



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	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3128973
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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—

太 田 嘉 幸

①

博士論文

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—

大阪大学歯学部歯学研究科歯学臨床系専攻

(口腔外科学第二)

太田嘉幸

指導教授

大阪大学歯学部口腔外科学第二講座 作田正義 教授

序文

胎生期における四肢、体幹の骨格形成の大部分は、内軟骨性骨形成によりもたらされる^{1,2)}。すなわち、中胚葉由来（頭蓋、顎顔面領域では神経堤由来）の未分化間充織細胞が骨形成予定領域に凝集し、次いで軟骨細胞へと分化することにより軟骨性骨原基が形成される。骨原基内の軟骨細胞は増殖を続けながら、細胞外基質を分泌、形成し、やがてその増殖が停止する。増殖停止後は、骨原基中央部の細胞が肥大化し、細胞外基質の改変、石灰化に至る。このようにして形成された石灰化軟骨組織は周囲結合組織からの血管侵入を経て骨組織へと置換される。これら一連の組織変化に対応して、軟骨分化マーカーも特徴的に変化する。すなわち、未分化細胞の軟骨細胞への分化に伴い、II型コラーゲンが発現し、分化の進展とともにその発現は増加する³⁾。一方、細胞増殖が停止し、細胞体の肥大化へと分化が進展する頃には、X型コラーゲンが発現し、代わりにII型コラーゲンの発現が低下する⁴⁾。すなわち、軟骨細胞の多段階分化過程は、細胞増殖および細胞外基質の変化により大きく二段階に分けて考えることが可能で、未分化細胞が軟骨細胞に分化し増殖を停止するまでを軟骨初期分化、細胞増殖停止後、細胞体の肥大化を経て、細胞外基質の石灰化に至るまでを軟骨後期分化という（図1）⁵⁾。

現在までに、骨形成に関与する種々のホルモンや局所因子（増殖分化因子）が同定されてきた^{6,7)}。その軟骨分化制御機構の解析には、主として鶏胚肢芽間充織細胞やウサギ骨端成長板由来の軟骨細胞などin vitro 初代細胞培養系が用いられてきた。しかし、肢芽間充織細胞などの未分化細胞を軟骨細胞へと分化させるためには、細胞凝集段階に相当する人為的な高密度播種を必要とする¹⁰⁾。また、

初代培養系では培養当初より各分化段階の細胞が混在しており、特に初期分化を観察することが不可能である。その他、いくつかのクローン化軟骨細胞株樹立も報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。これらの細胞株では、分化効率が低かったり¹²⁾、軟骨細胞としての形質を十分に保持していない^{11,13)}ことなどから、細胞凝集に始まる軟骨細胞の全分化段階を系統的に解析することは困難であった。

最近、宿南ら^{15,16)}はマウスEC (Embryonal Carcinoma)細胞由来クローン化細胞株ATDC5¹⁷⁾を用いた培養系により、軟骨初期分化から後期分化に至る軟骨細胞の全分化段階をin vitroで忠実に再現できることを明らかにした。ATDC5細胞は、コンフルエントまでは線維芽細胞様の形態を示し、軟骨細胞に特徴的ないかなる分化マーカー (II型、X型コラーゲン、アグリカンなど)も発現していない。しかし、コンフルエント以降にInsulin存在下で培養すると、低細胞密度においても肢芽間充織にみられる細胞凝集段階を経て、軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞への分化と同時にII型コラーゲン、PTH (Parathyroid Hormone)/PTHrP (Parathyroid Hormone Related Peptide)レセプターの発現がみられ、これらの発現は軟骨細胞増殖停止まで増加する。また、軟骨特異的血管新生阻害因子であるコンドロモジュリン-I (ChM-I)¹⁸⁾の発現も認められる。細胞増殖停止後は、後期分化マーカーであるX型コラーゲンが発現する一方、II型コラーゲン、PTH/PTHrPレセプター、ChM-Iといった初期分化マーカーの発現は低下する。このように、ATDC5細胞培養系は、多段階にわたる軟骨細胞分化に対する増殖分化因子の作用を系統的に検討するのに極めて適していると考えられた。

そこで本研究では、ATDC5細胞培養系を用いて、軟骨初期、後期分化に対する種々の増殖分化因子の作用を解析することにより、軟骨細胞の多段階分化プロ

グラムの自律的進行が増殖や分化を制御する局所因子によってどのように調節されているかを検討した。

実験材料と方法

1. 実験に用いた増殖分化因子および試薬

rhBMP-2 (recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2、以下BMP-2と略す) は、J.M.Wozney 博士 (Genetics Institute、Cambridge、MA)より供与された。bTGF- β_2 (bovine Transforming Growth Factor- β_2 、以下TGF- β_2 と略す) はD.M.Rosen 博士 (Collagen Corporation、Paloalto、CA)より供与された。rhFGF-2 (recombinant human Fibroblast Growth Factor-2、以下FGF-2と略す)、rhIGF-I (recombinant human Insulin-like Growth Factor-I、以下IGF-Iと略す) は各々、R&D Systems (Mineapolis、MN)、GIBCO BRL (Grand Island、N.Y.)より購入した。bPTH(1-34) (bovine Parathyroid Hormone,1-34 fragment、以下PTH(1-34)と略す) はBachem (Torrance、CA)より購入した。各増殖分化因子は最終濃度の100倍溶液を0.1% BSA (bovine Serum Albin、Sigma、St.Louis、MO)を含むPhosphate Buffered Saline (PBS: Ca, Mg free)にて調製し、各実験の際には、培地の1/100量を添加した。 α - ^{32}P -dCTP (Amersham、UK)は、日本アイソトープ協会より購入した。

2. 細胞培養

ATDC5細胞の培養は、宿南の方法^{15,16)}に準じて行った。すなわち、6穴、12穴、48穴、96穴のマルチウエルプレート (Corning、N.Y.)に、ATDC5細胞をそれぞれ 6×10^4 個、 2×10^4 個、 1×10^4 個、 3×10^3 個播種した。培地は、細胞凝集段階を経て軟骨分化が誘導され、軟骨細胞の増殖が停止する培養3週間目までは、5%

ウシ胎仔血清 (FBS: JRH Biosciencies, Lenexa)、10 µg/mlのInsulin (I: ウシ膵臓製、和光純薬、大阪)、10 µg/mlのTransferrin (T: Boeringer Mannheim、Mannheim GmbH、Germany)、 3×10^{-8} M のSelenite (S: Sigma、St.Louis、MO)、50 µg/mlのKanamycin (明治製薬、東京) を加えたDF培地(Dulbecco's Modification of Eagle's Medium : Ham's F-12 Medium =1:1、Dainippon Pharmaceutical Co.,Ltd.、Australia) (以下、培地Aと略す) にて、5% CO₂気相下、37°Cで培養した。培養3週目以降は、培地Aと同様の添加物を加えた、α-MEM培地 (Alpha Modification of Minimum Eagle's Medium: Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) (以下、培地Bとする) にて、3% CO₂気相下、37°Cで培養を続け、後期分化を誘導した。培地交換は培地A、Bともに2日毎に行った。尚、各増殖分化因子を添加して3日以上培養する場合は、培地交換と同時に各因子を添加した。

3. BrdU (Bromodeoxyuridine)の細胞への取り込み量の測定

96穴マルチウエルプレートに細胞を播種し、培地Aにてコンフルエントまで培養した (培養3日目)。さらに培地交換を行わずに36時間培養した後、各増殖分化因子を添加し、24時間培養した。その後、0.1 nmol/wellのBrdUを培地に添加して4時間のパルスラベルを行った。BrdUの細胞への取り込み量の測定は、5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling Kit III (Boeringer Mannheim)を用いて行った。すなわち、10% FBSを含むPBSで細胞層を3回洗浄し、Ethanol・HCl溶液にて-20°C、30分間固定した。固定後、Nuclease、Anti-mouse-BrdU-Antibody-Peroxydase Conjugateにて各々37°C、30分間処理し、発色基質としてABTSTM (Boeringer Mannheim)を加え、室温にて10分間反応させた後、Model 450 Microplate Reader (Bio-Rad、California)を用いて405 nm (対照 490 nm) の吸光度を測定した。

4. Alkaline Phosphatase (ALP)活性測定、DNA定量

48穴マルチウエルプレートにて培養した細胞に、培養21日目より各増殖分化因子の添加を開始し、添加開始2日、7日目にALP活性を測定した。ALP活性の測定は、Besseyら¹⁹⁾の方法に若干の改良を加えて行った。すなわち、細胞層をPBSにて3回洗浄し、0.2% TritonX-100を含む0.9% NaClを加えて回収し、ホモジナイズした。これに、5 mM *p*-Nitrophenylphosphate (和光純薬) および0.5 mM MgCl₂を含む0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0)を添加し、37°C、15分間加温した。反応は、全体の1/4量の1 M NaOHを添加して停止し、Model 450 Microplate Reader (Bio-Rad)を用いて410 nmの吸光度を測定した。標準曲線の作成には*p*-Nitrophenol (和光純薬)を用いた。細胞数当りの活性を表示するために、各ウエルあたりのDNA定量をJohnson-Wintら²⁰⁾の方法に準じて行った。すなわち、試料に2倍体積の0.1 g/ml 3,5-Diaminobenzoic Acid Dihydrochloride (東京化成、東京)を添加し、65°C、45分間加温した。同体積の2 M HClを加えて反応を停止し、島津分光蛍光光度計 RF-5000 (島津製作所、京都)を用いて、波長420 nmにて励起された蛍光を波長510 nmで測定した。標準曲線の作成には、ウシ胸腺由来DNA (Sigma)を用いた。

5. RNAの調製、ノーザンブロットおよびスロットブロット

初期分化に対する作用の検討では、6穴マルチウエルプレートにて細胞を培養した。コンフルエントの時点で各因子を添加し、所定の時間にtotal RNAを抽出した。後期分化に対する作用の検討では、培養21日目に各増殖分化因子を添加し、所定の時間にtotal RNAを抽出した。total RNAは、細胞層をPBSにて3回洗浄した後、Guanidine Thiocyanate-Phenol-Chloroform法 (AGPC method)²¹⁾により抽出した。

ノーザンブロットでは、得られたtotal RNAをEthidium Bromideを含む Formaldehyde変性Agarose Gel (SeaKem GTG、FMC Bioproducts、Rockland、ME)に各レーン20 μ gずつ電気泳動した後、Nytran membrane (Schleicher & Schuell、New Hampshire)にTURBOBLOTTER (Schleicher & Schuell)を用いて転写し、80 $^{\circ}$ Cで2時間固定した。スロットブロットでは得られたRNAを4 μ gと1 μ gずつ40%の Formaldehydeと60%の20 \times SSC (1 \times SSC: 16.6 mM NaCl、16.6 mM C₆H₅O₇Na₃ · 2H₂O、pH 7.0) を含む溶液に溶解し、SRC072/0 S&S Minifold II (Schleicher & Schuell)を用いて、NY13N membrane (Schleicher & Schuell)に転写し、80 $^{\circ}$ Cで2時間固定した。固定後のメンブレンを、50% Formamide、0.5% SDS、6 \times SSPE (1 \times SSPE: 150mM NaCl、8.7mM Na₂H₂PO₄ · 2H₂O、1.25 mM EDTA、pH 7.4)、0.1% BSA (Albumin Bovine Fraction V、Calbiochem-Novabiochem Co.、La Jolla、CA)、0.1% Ficoll 400 (Pharmacia、Sweden)、0.1% Polyvinylpyrrolidone (和光純薬)、100 μ g/ml 熱変性 Salmon Sperm DNA (sigma)を含む溶液中で、42 $^{\circ}$ C、4時間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、 α -[³²P]-dCTPでラベルしたcDNAプローブを1 \times 10⁶cpm/mlの濃度で含むハイブリダイゼーション溶液中で、42 $^{\circ}$ C、15時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、0.1% SDS、2 \times SSPE溶液、および0.1% SDS、0.1 \times SSPE溶液にてそれぞれ55 $^{\circ}$ C、1時間ずつメンブレンを洗浄した後、CRONEX 増感紙 (Dupont)およびX-OMAT ARフィルム (Kodak、Rochester、N.Y.)を用いて-80 $^{\circ}$ Cでオートラジオグラフィーを行った。スロットブロットでもノーザンブロットと同様に、ハイブリダイゼーション、メンブレンの洗浄、オートラジオグラフィーを行った後、各バンドの濃淡をGS300 Scanning Densitometer (Hoefer Scientific Instruments、San Francisco)を用いて計測し、

