりその後すみやかに減少した。しかしこの cAMP level は MSA を添加しても全く変化を認めなかった。MSA の濃度を $0.01 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ まで変化させても同じ結果であった。次に PGE_1 と MSA を軟骨細胞に添加し cAMP level を測定した。 PGE_1 単独では cAMP は添加後 5 分から 20 分で最高に達し、以後徐々に減少したが、MSA を同時に添加しても全く変化は認められなかった。そこでヒトより採取した線維芽細胞を用いて、 PGE_1 と MSA を加え、cAMP を測定したところ、Anderson らの報告にもみられた様に、MSA は線維芽細胞における PGE_1 による cAMP の上昇を抑制した。これらの結果より、MSA の作用機作は軟骨細胞と線維芽細胞と線維芽細胞とは異なる事が示唆された。

軟骨細胞での MSA の作用機作をさらに詳細に解明するため、MSA と dibutyl cyclic AMP ($(\text{Bu})_2 \text{cAMP}$) を用いて軟骨基質合成に及ぼす影響を $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ のとりこみを指標として検討した。添加後 7 時間で比較すると、MSA は 30% $(\text{Bu})_2 \text{cAMP}$ は 60% MSA と $(\text{Bu})_2 \text{cAMP}$ 同時添加では 170% の合成促進を示した。14 時間後では、MSA は 110%、 $(\text{Bu})_2 \text{cAMP}$ は 100%、MSA と $(\text{Bu})_2 \text{cAMP}$ 同時添加では 190% の合成促進を示し、相加的効果が認められた。又 ^3H -serine を用いて軟骨細胞の総蛋白や基質へのとりこみについても同様に検討した結果、 $(\text{Bu})_2 \text{cAMP}$ と MSA との同時添加群で相加的合成促進効果が認められた。

(総括)

Baffalo ラット肝細胞より精製したソマトメジンの 1 種である MSA は、培養成長軟骨細胞において細胞内 cAMP を介する事なく基質合成を著明に促進した。又 PTH や PGE_1 の cAMP 上昇効果に何ら影響を及ぼさなかった。これらの結果は線維芽細胞で認められる MSA による PGE_1 の cAMP 上昇を抑制する作用とは異なることから、軟骨細胞と線維芽細胞では MSA の作用機作が異なると考えられる。又軟骨細胞において MSA と cAMP analogue との蛋白合成および基質合成に対して認められた相加効果より、MSA (ソマトメジン) は軟骨細胞では cAMP とは関係なく DNA 合成、蛋白合成および基質合成を促進すると考えられる。

論文の審査結果の要旨

培養軟骨細胞で MSA が cyclic AMP を介さずソマトメジン作用を発現するというこの見解は、今まで不明確であったソマトメジンの軟骨細胞への作用機作を解明する為の 1 つの手がかりとなる。又、軟

骨細胞と線維芽細胞でのMSAの作用の相違はMSAの multiplication を示す新しい知見である。これら一連の研究は骨・軟骨の成長の機構の解明に大きく貢献し、医学の進歩に寄与するものとする。