

Title	内軟骨性骨形成における軟骨分化の調節と増殖分化因子の役割：軟骨前駆細胞株ATDC5による解析
Author(s)	太田, 嘉幸
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3128973">https://doi.org/10.11501/3128973</a>
DOI	10.11501/3128973
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	おお たい よし ゆき 太 田 嘉 幸
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 13072 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	内軟骨性骨形成における軟骨分化の調節と増殖分化因子の役割－軟骨前駆細胞株 ATDC5 による解析－
論文審査委員	(主査) 教授 作田 正義  (副査) 教授 伊集院直邦 助教授 開 祐司 講師 井上 博之

### 論文内容の要旨

#### 【研究目的】

胎生期の骨格形成は、主に内軟骨性骨形成によってもたらされる。その軟骨形成過程について見ると、未分化な軟骨前駆細胞は細胞凝集過程を経て増殖性の軟骨細胞へと分化し(軟骨初期分化)、さらに、細胞増殖の停止とともに軟骨細胞の成熟・肥大化を経て最終的に石灰化(軟骨後期分化)に至る。これら一連の細胞分化の進展に対する増殖分化因子の作用は、軟骨細胞の全分化段階を再現できる適当な *in vitro* 培養系の確立が困難であったために、系統的に解明することができなかった。最近、マウスクローン化細胞株 ATDC5 細胞培養系において、軟骨初期分化から石灰化に至る後期分化の全ての分化段階を再現可能であることが明らかとなった。そこで本研究では、本培養系を駆使して、軟骨細胞の多段階分化プログラムの進行に介在する増殖分化因子シグナルネットワークの実体を明らかにすることを試みた。

#### 【結果】

1) 軟骨初期分化に対する作用: コンフルエントに達した ATDC5 細胞(培養3日目)に各増殖分化因子を添加し、細胞凝集領域の形成と軟骨細胞の出現に対する作用を、細胞形態、DNA 合成、II 型コラーゲン mRNA の発現の面から検討した。BMP 添加群では、Insulin 非依存的に培養系のほぼ全領域で、細胞は細胞凝集過程を経ることなく軟骨細胞様に形態変化し、II 型コラーゲン遺伝子の発現誘導も観察された。従って、BMP は軟骨初期分化において、未分化細胞を軟骨細胞へと分化させる仲介シグナルとして機能すると考えられた。FGF 添加群では、未分化 ATDC5 細胞の再増殖が誘導され、培養系の飽和細胞密度は著明に上昇したが、軟骨細胞への分化は促進されなかった。Insulin や IGF-1 は、軟骨初期分化の前提となる細胞凝集領域の形成に関与することが示唆された。一方、PTHrP は未分化な軟骨前駆細胞に発現し、その作用は PTH と同様に PTH / PTHrP レセプターを介して発現する。そこで本研究では PTH (1-34) を添加して軟骨分化に対する作用を検討した。その結果、PTH は細胞凝集領域の形成を阻害しないが、これに続く軟骨細胞への分化を強く阻害した。

2) 軟骨後期分化に対する作用: 培養系に形成された軟骨細胞の増殖が停止する培養21日目から各増殖分化因子を添加して、細胞形態の変化、ALP 活性、X 型コラーゲン遺伝子の発現に対する影響を検討した。さらに、アリザリンレッド染色、細胞層のカルシウム含量の解析により軟骨基質の石灰化に対する作用を検討した。その結果、BMP の

みが軟骨後期分化の進行を促進し、軟骨基質の石灰化に対しても促進的に作用することが明らかとなった。一方、PTH 添加群では、分化した軟骨細胞に特有の形態を喪失するのみならず、後期分化を特徴付ける X 型コラーゲン遺伝子の発現ならびに II 型コラーゲン遺伝子の発現も強く抑制された。また、石灰化も強く抑制された。すなわち、PTH は軟骨細胞を未分化細胞へと脱分化させることにより軟骨後期分化の進行を強く阻害したと考えられた。

#### 【考察と結論】

ATDC 5 細胞培養系では未分化期から石灰化期に至る全ての段階で BMP-4 及びそのレセプターを発現することがすでに確認されている。従って、本研究の結果と合わせて考えると、ATDC 5 細胞における多段階分化の進展は、自らが産生する BMP によるオートクリンシグナルによって維持されていることが示唆された。これに対して、PTHrP が主に未分化な ATDC 5 細胞に発現すること、さらに PTH /PTHrP レセプターが細胞凝集期以降の軟骨細胞に発現する事がすでに確認されている。従って本研究の結果は、軟骨細胞の多段階分化が PTHrP によるパラクリンシグナルによって、負の制御を受けていることを示唆している。この様に、ATDC 5 細胞培養系における軟骨細胞の多段階分化プログラムの進行は、主に BMP と PTHrP による正負の制御シグナルのバランスにより調節されていることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、軟骨細胞の全ての分化段階を再現することができる軟骨前駆細胞株 ATDC 5 培養系を駆使して、軟骨細胞の多段階分化プログラムの進行に介在する増殖分化因子シグナルネットワークの機構を検討したものである。

その結果、Insulin や IGF-1 は、軟骨初期分化の前提となる細胞凝集領域の形成に関与し、ATDC 5 細胞における多段階分化の進展は、自らが産生する BMP によるオートクリンシグナルによって維持されていることが示唆された。一方、ATDC 5 細胞の多段階分化が PTHrP によるパラクリンシグナルによって、負の制御を受けていることも示唆された。すなわち、軟骨細胞の多段階分化プログラムの進行は、主に BMP と PTHrP による正負の制御シグナルのバランスにより調節されていることが明らかとなった。

以上のことから、本研究により軟骨細胞多段階分化の増殖分化因子による自律的進行のメカニズムが解明され、また今後の軟骨分化メカニズムの解析に対し、有用な指針が与えられた。よって、本論文は、博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認められる。