各mRNAの発現量を定量化した。すなわち、GAPDH (Glyceraldehyde-3-Dehydrogenase) mRNAの発現量を対照としてその相対比を求めた。 [³²P] 標識 DNAプローブは、以下に示すcDNA断片をランダムプライマー法 (BcaBEST Labeling Kit、宝酒造、東京) を用いて α -[³²P]-dCTPで標識した。実験に用いた DNAプローブは 1×10^8 cpm/ μ g DNA以上の比活性があることを確認した。DNA プローブの調製に用いたcDNAは、rat ALP cDNAを含むプラスミドrAP54²²⁾の EcoRI断片 (全長 2.5kb) 、 rat II型 コラーゲン α 1鎖 cDNAを含むプラスミド pKT1180²³⁾のEcoRI断片 (C-末端プロペプチド部分をコードする断片; 1.4kb) 、 mouse X型コラーゲン α 1鎖 cDNAを含むプラスミドpSAm10h²⁴⁾のHind III断片 (0.65kb)、 rat PTH/PTHrP 受容体 cDNAを含むプラスミドpcDNA1R15BのEcoRI-XhoI断片 (ほぼ全長cDNA断片; 2.2kb) 、 mouse ChM-I cDNAを含むプラスミド C5-4のEcoRI断片を用いた。 mouse GAPDH cDNAは、 mouse GAPDH control amplimer set (Clontech, Palo Alto, CA)を用いて、 ATDC5細胞のtotal RNAより reverse transcription-polymerase chain reaction法 (RT-PCR)により増幅したものを使用した。

6. アリザリンレッド染色

12穴マルチウエルプレートにて細胞を培養し、培養21日目から各増殖分化因子を添加して培養を続けた。各因子の添加は、培地交換と同時に行った。培養42日目に、石灰化軟骨基質の形成をアリザリンレッド染色²⁵⁾により検出した。すなわち、細胞層をPBSにて3回洗浄した後、95% Methanolで固定し、アンモニア水にてpH6.4に調整した1% Alizarin Red S (和光純薬) で5分間染色した。その後、蒸留水にて脱色した。

7. カルシウム含量測定

アリザリンレッド染色の場合と同様の条件で細胞培養および各増殖分化因子の添加を行い、培養42日目に、細胞層のカルシウム含量を原子吸光法により測定した。すなわち、PBSにて3回洗浄し、95% Methanolで固定した細胞層を、1% Lanthanum Chloride (和光純薬) を含む 4 N HCl 溶液にて回収した。その溶液中のカルシウム含量は、島津原子吸光/フレイム分光光度計 AA-660型 (島津製作所) で、波長422.7 nmにおける吸光度を測定した。標準曲線の作成には、カルシウム標準液 (和光純薬) を用いた。

結果

1. ATDC5細胞軟骨初期分化に対する各増殖分化因子の影響

ATDC5細胞は¹⁵⁾、線維芽細胞様の未分化な細胞で、軟骨細胞に特有の分化形質を発現していない。しかし、旺盛な増殖能を示し、その倍加時間は約16時間で、コンフルエントに達すると、接触阻止により増殖が停止する。ところが、一旦コンフルエントに達したATDC5細胞を、Insulin存在下で培養すると、培養系内に細胞凝集領域が出現し、凝集領域内では未分化細胞が類円形の軟骨細胞へと分化する¹⁵⁾。分化したATDC5細胞は初代培養軟骨細胞と同様に、ゆっくり増殖 (倍加時間、約48時間) しながら、アルシアンブルー染色により濃染される軟骨基質を旺盛に分泌する。その後、典型的な軟骨結節を形成する¹⁵⁾。そこで、コンフルエントに達した (培養3日目) ATDC5細胞に各増殖分化因子を添加し、細胞凝集領域の形成と細胞形態の変化を位相差顕微鏡下で観察することにより軟骨初期分化に対する各因子の作用を検討した (図2-a)。さらに、BrdUの細胞への取り込み量

を指標として、DNA合成に対する影響を検討した（図2-a）。一方、未分化な軟骨前駆細胞が軟骨細胞へと分化すると、軟骨分化マーカーの一つであるII型コラーゲンmRNAが発現し、分化の進展とともにその発現量は増加する。そこで、コンフルエントに達したATDC5細胞に各増殖分化因子を添加し、添加2日後にtotal RNAを抽出した。このtotal RNAを用いてII型コラーゲンmRNAの発現に対する影響をノーザンブロットにより解析した（図2-a）。

(1) 細胞形態に対する影響

Insulinを含む培地Aにて培養した対照では、コンフルエントの2日後（培養5日目）より細胞凝集領域が出現した。細胞凝集領域内では、コンフルエントの5日後（培養8日目）より類円形の軟骨細胞への分化が観察された。その結果、コンフルエントの約10日後（培養13日目）には典型的な軟骨結節の形成が認められた（図3-a）。Insulinを含む培地Aに、BMP-2 (1000 ng/ml)を添加して培養すると、添加開始2日後までに培養系全体が軟骨細胞様の類円形の細胞へと変化した。しかし、細胞凝集領域の形成は認められなかった。その後、添加開始10日後まで培養を継続しても、細胞凝集領域の出現は認められなかったが、対照でみられた軟骨結節内の典型的な軟骨細胞と同様の類円形の細胞により占められていた。すなわち、BMP-2を添加すると、未分化細胞が細胞凝集領域の形成段階を経ることなしに、軟骨細胞へと分化したことが示唆された（図3-b）。一方、BMPと同様にTGF- β スーパーファミリーに属するTGF- β_2 (5 ng/ml)を添加すると、添加開始2日後までに、BMP-2と異なり、培養系全体が線維芽細胞様の紡錘形へと変化した。この場合にも、細胞凝集領域の形成は認められなかった。しかし、その後もTGF- β_2 を添加して

培養を継続しても、細胞形態は紡錘形のままで、軟骨細胞様の類円形の細胞は出現は認められなかった。すなわち、軟骨結節の形成は認められなかった（図3-c）。

FGF-2 (1 ng/ml)を添加すると、添加開始10日後まで観察しても、細胞形態に著明な変化は観察されなかった。このとき、コンフルエントの時点と比較して、細胞密度は軽度上昇した。この事実は、一旦増殖を停止した未分化なATDC5細胞の再増殖が誘導されたことを示唆していた。しかし、添加開始2日目以降には、培養系の細胞密度には変化は認められず、添加開始10日後まで培養を継続しても、細胞凝集領域の形成と軟骨細胞様の類円形の細胞の出現は認められなかった（図3-d）。FGF-2 (1 ng/ml)とTGF- β_2 (5 ng/ml)の共存下では、細胞密度の上昇と紡錘形細胞への形態変化が顕著に認められ、この場合でも培養を継続しても細胞凝集領域は形成されず、軟骨細胞様の類円形の細胞は出現は認められなかった（図3-e）。IGF-I (300 ng/ml)を添加すると、対照と同様に、細胞凝集領域の形成および細胞形態の変化を経て、軟骨結節が形成された。また、その時間的経過も対照と同様であった（図3-f）。

これに対して、PTH(1-34) (10^{-8} M)を添加すると、添加開始2日後には一旦細胞凝集領域の形成が認められた。しかし、細胞凝集領域内での軟骨細胞への分化は全く進行せず、類円形の細胞の出現は認められなかった（図3-g）。PTH(1-34)を添加して培養を継続すると、添加開始10日後までに、細胞凝集領域は消失し、コンフルエントの時と同様の扁平な細胞へと変化した（図3-g）。すなわち、PTH(1-34)の添加により、細胞凝集領域内での軟骨初期分化は強く阻害された。

次に、Insulin非存在下に未分化なATDC5細胞を培養すると、細胞はInsulin存在下と同様に培養3日目でコンフルエントに達した。しかしその後、細胞凝集領域の形成は認められず、さらにそれに続く軟骨細胞への分化は観察されなかった(図4)。一方、コンフルエント直後よりInsulin非存在下にBMP-2(1000 ng/ml)を添加して培養すると、添加開始2日後(培養5日目)までに、培養系全体が軟骨細胞様の類円形の細胞へと変化した。このとき、Insulin存在下にBMP-2を添加して培養した時(図3-b)と同様に、細胞凝集領域の形成は認められなかった(図4)。また、Insulin非存在下にTGF- β_2 (5 ng/ml)を添加すると、添加開始2日後(培養5日目)までに、Insulin存在下にTGF- β_2 を添加して培養した時(図3-c)と同様に、培養系全体が線維芽細胞様の紡錘形の細胞へと変化した。この間、細胞凝集領域の形成は認められなかった(図4)。すなわち、BMP-2やTGF- β_2 が未分化なATDC5細胞の形態に対して及ぼす作用は、Insulinを添加しなくても発現した。特に、BMP-2がInsulin非存在下においても、軟骨細胞への分化を誘導することは、BMPが強い軟骨分化誘導因子として作用することを示す点で、特に注目された。Insulin非存在下では、未分化なATDC5細胞は細胞凝集領域を形成せず、これに続く軟骨分化も誘導されない。本研究において検討した各増殖分化因子のなかでは、唯一、InsulinあるいはIGF-Iだけが細胞凝集領域の形成を誘導し、これに続く軟骨分化を誘導した。これらの結果は、InsulinあるいはIGF-Iシグナルが軟骨分化に先行する細胞凝集領域の形成に関与することを示唆している。

(2) DNA合成に対する影響

BrdUの取り込みを指標として、未分化なATDC5細胞のDNA合成に対す

る増殖分化因子の影響を検討した。予備実験の結果、コンフルエントに達したATDC5細胞を血清刺激すると、BrdUの取り込みの経時的变化は刺激開始24~28時間で最大に達した(データ示さず)。そこで、コンフルエントに達したATDC5細胞に各増殖分化因子を添加し、24~28時間後のBrdUの取り込みを測定した。その結果、FGF-2 (1 ng/ml)を添加すると、BrdUの取り込みは対照と比較して約2倍に上昇することが明らかとなった(図5)。FGF-2 (1 ng/ml)とTGF- β_2 (5 ng/ml)の共存下では、BrdUの取り込みはFGF-2単独よりもさらに上昇し対照の約3.2倍に達した(図5)。一方、IGF-I (300 ng/ml)のDNA合成促進作用はFGF-2より弱かった(図5)。一方、未分化細胞の細胞形態を変化させたBMP-2 (1000 ng/ml)やTGF- β_2 (5 ng/ml)、軟骨初期分化を阻害したPTH(1-34) (10^{-8} M)を添加した場合には、対照と比較して同程度の取り込みが認められた。また、添加48時間後の細胞数をDNA定量により検討したところ、BrdUの取り込み促進作用に対応して、細胞数が増加することが確認された(データ示さず)。すなわち、FGF-2は、未分化なATDC5細胞の増殖を促進することが示された。

これに対して、未分化細胞の細胞形態に著明な影響を与えたBMP-2 (1000 ng/ml)やTGF- β_2 (5 ng/ml)は、対照と比較して明らかなDNA合成促進作用を示さなかった。また、軟骨初期分化の進行を阻害したPTH(1-34) (10^{-8} M)は、ATDC5細胞のDNA合成や増殖には明らかな影響を与えなかった。

(3) II型コラーゲンmRNAの発現に対する影響

コンフルエントに達した未分化なATDC5細胞培養系に各増殖分化因子を添

加し、添加2日後（培養5日目）のII型コラーゲンmRNAの発現をノーザンブロットにより検討した。ATDC5細胞培養系は、軟骨細胞の出現とともにII型コラーゲンmRNAの発現が誘導される¹⁵⁾。従って、コンフルエントから2日後の時点ではII型コラーゲンmRNAの発現は検出できるものの、その発現レベルは極めて低い状態にあった（Control, 図6-a）。ところが、BMP-2を添加すると、添加2日後には細胞形態が軟骨細胞様に変化すると共に、II型コラーゲンmRNAの著明な発現増加が認められた（図6-a）。II型コラーゲンmRNAに対するBMP-2の発現促進作用は、濃度依存的で100 ng/ml以上の濃度で明らかに認められた（図7）。また、II型コラーゲンmRNAの発現増加は、Insulin非存在下でもBMP-2を添加すると、細胞形態が類円形に変化すると共に、II型コラーゲンmRNAの発現増加が観察された（図6-a）。一方、TGF- β_2 (5 ng/ml)を添加すると、添加2日後では細胞形態は紡錘形へと変化し、軟骨細胞様の類円形に変化しなかったにもかかわらず、II型コラーゲンmRNAの発現の著しい増加が認められた（図6-a）。FGF-2 (1 ng/ml)が共存するとTGF- β_2 の発現促進作用は低下するものの、II型コラーゲンmRNAの発現レベルは対照と比較して明らかに増加した（図6-b）。すなわち、細胞の形態変化と、II型コラーゲンmRNAの発現の両面を考慮すると、BMPは唯一ATDC5細胞の軟骨初期分化の促進作用を示した。一方、TGF- β_2 はII型コラーゲンmRNAの発現を促進するものの、細胞形態は軟骨特有の類円形に変化しなかった。従って、TGF- β_2 はATDC5細胞の軟骨分化因子として機能しなかった。しかし、ATDC5細胞の軟骨分化機能を修飾する強力な作用を持っていると考えられた。

ATDC5細胞の増殖促進作用が認められたFGF-2 (1 ng/ml)やIGF-I (300 ng/ml)

を添加しても、添加2日後に著明な細胞形態の変化はなく、II型コラーゲン mRNAの発現レベルにも著明な変化は認められなかった（図6-a）。一方、PTH(1-34) (10^8 M)を添加すると、II型コラーゲンの遺伝子発現は強く阻害され、そのmRNAの発現は検出できなかった（図6-a）。すなわちPTH(1-34)は、II型コラーゲン遺伝子の発現の面からみても、ATDC5細胞の軟骨分化を強力に阻害することが示唆された。

2. ATDC5細胞軟骨後期分化に対する各増殖分化因子の影響

ATDC5細胞培養系では¹⁶⁾、Insulinにより軟骨初期分化が誘導された後、軟骨分化した細胞の増殖に伴う軟骨結節の増大は、培養開始後約3週間で終了する。その後、適切な培養条件を選択することにより軟骨後期分化を誘導することができる。すなわち、軟骨結節内に肥大化軟骨細胞の出現を経て最終的にアリザリンレッド染色により濃染される細胞外基質の石灰化を誘導することができる。図8¹⁶⁾には、ATDC5細胞培養系の軟骨初期分化から細胞外基質の石灰化に至るまでの軟骨分化マーカー遺伝子のmRNAの発現パターンを示した。すなわち、X型コラーゲン mRNAは、軟骨初期分化期にはその発現は認められない。その後、軟骨細胞の増殖が停止し、軟骨後期分化に移行すると発現し、さらに肥大化軟骨細胞の出現に同調して急激にその発現レベルが増加する。一方、II型コラーゲン、PTH/PTHrPレセプター、ChM-Iといった、軟骨初期分化マーカーのmRNAの発現レベルは、軟骨後期分化に移行すると低下する。また、ALP mRNAは、ATDC5細胞培養系において未分化段階から発現しているものの、軟骨分化の進展とともにその発現レベルは増加する。そして、培養系が石灰化を開始する時期に発現レベルは最大に達する¹⁶⁾。そこで、軟骨結節の形成が停止した培養21日目から培地交換

毎に各増殖分化因子を添加し、軟骨後期分化に対する各因子の影響を観察した（図2-b）。ATDC5細胞培養系のALP活性は、肥大化軟骨細胞の出現とともに急速に上昇し始め、細胞外基質の石灰化の開始と相関してALP mRNAレベルの変化より一層著明に上昇する¹⁶⁾。従って、ALPは軟骨後期分化の進行とともに活性上昇を示すマーカー酵素とされている。そこで、培養21日目より0.5% FBS、Insulin、Transferrin、Seleniteを含む α -MEM培地にてpreincubationを行い、培養22日目に各増殖分化因子を添加し、培養系のALP活性を添加2日後（培養24日目）および7日後（培養29日目）に測定した。同時に、培養系のDNA定量を行い、DNA量当りのALP活性（すなわち一定細胞数当りのALP活性）を比較した（図2-b）。さらに、培養21日目より0.5% FBS、Insulin、Transferrin、Seleniteを含む α -MEM培地にてpreincubationを行い、各増殖分化因子を培養22日目より添加し、添加2日後（培養24日目）にtotal RNAを抽出した。そのtotal RNAを用いて、軟骨分化マーカー遺伝子（II型コラーゲン、X型コラーゲン、PTH/PTHrP レセプター、ChM-I）およびALP mRNAの発現レベルに対する各増殖分化因子の影響を、ノーザンブロットにより解析した（図2-b）。

軟骨後期分化が進行すると、ATDC5細胞培養系は最終的に細胞外基質の石灰化に至る。そこで、各増殖分化因子が細胞外基質の石灰化に与える影響を検討した。すなわち、各増殖分化因子を増殖停止後（培養21日目）より培地交換毎に添加して培養した。培養42日目（添加開始21日目）にアリザリンレッド染色を行い、培養系のカルシウム含量を原子吸光法により定量した（図2-b）。

(1) 細胞形態に対する影響

培養21日目よりInsulinを含む培地Bにて培養した対照では、培養28日目頃

から軟骨結節内に肥大化軟骨細胞の出現が観察された(図9)。培養35日目頃から、培養系に位相差顕微鏡下に光不透過な領域が出現した。この不透過物の性状を透過型電子顕微鏡やFourier transform infrared spectroscopyにより解析すると、細胞外基質にヒドロキシアパタイトが蓄積された結果であることが示されている¹⁶⁾。そこで、Insulin存在下にBMP-2 (1000 ng/ml)を添加して培養すると、対照と比較して4~5日早期(培養24~25日目)に、軟骨結節内に肥大化軟骨細胞が出現することが観察された。さらに培養を継続すると、対照よりも4~5日早期(培養30~31日目)に細胞外基質の石灰化の開始が誘導された(図9)。一方、石灰化に至るまで、軟骨結節周囲の細胞形態には著明な変化は認められなかった。すなわち、培養系にBMP-2を添加することにより、対照と比較して軟骨後期分化の誘導が促進されることが示唆された。

これに対して、PTH(1-34) (10^{-8} M)を添加すると、添加開始2日後から、一旦形成された軟骨結節内の細胞密度が減少した。加えて、軟骨結節内の細胞は結節周囲の細胞と同様に、未分化細胞様の扁平な形態へと変化した(図9)。その結果、軟骨結節の構造が崩れ、肥大化軟骨細胞の出現は認められなかった。また、培養42日目に至っても細胞外基質の石灰化は観察されなかった。すなわち、PTH(1-34)により軟骨後期分化の進行は阻害されたのみならず、一旦形成された軟骨結節が分化した軟骨細胞の脱分化のために維持されないことが示唆された。IGF-I (300 ng/ml)は、Insulin含有培地における肥大化細胞の出現と細胞外基質の石灰化の誘導を修飾しなかった。TGF- β_2 (5 ng/ml)やFGF-2 (1 ng/ml)を添加すると、対照と同様に培養28日目頃から軟骨結節内に肥大化軟骨細胞の出現が観察された。しかし、対照と比較してその数は少なかった。

また、培養を継続しても細胞外基質の石灰化には至らなかった。しかし、PTH(1-34)を添加した時と異なり、軟骨結節内の細胞密度には変化なく、また軟骨結節内の細胞形態にも著明な変化は認められなかった（データ示さず）。

(2) ALP 活性に対する影響

培養21日目よりInsulin存在下にpreincubationを行った後、培養22日目より各増殖分化因子を添加し、DNA量当りのALP活性を測定した。ATDC5細胞培養系のALP活性は、未分化期（培養3日目）では1 nmol/min/ μ g DNA以下と極めて低く、測定感度以下であった。その後、軟骨分化の進行とともにALP活性は上昇し、培養22日目でのALP活性は約5 nmol/min/ μ g DNAであった（図10）。その後も軟骨結節内に肥大化軟骨細胞が位相差顕微鏡下に確認されるにつれて経時的に上昇し、培養29日目では約7.7 nmol/min/ μ g DNAに達した（図10）。その後、培養系が石灰化に至った培養42日目には、ALP活性は約40 nmol/min/ μ g DNAに達した。

培養22日目よりBMP-2 (1000 ng/ml)を添加して培養すると、添加開始7日後（培養29日目）でのDNA量当りのALP活性は、約17.5 nmol/min/ μ g DNAに上昇し、対照の約2.3倍に達した（図10）。BMP-2によるALP活性亢進は、添加開始2日後（培養24日目）にはすでに測定可能であったので、種々の濃度のBMP-2を添加して、ALP活性に対する影響を添加2日後に検討した（表1）。その結果、10 ng/mlから明らかにALP活性の亢進が認められ、BMP-2の濃度依存的にALP活性は上昇した。Insulin存在下にIGF-I (300 ng/ml)を添加しても、培養系のALP活性の上昇に著明な変化は認められなかった（図10）。

一方、肥大化軟骨細胞の出現を阻害したTGF- β_2 (5 ng/ml)、FGF-2 (1 ng/ml)、PTH(1-34) (10^{-8} M)を添加すると、添加開始7日後の時点で肥大化軟骨細胞の出現は認められず、その時点でのALP活性はいずれも約 2.5~4 nmol/min/ μ g DNAのレベルに留まった(図10)。すなわち、検討した各因子の内、BMP-2が唯一ALP活性の上昇を促進した。

(3) マーカー遺伝子の発現に対する影響

培養21日目よりInsulin存在下にpreincubationを行った後、培養22日目より各増殖分化因子を添加し、各種の遺伝子発現に対する影響を添加2日後(培養24日目)に検討した。培養24日目の対照ではX型コラーゲンmRNAの発現が認められたことから、培養系の分化段階が後期分化段階に移行していることが示唆された(図11-a)。後期分化の移行過程にあるATDC5細胞培養系にBMP-2 (1000 ng/ml)を添加すると、肥大化軟骨細胞の早期の出現に対応して、X型コラーゲンmRNAの発現レベルの変化は、添加6時間以内には早くも認められ、その後経時的に増加した(図13)。その後、添加2日後におけるX型コラーゲンmRNAの発現レベルは、対照の約9倍と著明に増加した(図11a,b)。一方、軟骨結節内の細胞を扁平な未分化細胞様の形態に変化させたPTH(1-34) (10^{-8} M)を添加すると、X型コラーゲンmRNAの発現レベルは添加6時間以内から減少し始め、その後経時的に減少した(図14)。その後、添加2日後におけるX型コラーゲンmRNAの発現レベルは、確認できない程度にまで低下した(図11a,b)。一方、TGF- β_2 (5 ng/ml)、FGF-2 (1 ng/ml)は、対照と比較してX型コラーゲンmRNAの発現レベルに大きな変化を与えなかった(図11a,b)。

次いで、ALP mRNAの発現に対する各因子の影響を検討した。唯一培養系

のALP活性を著明に亢進させたBMP-2は、ALP mRNAの発現レベルも添加6時間以内から上昇させ（図13）、添加2日後では対照と比較して約7.5倍に上昇させた（図11a,c）。一方、ALP活性の上昇を抑制したPTH(1-34)では、24時間以内からALP mRNAの発現レベルが低下し始め（図14）、添加2日後では対照の約0.47倍に低下した（図11a,c）。しかし、TGF- β_2 、FGF-2は、PTH(1-34)と同様にALP活性の上昇に対しては明らかに抑制的に作用したが、ALP mRNAの発現にはほとんど影響を与えなかった（図11a,c）。後期分化期においてIGF-I (300 ng/ml)はInsulin存在下に培養したATDC5細胞の形態、ALP活性の上昇に著明な影響を与えなかったが、X型コラーゲンおよびALP mRNA発現に対しても顕著な作用は認められなかった（図11a,b,c）。

軟骨後期分化への移行に伴い、初期分化マーカーであるII型コラーゲン mRNAの発現レベルは分化の進展とともに低下する（図8）。また、PTH/PTHrP レセプター、ChM-I mRNAの発現レベルも、分化の進行とともに低下する（データ示さず）。後期分化の移行段階にある培養系にBMP-2を添加すると、II型コラーゲンmRNAの発現レベルは、添加後48時間以内に 対照と比較して明らかに低下した(図12-a,b、図14)。すなわち、BMP-2は後期分化マーカーであるX型コラーゲンmRNAの発現を促進し、初期分化マーカー遺伝子のmRNAの発現を低下させたことから、軟骨後期分化の進展を促進した。一方、PTH(1-34)を添加すると、添加6時間以内にII型コラーゲンmRNAの発現は減少し始め（図14）、添加2日後にはその発現レベルは確認出来ないほど低下した（図12-a,b）。また、PTH/PTHrP レセプター、ChM-I mRNAの発現レベルも低下した（図12-a,c,d）。すなわち、PTH(1-34)については、軟骨後期分化

の指標となる遺伝子群のみならず、軟骨初期分化の指標となるマーカー遺伝子の発現を低下させたことから、軟骨細胞を未分化状態へと脱分化させたと考えられた。TGF- β_2 はII型コラーゲンなどの初期分化マーカー遺伝子mRNAの発現に対しては、対照と比較してこれらの発現レベルを低下させたが（図12-a,b,c,d）、X型コラーゲンmRNAの発現に対しては顕著な作用を示さなかった。FGF-2またはIGF-Iは、II型コラーゲン、PTH/PTHrPレセプター、ChM-Iなどの軟骨初期分化を特徴付けるマーカー遺伝子群の発現レベルに、顕著な影響を与えなかった（図12-a,b,c,d）。

(5) 細胞外基質の石灰化に対する影響

培養42日目（増殖分化因子添加開始21日目）に、アリザリンレッド染色により培養系の石灰化の程度を検討した。対照では培養35日目頃から軟骨結節の中心部に小さく確認された細胞外基質の石灰化が徐々に進行し、培養42日目には培養系にアリザリンレッド染色により濃染される軟骨結節が数多く認められた（図15）。BMP-2 (1000 ng/ml)を添加しながら培養すると、対照より明らかに広範囲で細胞外基質の石灰化が認められた（図15）。逆にTGF- β_2 (5 ng/ml)、FGF-2 (1 ng/ml)、PTH(1-34) (10^{-8} M)を添加して培養すると、培養系にはほとんどアリザリンレッドに染色される軟骨結節は観察されず、石灰化は著明に抑制された（図15）。Insulin存在下にIGF-I (300 ng/ml)を添加しても、培養系の石灰化にほとんど影響を与えなかった（図15）。次いで、細胞外基質の石灰化の進行の程度を細胞層のカルシウム含量として定量的に解析した。培養系内に肉眼的に明らかな石灰化軟骨結節の形成を認める培養35日目以前の段階では、細胞層のカルシウム含量は1 $\mu\text{g}/\text{well}$ 程度であった（図16）。石

灰化軟骨結節の形成とともに増加し、培養42日目の時点では約25 $\mu\text{g}/\text{well}$ のカルシウムが検出された(図16)。これに対して、BMP-2を添加しながら培養すると、培養42日目の時点での細胞層のカルシウム含量は約45 $\mu\text{g}/\text{well}$ に上昇し、対照の約1.8倍に達した(図16)。一方、TGF- β_2 、FGF-2、PTH(1-34)を添加した時のカルシウム含量は2~3.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ でほとんどカルシウムの蓄積は認められず、これらの増殖分化因子が細胞外基質の石灰化を抑制することが明らかとなった(図16)。IGF-Iを継続して添加して培養するとカルシウム含量は約18 $\mu\text{g}/\text{well}$ を示し、軽度の石灰化抑制傾向を示した(図16)。

考察

近年のin situ hybridization 法による遺伝子の発現局在の解析や遺伝子ノックアウトマウスにおける組織変化の検討により、細胞分化の進展には、複数の増殖分化因子によりなる巧妙なシグナルネットワークが存在することが明確になってきた²⁾。ところで、軟骨初期分化は、未分化な間充織細胞の凝集と凝集領域内での軟骨細胞の出現に特徴付けられる。そこで、従来、軟骨初期分化の制御機構を解析する目的には、鶏胚肢芽から分離した未分化間充織細胞を用いたin vitro細胞培養系が用いられてきた。この培養系で軟骨細胞への分化を誘導するには、 2×10^7 cells/cm³もの高い播種密度を用いる必要があった¹⁰⁾。しかし、このような条件下においても、軟骨細胞への分化効率は低く、同時に筋芽細胞や骨芽細胞への分化も観察される。また、細胞凝集領域の形成を誘導するには、人為的な高密度播種を必要とするため、細胞凝集領域の形成過程を生化学的に解析することは困難であった。そこで、軟骨初期分化の制御機構を遺伝子レベルで解析するためには、

未分化細胞の凝集と凝集領域内での軟骨細胞への分化を効率よく再現することのできるクローン化細胞株の樹立が望まれていた。最近、ATDC5細胞培養系が、低密度単層培養でも未分化細胞の凝集と凝集領域内での軟骨細胞への分化を効率よく再現することのできるクローン化細胞株であることが判明した¹⁵⁾。即ち、ATDC5細胞株は、軟骨組織幹細胞の性格を良く保持しているクローン化細胞株であると考えられる。そこで、本研究では、種々の局所性増殖分化因子が軟骨初期分化の誘導にどのような役割を果たしているかについて、ATDC5細胞培養系をモデルに検討した。

BMPにはBMP-1からBMP-13のhomologueがあり、その内、BMP-2からBMP-13がTGF- β スーパーファミリーに属する。特に、BMP-2、4、5、7については、ラットやマウスの皮下あるいは筋膜下に移植すると、in vivoで軟骨分化を誘導して異所性に骨形成を誘導することが明らかにされている²⁶⁾。これに対応して、BMPの軟骨分化促進作用は、種々のin vitro細胞培養系においても検討されてきた²⁷⁻³⁰⁾。その結果、軟骨型のプロテオグリカン合成の促進、II型コラーゲンmRNA発現の促進など、軟骨細胞の保持する形質の発現促進作用をもつことが明らかとなった。しかし、軟骨分化の鍵を握る細胞凝集領域の形成過程と軟骨分化誘導におけるBMPの役割は必ずしも明確ではなかった。

未分化なATDC5細胞はI型コラーゲンを発現し、線維芽細胞様の形態を呈する¹⁵⁾。しかし、Insulin添加培地で培養すると、一旦コンフルエントに達した後、特有の細胞凝集領域を形成し、さらに凝集領域内に類円形の形態を有する軟骨細胞が出現する¹⁵⁾。これに伴って、細胞が発現するコラーゲンタイプもI型からII型に転換した¹⁵⁾。このようにして出現した軟骨細胞は未分化細胞に比べて緩やかな増

殖を続け、肢芽間充織細胞培養系で見られた様な軟骨結節を形成した(図3)。この時、分化した軟骨細胞は培養系に形成された細胞凝集領域内においてのみ出現し、凝集領域外の細胞は扁平な未分化細胞として留まった。すなわち、Insulinによる細胞凝集領域の形成が培養系内で「細胞分化の場」を空間的に分節化することに作用していると考えられ、培養系内は三次元的に緩やかな成長をする軟骨結節と、接触阻害により増殖を停止した未分化細胞の領域とに不均化した(図3)。

ところが、コンフルエントに達した未分化なATDC5細胞にBMP-2 (1000 ng/ml)を添加すると、細胞凝集領域が形成されないまま培養系の全領域で細胞が軟骨細胞に分化した(図3,6)。この結果は、高濃度のBMP-2が未分化なATDC5細胞に対して強い軟骨分化誘導因子として作用する事を示唆する一方、細胞凝集領域の形成段階を経ないで軟骨分化を誘導したことを示唆している。すなわち、BMP添加培地では、軟骨結節の形成として表れる培養系内の分節化が起らなかった。このような、「培養系の分節化」を伴わない軟骨初期分化は、通常、軟骨分化が誘導されないInsulin無添加培地にBMP-2を添加しても、同様に誘導することができた(図4)。

すでに報告されているように¹⁵⁾、IGF-Iは、Insulinと同様に細胞凝集領域の形成を経て、軟骨初期分化を誘導する。従って、Insulin/IGF-Iシグナルは、細胞凝集領域の形成あるいは培養系の「分節化」に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、図5で示したようにIGF-IあるいはInsulinは、コンフルエントに達した未分化なATDC5細胞に対して、弱い増殖促進活性を示した。これに対して、BMPには細胞増殖促進活性を認めなかった。従って、細胞凝集領域の形成には、Insulin

あるいはIGF-Iの細胞増殖促進活性が重要な働きをしている可能性が考えられた。

ところで、FGF-2は、間充織由来の様々な細胞に対して著明な細胞増殖促進活性を示す³¹⁾。特に、骨髄由来のmesenchymal stem cellに作用して軟骨組織幹細胞の増殖を促進し、その結果、in vivoで軟骨形成を誘導することが明らかとなっている³²⁾。そこで、FGF-2を添加して、コンフルエントに達した未分化なATDC5細胞に対する増殖促進活性を検討すると共に、軟骨初期分化に対する影響を観察した。FGF-2が未分化なATDC5細胞の増殖を促進することは、DNA合成促進活性(図5)やDNA定量のみならず位相差顕微鏡下の観察でも明らかであった(図3)。また、TGF- β が共存すると、一層著明な増殖促進活性を示した(図3,5)。しかし、細胞凝集領域の形成のみならず、それに続く軟骨分化の誘導も促進されることはなかった(図3)。

これらの結果は、Insulin/IGF-Iシグナルによる細胞凝集領域の形成が、その細胞増殖促進活性のみに基づくものではないことを示唆している。事実、鶏胚肢芽における軟骨分化に先立ってみられる細胞凝集領域をin vivoで観察した結果では、間充織での細胞密度の上昇が観察されるものの、せいぜい60%程度の密度上昇であった³³⁾。間充織の分節化には、細胞増殖よりはむしろ細胞接着³⁴⁻³⁶⁾や運動性³³⁾などの細胞間相互作用の変化に着目する必要がある。現在のところ、Insulinがどのような分子メカニズムに基づいて細胞凝集領域の形成を促進するのか、全く明らかにされていない。しかし、発生過程の鶏胚肢芽間充織には、Insulin特異的な受容体が存在すること、さらに、Insulinそのものも存在する可能性が指摘されている³⁷⁾。従って、間充織の分節化におけるInsulin/IGF-Iシグナルの特異的な役割については、ATDC5細胞培養系を用いて、さらに解析する必要があると考えら

れる。

秋山ら³⁸⁾は、ATDC5細胞が未分化期から軟骨初期分化を経て石灰化に至る全ての分化段階で、BMP-4およびBMPレセプターIAを発現していることを示した。これらの結果は、ATDC5細胞培養系においては、内因性のBMP-4によるオートクリンシグナルループが作動する可能性を強く示唆している。ところで、BMP-2とBMP-4はともにBMPレセプターIAを介して作用を発現することが知られている^{39,40)}。すでに述べたように、未分化なATDC5細胞は、培養系に高濃度のBMP-2を添加すると、培地中にInsulinが存在しなくても軟骨細胞に分化した。この事実は、BMP-4 オートクリンシグナルループが作動すれば、Insulinが存在しなくてもATDC5細胞は軟骨細胞に分化することを示している。従って、コンフルエントに達した単層のATDC5細胞が発現するBMP-4は、培地中に散逸するためにオートクリンシグナルループを作動させるに十分な実効濃度に到達しなかったものと推定される。Insulin/IGF-Iによる細胞凝集とそれに伴う細胞間相互作用の変化によって、凝集領域内で内因性BMP-4によるオートクリンシグナルループが作動した結果、凝集領域内においてのみ軟骨分化が誘導されたと考えられる(図17)。このような軟骨初期分化の制御モデルは、BMP遺伝子の発現が軟骨形成に先立つ細胞凝集領域に特に強く認められるとするin situ hybridizationの結果とも一致する^{41,42)}。ここに提出した分化制御モデルは、細胞凝集領域内のオートクリンシグナルループを遮断することによってさらに実体的に証明する事が可能であり、現在、解析を進めている。

一方、TGF- β はBMPと同じTGF- β スーパーファミリーに属している。本研究で用いたTGF- β_2 はTGF- β_1 とともに、脱灰骨基質から軟寒天中でNRK線維芽細胞様

細胞の軟骨への分化転換を誘導する因子 (Cartilage Inducing Factor)として発見された^{43,44}。岩崎らは、TGF- β がin vitroで培養したラット頭蓋冠由来の未分化細胞を軟骨細胞へと分化させることを報告している⁴⁵。しかし、BMPと異なり、皮下または筋膜下に移植しても異所性の軟骨形成を誘導しない。未分化なATDC5細胞にTGF- β_2 を添加すると、II型コラーゲンmRNAの発現を誘導するものの(図6)、軟骨細胞様の形態をもつ細胞は出現しなかった(図3)。細胞は、むしろ、線維芽細胞様の紡錘形に変化した。FGFが共存すると、一層著明な細胞形態の変化を示した(図6)。これらの結果は、TGF- β が軟骨初期分化に対して何らかの役割を果たす可能性を示唆するものの、アミノ酸配列の上で相同性を有するBMPの軟骨分化誘導作用とは著しく異なっていた。

PTH/PTHrPレセプターはアデニル酸シクラーゼ活性を有する細胞膜レセプターで、骨や腎におけるPTHの作用を仲介する^{46,47}。一方、PTHrPは局所産生される因子で、胎生期には内軟骨性骨形成に重要な役割を果たしていると推定されている⁴⁸。PTHならびにPTHrPは、そのレセプター結合領域であるN-末端アミノ酸配列に高い相同性を有している⁴⁹。内軟骨性骨形成においては、PTHrPがPTH/PTHrPレセプターを介してその作用を発現すると考えられている⁵⁰。骨形成過程におけるPTHrPの発現は骨原基周囲の未分化間充織細胞に高く⁵¹、細胞分化に伴って軟骨細胞に発現するPTH/PTHrPレセプターを介してその作用を発現すると考えられている¹⁵。すなわち、PTHrPはPTH/PTHrPレセプターを介するパラクリンシグナルとして、軟骨分化の制御に関与していると考えられる。そこで、本研究では、完全なレセプター結合能ならびに活性化能を有するPTHアナログである

PTH(1-34)を用いて、PTHrPによるパラクリンシグナルが軟骨細胞の分化制御にどのような役割を果たすのか検討した。その結果、PTH(1-34)は、ATDC5細胞の細胞形態（図3）ならびに軟骨初期分化の指標となるII型コラーゲン遺伝子の発現に及ぼす作用（図6）から、軟骨初期分化の進展を阻害する強力な作用を示すことが明らかとなった。BMPの作用とは逆に、細胞形態、遺伝子マーカーの発現の点で、明らかにATDC5細胞の軟骨初期分化の進展を阻害した（図3,6）。

PTHrP遺伝子を欠失させたノックアウトマウスでは、軟骨分化の進行とそれに続く内軟骨性骨形成に明らかな異常が認められることが報告されている^{48,52,53}。すなわち、PTHrP遺伝子欠失マウスでは、形成された長管骨の形態学的な観察から軟骨初期分化ならびに後期分化の早急な進展が誘導されたことが推定されている^{48,52}。また、Jansen型軟骨形成不全症がPTH/PTHrPレセプター遺伝子の変異によることが判明し、PTH/PTHrPレセプターの恒常的活性化によって軟骨形成不全がもたらされることが報告された⁵⁴。従来より、ウサギ肋軟骨成長細胞による初代培養系を用いた研究により、軟骨細胞におけるPTH/PTHrPレセプターの活性化は、細胞のプロテオグリカン合成の促進ならびに細胞増殖促進をもたらすと報告されてきた⁵⁵。しかし、上記に示したPTHrP遺伝子欠失マウスやJansen型軟骨形成不全症が示す骨格形成異常は、PTHやPTHrPの軟骨細胞に対する増殖ならびに分化促進作用を前提としては説明することが著しく困難であった。事実、PTHrP遺伝子欠失マウスにおけるH4ヒストンmRNAの発現レベルから推定した軟骨細胞の増殖速度に、天然型マウスと差異を認めなかった⁵³。本研究の結果、PTH(1-34)によるレセプターの活性化は、ATDC5細胞の増殖に何ら変化を与えないことが判明した（図5）。むしろ、PTH/PTHrPレセプターの活性化が軟骨初期分化に強

く阻害的に作用することを明らかにした本研究の結果は、宿南らの報告と相俟って、軟骨形成におけるPTH/PTHrPシグナリングの制御機序を細胞レベルで明らかにする有用なモデルを与えるものであると考えられた。同時に、軟骨細胞に対するPTH/PTHrPの作用は、細胞外基質の再構築過程にある軟骨細胞の応答の結果であると解釈され、初代培養細胞の反応性を発生過程にみられる細胞分化の解析に安易に外挿することには限界があることを裏付けるものであった。

軟骨初期分化により形成された軟骨結節の成長が完了すると、結節内の細胞増殖は停止し、軟骨細胞は後期分化段階へと移行する¹⁶⁾。後期分化に伴う特徴的な所見として、細胞形態の肥大化、II型コラーゲンの発現低下とX型コラーゲンの発現誘導による細胞外基質の改変、ALP活性の上昇などがある¹⁶⁾。増殖分化因子の軟骨後期分化に対する作用は、軟骨細胞初代培養系を用いた解析が報告されてきた^{27, 56, 57)}。しかし、各分化段階の軟骨細胞を組織から選択的に分離することが極めて困難で、初代培養系は用いる細胞の分化段階の点で、不均一な培養系と考えざるを得ない。一方、ATDC5細胞培養系では、細胞増殖の同調的停止とX型コラーゲンmRNAの発現誘導(図8)により、さらにはII型コラーゲンなどの軟骨初期分化によって誘導される分化マーカーの発現レベルの低下によって、軟骨後期分化への移行を生化学的に裏付けることが容易である¹⁶⁾。

そこで、軟骨結節の形成が完了する培養21日目のATDC5細胞培養系を用いて各増殖分化因子の軟骨後期分化に対する作用を検討した。その結果、この時期にBMP-2を添加すると、肥大化軟骨細胞がBMP-2無添加の対照に比べ早期に出現しはじめ(図9)、培養系のALP活性の上昇も促進された(図10,11)。培養系のALP活性の著しい上昇は、後期分化にともなって軟骨基質中に放出される基質小

胞の蓄積によってもたらされる。ALP mRNAの発現そのものは、軟骨後期分化に特異的に見られる現象ではないものの、後期分化の進展に伴ってそのmRNAレベルは上昇する¹⁶⁾。BMP-2の添加によりALP mRNAの発現レベル上昇する事実は、BMPがATDC5細胞の後期分化に対して促進的に作用することを裏付けている(図11)。

軟骨後期分化が進行すると、細胞外基質の改変とともに、ALP活性に富む基質小胞が細胞外に分泌される。その後、基質小胞を介した石灰化(基質小胞性石灰化)が開始される⁵⁸⁾。そこで、ATDC5細胞培養系が軟骨後期分化に移行した時期からBMP-2を添加して、細胞外基質の石灰化に対する影響を観察した。その結果、BMP-2の作用は、X型コラーゲンの発現誘導やALP活性の上昇にとどまらず、後期分化の最終段階であるとされる細胞外基質の石灰化亢進に至ることが判明した(図14,15,16)。この培養系の石灰化を促進する増殖分化因子は、現在までのところ、報告されていない。ATDC5細胞が細胞の肥大化から石灰化に至るまで内因性のBMP-4を発現していること³⁸⁾を考慮すると、BMP-2を添加しない対照においても培養系の自律的な後期分化の開始と石灰化の誘導が認められる事実は、内因性のBMPが軟骨後期分化の移行とそれに伴う細胞外基質の改変および基質小胞性の石灰化を促進的に制御していることが推察される。

一方、PTH(1-34)は、ATDC5細胞培養系の後期分化移行期に添加すると、軟骨結節内の軟骨細胞を扁平な未分化細胞様に形態変化を誘導し(図9)、ALP活性の上昇をも阻害した(図10)。また、PTH(1-34)は、X型コラーゲンの発現のみならずII型コラーゲンやChM-IならびにPTH/PTHrPレセプター(図11,12)などの軟骨初期分化によって発現誘導がみられるマーカー遺伝子の発現を阻害した。これ

らの結果は、PTH(1-34)が単に後期分化の進展を阻害するのみならず、分化した軟骨細胞を未分化な状態へと脱分化させたことを示唆している。

従来よりTGF- β_2 やFGF-2は、軟骨細胞初代培養系において、ALP活性上昇の抑制、細胞外基質の石灰化の抑制作用を持つことが報告されている^{56,57})。ATDC5細胞培養系においても、同様の結果が観察された。すなわち、TGF- β_2 やFGF-2を添加すると、ALP活性の上昇を抑制する(図10)と同時に軟骨細胞の肥大化を抑制した(図15)。しかし、PTH(1-34)と異なり軟骨結節内の細胞を未分化細胞様に変化させることはなかった。さらに、対照と比較して、培養系のALP mRNAレベルやX型コラーゲンmRNAレベルを低下させることはなかった(図11,12)。

Joyceら⁵⁹)は、ラットの骨膜下にTGF- β を移植すると、軟骨細胞の出現は観察されるものの、その後の軟骨後期分化は観察されないことを報告している。従って、TGF- β やFGFは軟骨後期分化の進行を抑制するものの、その作用機序はPTH/PTHrPと異なり、単に軟骨後期分化が開始される時期の状態に培養系を停滞させたものと推察された(図10,11)。

Insulinを添加した培地にさらにIGF-Iを添加しても、軟骨分化マーカーに対する影響を見る限り、後期分化の進行に特に顕著な作用を示さない(図10,11,12)。しかし、細胞外基質の石灰化では、軽度の抑制傾向が認められた(図15,16)。宿南ら¹⁶)は、ATDC5細胞の初期分化において、Insulinの代わりにIGF-Iを添加すると、Insulinと同様に軟骨結節が形成されるものの、細胞の分化効率は低くなることを報告している。また、IGF-Iの未分化ATDC5細胞の増殖促進活性は、Insulinよりも若干高い傾向がみられた(図5)。IGF-Iの添加により培養系の石灰化が軽度に抑制された事実は、Insulinに比べてIGF-Iが若干細胞増殖促進活性を有することに

起因している可能性がある。しかし、ATDC5細胞の軟骨分化に対するInsulinとIGF-Iのシグナル伝達が、どのような質的な差を作り出すのかについては、現在のところ、遺伝子レベルでその差異を論ずることはできない。肢芽間充織における骨格形成において、InsulinがIGF-Iと異なる特異的な役割を果たしている可能性を示唆する報告³⁷⁾もあり、今後、解析する必要がある。

本研究の結果より、ATDC5細胞における軟骨多段階分化の進展は、Insulin/IGF-Iシグナルによって誘導される培養系の分節化によりもたらされる細胞凝集領域の出現に始まること、さらに、領域内では自らが産生するBMPによるオートクリンシグナルによって軟骨初期分化が誘導されて軟骨結節の形成に至ることが示唆された。また、BMPによるオートクリンシグナルは、増殖段階を終えた軟骨細胞が後期分化への移行を開始する時期から石灰化に至る全ての軟骨後期分化の進展においても、重要な正の制御シグナルとして作用することが示唆された。これに対して、主に軟骨を取り囲む未分化な細胞に発現するPTHrPは、初期分化とともに軟骨細胞に発現するPTH/PTHrPレセプターを介す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が示唆された。これらの結果は、軟骨組織幹細胞に内在する軟骨多段階分化プログラムの自律的進行が、局所で産生されるBMPとPTHrPによる正負の制御シグナルのバランスによって調節されていることを示唆している。本研究によって示された、ATDC5細胞を用いる軟骨分化モデルの有用性は、胎生期における骨格の形態形成機序を細胞生物学的に解析するための重要な手段となることが期待される。

結語

本研究では、軟骨分化をin vitroにて忠実に再現することのできるATDC 5細胞培養系を用いて、各増殖分化因子の初期、後期分化に対する作用を系統的に解析した。その結果、ATDC5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自律的な進行は、BMPとPTHrPの正負の制御シグナルのバランスにより調節されている事が明らかとなった。生体においては、これらの因子により内軟骨性骨形成における軟骨細胞の多段階分化が巧妙に調節されていると推察された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の円滑な遂行に格別の御配慮を頂き、御鞭撻を賜りました大阪大学口腔外科学第二講座、作田正義教授に謹んで感謝の意を表します。そして、本研究を行う機会を与えられ、終始変わらぬ御指導、御教示を賜りました生化学講座、開祐司助教授ならびに日本学術振興会特別研究員、宿南知佐博士に心より謝意を表します。また、原子吸光法による測定を行うにあたり、適切な御助言を頂きました歯科理工学講座、岡崎正之助教授に深く感謝いたします。また、ノーザンブロットによる解析を行うにあたり、以下のcDNAを供与していただきました、各先生方に感謝いたします；rat ALP cDNA：G. A. Rodan 博士 (Merck Sharp & Dohme Reseach Lab.)、rat II型 コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 cDNA：木村友厚 博士 (大阪大学医学部)、mouse X型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 cDNA：B. R. Olsen 博士 (Harvard Medical School)、mouse PTH/PTHrPレセプター cDNA：G. V. Segre 博士 (Massachusetts General Hospital)。最後に、本研究の遂行にあたり、多くの御援助、御協力を頂きました口腔外科学第二講座並びに生化学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Gilbert, S. F. (1994) : *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 335-338.
- 2) Erlebacher, A., Filvaroff, E. H., Gitelman, S. E. and Derynck, R. (1995) : Toward a molecular understanding of skeletal development . *Cell*, 80, 371-378.
- 3) Koshier, R. A., Kulyk, W. M. and Gay, S. W. (1986) : Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J. Cell Biol.*, 102, 1151-1156.
- 4) Leboy, P. S., Shapiro, I. M., Uschmann, B. D., Oshima, O. and Lin, D. (1988) : Gene expression in mineralizing chick epiphyseal cartilage. *J.Biol.Chem.*, 263, 8515-8520.
- 5) 宿南知佐, 開 祐司 (1996) : 軟骨初期分化におけるシグナリング. *実験医学*, 14, 1337-1343.
- 6) Seyedin, S. M. and Rosen, D. M. (1991) : *Cartilage : Molecular Aspects*. (Hall, B. K. and Newmann, S. A., Hall, B. K. and Newmann, S. A. ed.), CRC Press, Boca Raton, 131-178.
- 7) Suzuki, F. (1992) : Effects of various growth factors on a chondrocyte differentiation model. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 324, 101-106.
- 8) Kato, Y., Shimazu, A., Iwamoto, M., Nakashima, K., Koike, T., Suzuki, F., Nishii, Y. and Sato, K. (1990) : Role of 1,25-dihydroxycholecalciferol in growth-plate cartilage: inhibition of terminal differentiation of chondrocytes in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 6522-6526.
- 9) Iwamoto, M., Golden, E. B., Adams, S. L., Noji, S. and Pacifici, M. (1993) :

Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. **Exp. Cell Res.**, 205, 213-224.

10) Kulyk, W. M., Rodgers, B. J., Greer, K. and Kosher, R. A. (1989) : Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. **Dev. Biol.**, 135, 424-430.

11) Takigawa, M., Tajima, K., Pan, H. O., Enomoto, M., Kinoshita, A., Suzuki, F., Takano, Y. and Mori, Y. (1989) : Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. **Cancer Res.**, 49, 3996-4002.

12) Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. and Aubin, J. E. (1990) : Continuously growing bipotential and monopotential myogenic, adipogenic, and chondrogenic subclones isolated from the multipotential RCJ 3.1 clonal cell line. **Dev. Biol.**, 142, 313-318.

13) Lefebvre, V., Garofalo, S. and de Crombrughe, B. (1995) : Type X collagen gene expression in mouse chondrocytes immortalized by a temperature-sensitive simian virus 40 large tumor antigen. **J. Cell Biol.**, 128, 239-245.

14) Aikawa, T., Shirasuna, K., Iwamoto, M., Watatani, K., Nakamura, T., Okura, M., Yoshioka, H. and Matsuya, T. (1996) : Establishment of Bone Morphogenetic Protein 2 Responsive Chondrogenic Cell Line. **J. Bone Miner. Res.**, 11, 544-553.

15) Shukunami, C., Shigeno, C., Atsumi, T., Ishizeki, K., Suzuki, F. and Hiraki, Y. (1996) : Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. **J. Cell Biol.**, 133, 457-468.

16) Shukunami, C., Ishizeki, K., Atsumi, T., Ohta, Y., Suzuki, F. and Hiraki, Y. (1997) :

Cellular Hypertrophy and Calcification of Embryonal Cartinoma-Derived Chondrogenic Cell Line ATDC5 in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, in press.

17) Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K. and Ikawa, Y. (1990) : A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. **Cell Differ. Dev.**, 30, 109-116.

18) 開 祐司, 宿南知佐, 井上博之 (1995) : 内軟骨性骨形成のメカニズム-軟骨から骨への置換. **実験医学**, 13, 406-414.

19) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. (1946) : A Method for the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase with Five Cubic Millimeters of Serum. **J. Biol. Chem.**, 263, 3864-3871.

20) Johnson Wint, B. and Hollis, S. (1982) : A rapid in situ deoxyribonucleic acid assay for determining cell number in culture and tissue. **Anal. Biochem.**, 122, 338-344.

21) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, 162, 156-159.

22) Noda, M., Yoon, K., Thiede, M., Buenaga, R., Weiss, M., Henthorn, P., Harris, H. and Rodan, G. A. (1987) : cDNA cloning of alkaline phosphatase from rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. **J. Bone Miner. Res.**, 2, 161-164.

23) Kimura, T., Mattei, M. G., Stevens, J. W., Goldring, M. B., Ninomiya, Y. and Olsen, B. R. (1989) : Molecular cloning of rat and human type IX collagen cDNA and localization of the alpha 1(IX) gene on the human chromosome 6. **Eur. J. Biochem.**, 179, 71-78.

- 24) Apte, S. S., Seldin, M. F., Hayashi, M. and Olsen, B. R. (1992) : Cloning of the human and mouse type X collagen genes and mapping of the mouse type X collagen gene to chromosome 10. **Eur. J. Biochem.**, 206, 217-224.
- 25) Dahl, L. K. (1952) : A Simple and Sensitive Histochemical Method for Calcium. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 80, 474-479.
- 26) Rosen, V. and Thies, R. S. (1992) : The BMP proteins in bone formation and repair. **Trends Genet.**, 8, 97-102.
- 27) Hiraki, Y., Inoue, H., Shigeno, C., Sanma, Y., Bentz, H., Rosen, D. M., Asada, A. and Suzuki, F. (1991) : Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, 6, 1373-1385.
- 28) Asahina, I., Sampath, T. K., Nishimura, I. and Hauschka, P. V. (1993) : Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. **J. Cell Biol.**, 123, 921-933.
- 29) Chen, P., Carrington, J. L., Hammonds, R. G. and Reddi, A. H. (1991) : Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor beta 1 and beta 2. **Exp. Cell Res.**, 195, 509-515.
- 30) Asahina, I., Sampath, T. K. and Hauschka, P. V. (1996) : Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. **Exp. Cell Res.**, 222, 38-47.
- 31) 神田 滋 (1995) : 実験医学別冊 Bio Science 用語ライブラリー. (宮園浩平, 菅

村和夫 編集), 羊土社, 東京, 102-105.

32) Otsuka, Y., Mizuta, H., Takagi, K., Iyama, K., Yoshitake, Y., Nishikawa, K., Suzuki, F. and Hiraki, Y. (1997) : Requirement of FGF Signaling for Regeneration of Epiphyseal Morphology in Rabbit Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. **Dev. Growth Diff.**, in press.

33) Ede, D. A. (1983) : Cartilage. (Hall, B. K., Hall, B. K. ed.) Academic Press, New York, 2, 143-185.

34) Kulyk, W. M., Upholt, W. B. and Kosher, R. A. (1989) : Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. **Development**, 106, 449-455.

35) Oberlender, S. A. and Tuan, R. S. (1994) : Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. **Development**, 120, 177-187.

36) Jiang, T. X., Yi, J. R., Ying, S. Y. and Chuong, C. M. (1993) : Activin enhances chondrogenesis of limb bud cells: stimulation of precartilaginous mesenchymal condensations and expression of NCAM. **Dev. Biol.**, 155, 545-557.

37) Bassas, L., Lesniak, M. A., Serrano, J., Roth, J. and de Pablo, F. (1988) : Developmental Regulation of Insulin and Type I Insulin-Like Growth Factor Receptors and Absence of Type II Receptors in Chicken Embryo Tissues. **Diabetes**, 37, 637-644.

38) 秋山治彦, 中村孝志, 宿南知佐, 開 祐司 (1996) : 軟骨前駆細胞株ATDC5の分化誘導におけるBMPの役割とIhhの発現パターン. 第14回日本骨代謝学会抄録号, 14, 42.

39) Koenig, B. B., Cook, J. S., Wolsing, D. H., Ting, J., Tiesman, J. P., Correa, P. E., Olson, C. A., Pecquet, A. L., Ventura, F., Grant, R. A. and et, a. (1994) : Characterization

and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. **Mol. Cell Biol.**, 14, 5961-5974.

40) ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T. K., Reddi, A. H., Estevez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C. H. and Miyazono, K. (1994) : Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. **J. Biol. Chem.**, 269, 16985-16988.

41) Lyons, K. M., Pelton, R. W. and Hogan, B. L. (1989) : Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. **Genes Dev.**, 3, 1657-1668.

42) Lyons, K. M., Pelton, R. W. and Hogan, B. L. (1990) : Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). **Development**, 109, 833-844 .

43) Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bentz, H., Rosen, D. M., McPherson, J. M., Conti, A., Siegel, N. R., Galluppi, G. R. and Piez, K. A. (1986) : Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. **J. Biol. Chem.**, 261, 5693-5695.

44) Seyedin, S. M., Segarini, P. R., Rosen, D. M., Thompson, A. Y., Bentz, H. and Graycar, J. (1987) : Cartilage-inducing factor-B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor-beta. **J. Biol. Chem.**, 262, 1946-1949.

45) Iwasaki, M., Nakata, K., Nakahara, H., Nakase, T., Kimura, T., Kimata, K., Caplan, A. I. and Ono, K. (1993) : Transforming growth factor-beta 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells.

Endocrinology, 132, 1603-1608.

- 46) Abou Samra, A. B., Juppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X. F., Schipani, E., Urena, P., Richards, J., Bonventre, J. V., Potts, J. T., Jr. and et al. (1992) : Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 89, 2732-2736.
- 47) Schipani, E., Karga, H., Karaplis, A. C., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., Segre, G. V., Abou Samra, A. B. and Juppner, H. (1993) : Identical complementary deoxyribonucleic acids encode a human renal and bone parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. **Endocrinology**, 132, 2157-2165.
- 48) Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M. and Mulligan, R. C. (1994) : Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. **Genes Dev.**, 8, 277-289.
- 49) Martin, T. J., Allan, E. H., Caple, I. W., Care, A. D., Danks, J. A., Diefenbach Jagger, H., Ebeling, P. R., Gillespie, M. T., Hammonds, G., Heath, J. A. and et al. (1989) : Parathyroid hormone-related protein: isolation, molecular cloning, and mechanism of action. **Recent Prog. Horm. Res.**, 45, 467-502.
- 50) Lee, K., Deeds, J. D., Bond, A. T., Juppner, H., Abou Samra, A. B. and Segre, G. V. (1993) : In situ localization of PTH/PTHrP receptor mRNA in the bone of fetal and young rats. **Bone**, 14, 341-345.
- 51) Lee, K., Deeds, J. D. and Segre, G. V. (1995) : Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of

rats. **Endocrinology**, 136, 453-463.

52) Amizuka, N., Warshawsky, H., Henderson, J. E., Goltzman, D. and Karaplis, A. C. (1994) : Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. **J. Cell Biol.**, 126, 1611-1623.

53) Lee, K. C., Lanske, B., Karaplis, A. C., Deeds, J. D., Kohno, H., Nissenson, R. A., Kronenberg, H. M. and Segre, G. V. (1996) : Parathyroid Hormone-Related Peptide delays Terminal Differentiation of Chondrocytes During Endochondral Bone Development. **Endocrinology**, 137, 5109-5118.

54) Schipani, E., Kruse, K. and Juppner, H. (1995) : A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. **Science**, 268, 98-100.

55) Koike, T., Iwamoto, M., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki, F. and Kato, Y. (1990) : Potent mitogenic effects of parathyroid hormone (PTH) on embryonic chick and rabbit chondrocytes. Differential effects of age on growth, proteoglycan, and cyclic AMP responses of chondrocytes to PTH. **J. Clin. Invest.**, 85, 626-631.

56) Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F. and Takano, Y. (1988) : Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 85, 9552-9556.

57) Kato, Y. and Iwamoto, M. (1990) : Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. **J. Biol. Chem.**, 265, 5903-5909.

58) 小澤英浩 (1994): 骨の石灰化の微細形態学的アプローチ. 細胞工学, 13, 18-27.

59) Joyce, M. E., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Bolander, M. E. (1990):

Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.*, 110, 2195-2207.

図・表の説明

図1. 軟骨細胞の多段階分化模式図

図2. 実験スケジュール

a: 軟骨初期分化に対する作用、b: 軟骨後期分化に対する作用の検討。

図3. Insulin存在下に培養したATDC5細胞の軟骨初期分化に対する各増殖分化因子の細胞形態に与える影響

12穴マルチウェルプレートにATDC5 (4.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。コンフルエント達した後(培養3日目)、Insulin (10 μ g/ml)存在下に、以下の各増殖分化因子を添加して培養を続け、添加開始10日目の細胞形態を位相差顕微鏡下(倍率: 100倍)で観察した。a: Control (0.1% BSA in PBS)、b: BMP-2 (1000 ng/ml)、c: TGF- β_2 (5 ng/ml)、d: FGF-2 (1 ng/ml)、e: TGF- β_2 (5 ng/ml)+FGF-2 (1 ng/ml)、f: IGF-I (300 ng/ml)、g: PTH(1-34) (10^8 M)

図4. Insulin非存在下に培養したATDC5細胞の軟骨初期分化に対する各増殖分化因子の細胞形態に与える影響

12穴マルチウェルプレートにATDC5 (4.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。コンフルエント達した後(培養3日目)、Insulin非存在下に、Control、BMP-2 (1000 ng/ml)、TGF- β_2 (5 ng/ml)を添加して培養を続け、添加開始2日目の細胞形態を位相差顕微鏡下(倍率: 100倍)で観察した。

図5. コンフルエントに達した未分化ATDC5細胞のDNA合成に対する各増殖分化因子の影響

96穴マルチウェルプレートにATDC5 (3.0×10^3 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。コンフルエント達した後(培養3日目)、培地交換を行わ

ずさらに36時間培養し (preincubation)、各増殖分化因子 (Control、BMP-2: 1000 ng/ml、TGF- β_2 : 5 ng/ml、FGF-2: 1 ng/ml、TGF- β_2 : 5 ng/ml+FGF-2: 1 ng/ml、IGF-I: 300 ng/ml、PTH(1-34): 10^8 M)を添加した。添加24時間後より、10 nmol/mlのBrdUで4時間パルスラベルした後、5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (Boeringer Mannheim)を用いて、細胞への取り込み量を測定した。各値は、3ウェルの平均値±標準偏差を示す。

図6. 未分化ATDC5細胞の軟骨初期分化におけるII型コラーゲンmRNAの発現に対する各増殖分化因子の影響

6穴マルチウェルプレートにATDC5 (6.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。コンフルエント達した後(培養3日目)、Insulin存在 (10 μ g/ml)または非存在下に、各増殖分化因子 (Control、BMP-2: 1000 ng/ml、TGF- β_2 : 5 ng/ml、FGF-2: 1 ng/ml、TGF- β_2 : 5 ng/ml+FGF-2: 1 ng/ml、IGF-I: 300 ng/ml、PTH(1-34): 10^8 M)を添加し、2日後にtotal RNAを抽出し、各レーン20 μ gのtotal RNAを展開してノーザンブロットにより解析した。

図7. BMP-2のII型コラーゲンmRNA発現に対する用量依存的促進作用

6穴マルチウェルプレートにATDC5 (6.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。コンフルエント達した後(培養3日目)、Insulin存在下 (10 μ g/ml)に、10~1000 ng/mlのBMP-2を添加した。2日後にtotal RNAを抽出し、各レーン20 μ gのtotal RNAを展開してノーザンブロットにより解析した。

図8. ATDC5細胞培養系における軟骨分化マーカー遺伝子のmRNA発現レベルの変化

宿南らの論文¹⁶⁾(J. Bone. Min. Res. 1997, in press)より引用。

図9. ATDC5細胞の軟骨後期分化期における細胞形態の変化

12穴マルチウェルプレートにATDC5 (4.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。細胞増殖停止後（培養21日目）、培地Bに変更し、Insulin存在下 ($10 \mu\text{g/ml}$)でControl、BMP-2 (1000 ng/ml)、PTH(1-34) (10^{-8} M)を添加し、添加開始10日目の細胞形態を位相差顕微鏡下（倍率：100倍）で観察した。増殖分化因子の添加は、2日毎の培地交換の際にあわせて行った。

図10. 軟骨後期分化期のATDC5細胞培養系のALP活性に対する各増殖分化因子の影響

48穴マルチウェルプレートにATDC5 (1.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。細胞増殖停止後（培養21日目）、0.5% FBS、Insulin ($10 \mu\text{g/ml}$)、Transferrin ($10 \mu\text{g/ml}$)、Selenite ($3 \times 10^{-8} \text{ M}$)を含む α -MEMに培地を変更し、preincubationを行った。培養22日目に各増殖分化因子 (Control、BMP-2: 1000 ng/ml 、TGF- β_2 : 5 ng/ml 、FGF-2: 1 ng/ml 、IGF-I: 300 ng/ml 、PTH(1-34): 10^{-8} M)を添加して培養を続け、添加開始7日目のDNA量当りのALP活性を測定した。図中、Day 0は各因子添加開始時（培養22日目）におけるALP活性を示す。各値は、3ウェルの平均値 \pm 標準偏差を示す。

表1. BMP-2のALP活性に対する用量依存的促進作用

48穴マルチウェルプレートにATDC5 (1.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。細胞増殖停止後（培養21日目）、0.5% FBS、Insulin ($10 \mu\text{g/ml}$)、Transferrin ($10 \mu\text{g/ml}$)、Selenite ($3 \times 10^{-8} \text{ M}$)を含む α -MEMに培地を変更し、preincubationを行った。培養22日目に10~1000 ng/mlのBMP-2を添加して培養を続け、添加48時間後のDNA量当りのALP活性を測定した。各値は、3ウェルの平均値 \pm 標準偏差を示す。

図11. 各増殖分化因子の軟骨後期分化における後期分化マーカーmRNA発現に対する影響

a: 6穴マルチウェルプレートにATDC5 (6.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。細胞増殖停止後(培養21日目)、0.5% FBS、Insulin (10 μ g/ml)、Transferrin (10 μ g/ml)、Selenite (3×10^{-8} M)を含む α -MEMに培地を変更し、preincubationを行った。培養22日目に各増殖分化因子(Control、BMP-2: 1000 ng/ml、TGF- β_2 : 5 ng/ml、FGF-2: 1 ng/ml、IGF-I: 300 ng/ml、PTH(1-34): 10^{-8} M)を添加し、48時間培養した。その後total RNAを抽出した。各レーン20 μ gのtotal RNAを展開してノーザンプロットによりX型コラーゲン、ALPのmRNAの発現について解析した。

b,c: 得られたtotal RNAをスロットプロットにより、Scanning Densitometerを用いて定量化した(実験材料と方法の項参照)。bはX型コラーゲン、cはALPのmRNA発現レベルの定量データを示す。

図12. 各増殖分化因子の軟骨後期分化における初期分化マーカーmRNA発現に対する影響

a: 図11と同様の条件で、細胞培養、増殖分化因子の添加を行い、添加48時間後のtotal RNAを抽出した。各レーン20 μ gのtotal RNAを展開してノーザンプロットによりII型コラーゲン、PTH/PTHrPレセプター、コンドロモジュリン-I (ChM-I) mRNAの発現について解析した。

b,c,d: 得られたtotal RNAをスロットプロットにより、Scanning Densitometerを用いて定量化した(実験材料と方法の項参照)。bはII型コラーゲン、cはPTH/PTHrPレセプター、dはChM-IのmRNA発現レベルの定量データを示す。

図13. BMP-2の軟骨後期分化におけるII型コラーゲン、X型コラーゲン、ALPのmRNA発現に対する影響

6穴マルチウェルプレートにATDC5 (6.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。細胞増殖停止後(培養21日目)、0.5% FBS、Insulin (10 μ g/

ml)、Transferrin (10 μ g/ml)、Selenite (3×10^{-8} M)を含む α -MEMに培地を変更し、preincubationを行った。培養22日目に1000 ng/mlのBMP-2を添加し、所定の時間培養した後、total RNAを抽出した。各レーン20 μ gのtotal RNAを展開してノーザンブロットによりII型コラーゲン、X型コラーゲン、ALPのmRNAの発現について解析した。各レーンには、0h: 添加直前、3h: 添加3時間後、6h: 添加6時間後、12h: 添加12時間後、24h: 添加24時間後、48h: 添加48時間後の各total RNAを展開した。

図14. PTHの後期分化におけるII型コラーゲン、X型コラーゲン、ALPのmRNA発現に対する影響

図10と同様の条件で細胞培養を行い、 10^{-8} MのPTH(1-34)を添加し、所定の時間培養した後、total RNAを抽出した。各レーン20 μ gのtotal RNAを展開してノーザンブロットによりII型コラーゲン、X型コラーゲン、ALPのmRNAの発現について解析した。各レーンには、0h: 添加直前、6h: 添加6時間後、12h: 添加12時間後、24h: 添加24時間後、48h: 添加48時間後、60h: 添加60時間後の各total RNAを展開した。

図15. 細胞外基質の石灰化に対する各増殖分化因子の影響 (アリザリンレッド染色)

12穴マルチウェルプレートにATDC5 (4.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。細胞増殖停止後(培養21日目)、培地Bに変更し、各増殖分化因子(Control、BMP-2: 1000 ng/ml、TGF- β_2 : 5 ng/ml、FGF-2: 1 ng/ml、IGF-I: 300ng/ml、PTH(1-34): 10^{-8} M)を添加して培養を続けた。増殖分化因子の添加は2日毎の培地交換の際にあわせて行った。培養42日目(増殖分化因子添加開始21日目)の細胞層をアリザリンレッド染色し、細胞外基質の石灰化を確認した。

図16. 細胞外基質の石灰化期におけるATDC5細胞培養系のカルシウム含量

12穴マルチウェルプレートにATDC5 (4.0×10^4 cells/well)を播種し、培地Aで培養した。細胞増殖停止後(培養21日目)、培地Bに変更し、各増殖分化因子(Control、BMP-2: 1000 ng/ml、TGF- β_2 : 5 ng/ml、FGF-2: 1 ng/ml、IGF-I: 300 ng/ml、PTH(1-34): 10^{-8} M)を添加して培養を続けた。増殖分化因子の添加は2日毎の培地交換の際にあわせて行った。培養42日目(増殖分化因子添加開始21日目)の細胞層に含まれるカルシウム量を原子吸光法により測定した。図中、Day 30は細胞外基質の石灰化が確認される以前(培養30日目)の、細胞層に含まれるカルシウム量を示す。各値は、3ウェルの平均値 \pm 標準偏差を示す。

図17. 軟骨細胞多段階分化プログラムの進行とBMPおよびPTHrPによる局所シグナルの役割

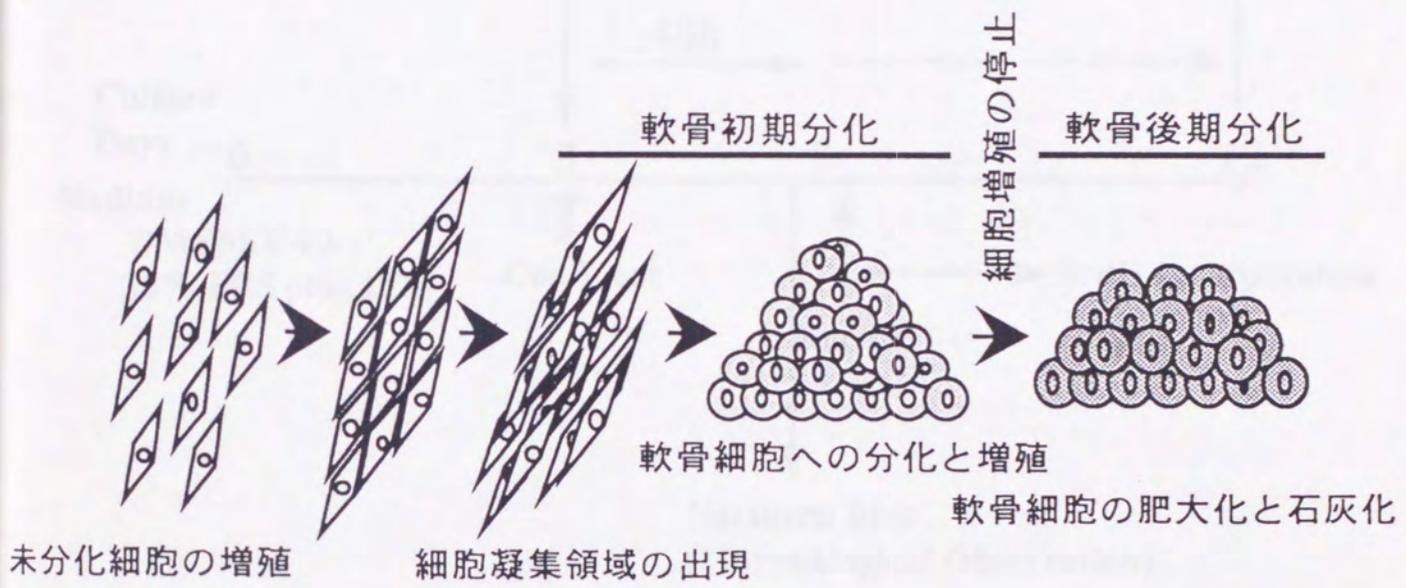


図 1

Experimental Schedule (Early Phase)

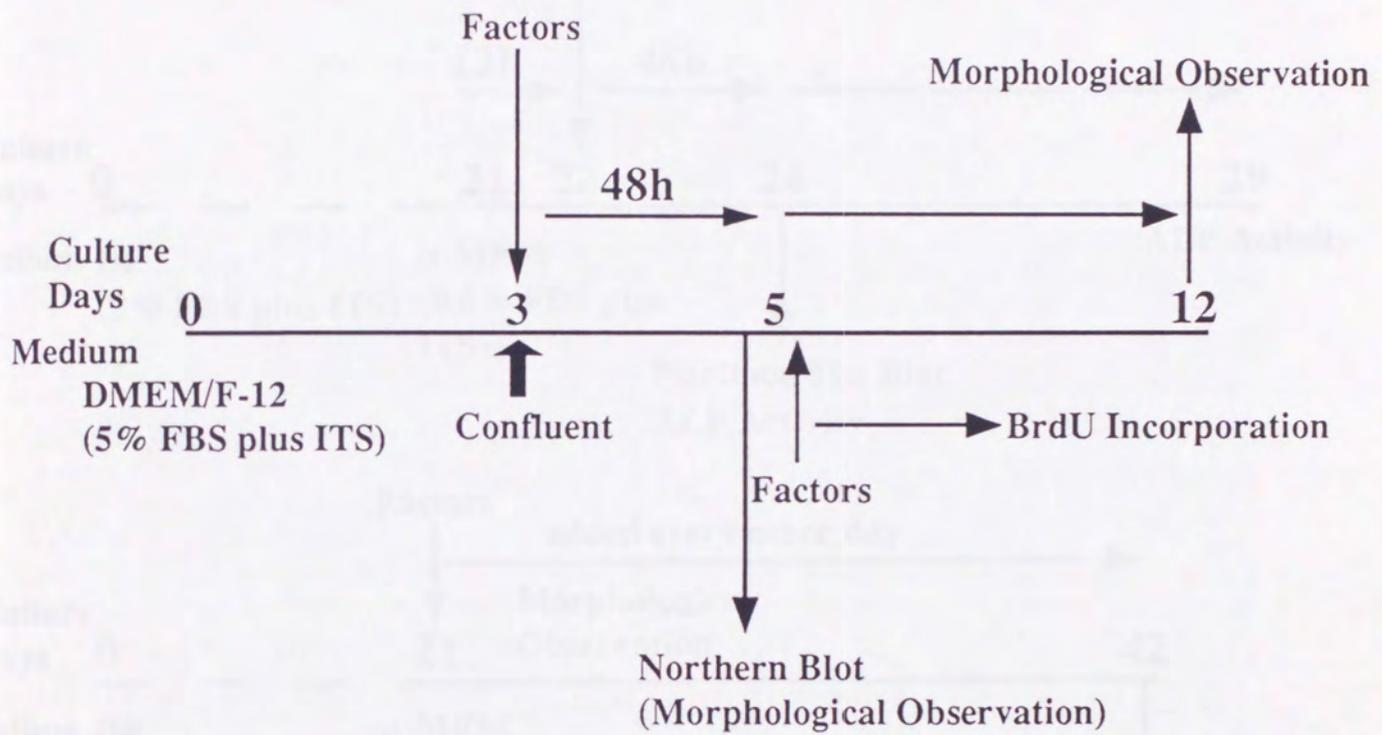


图 2-a

图 2-b

Experimental Schedule (Late Phase)

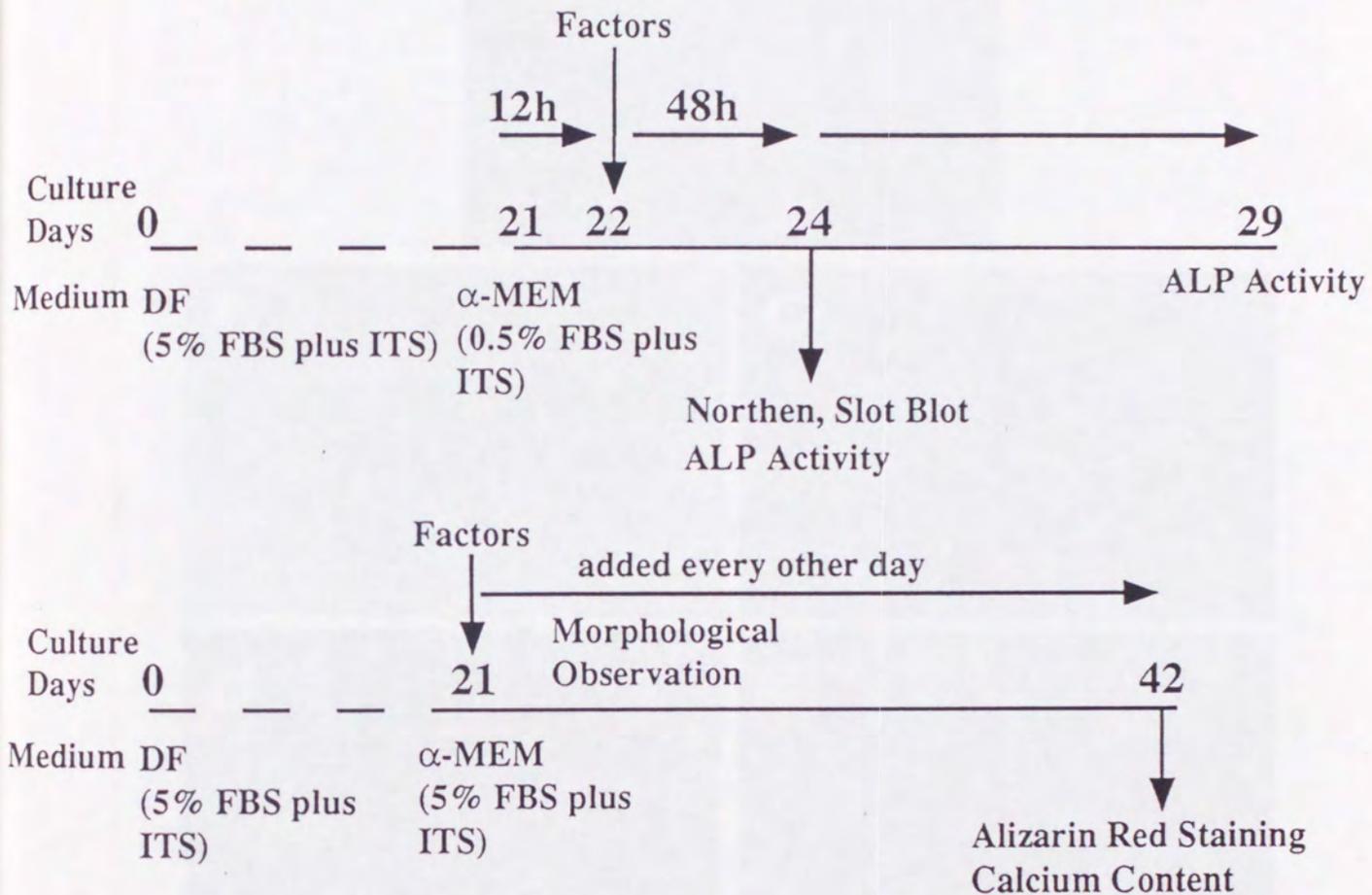


图 2-b

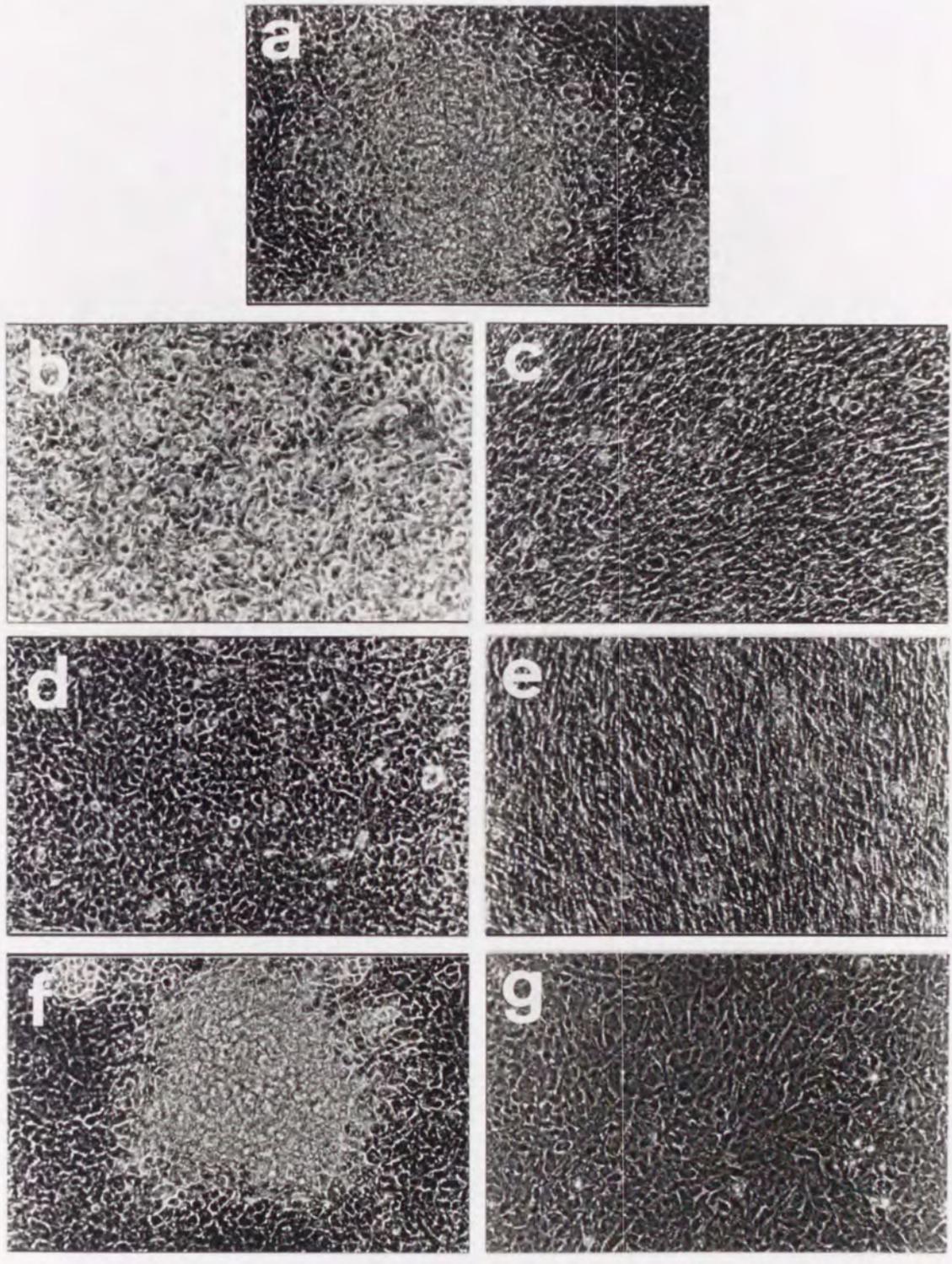
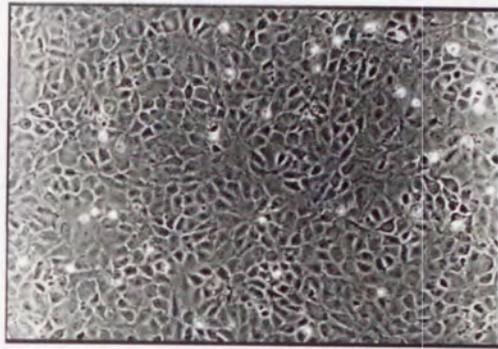
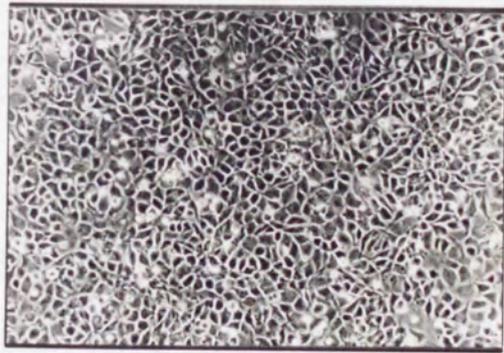


图 3

Control



BMP-2



TGF- β_2

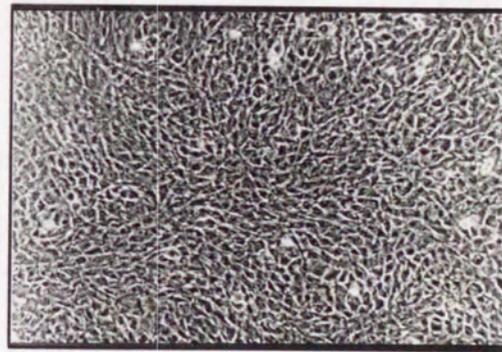


图 4

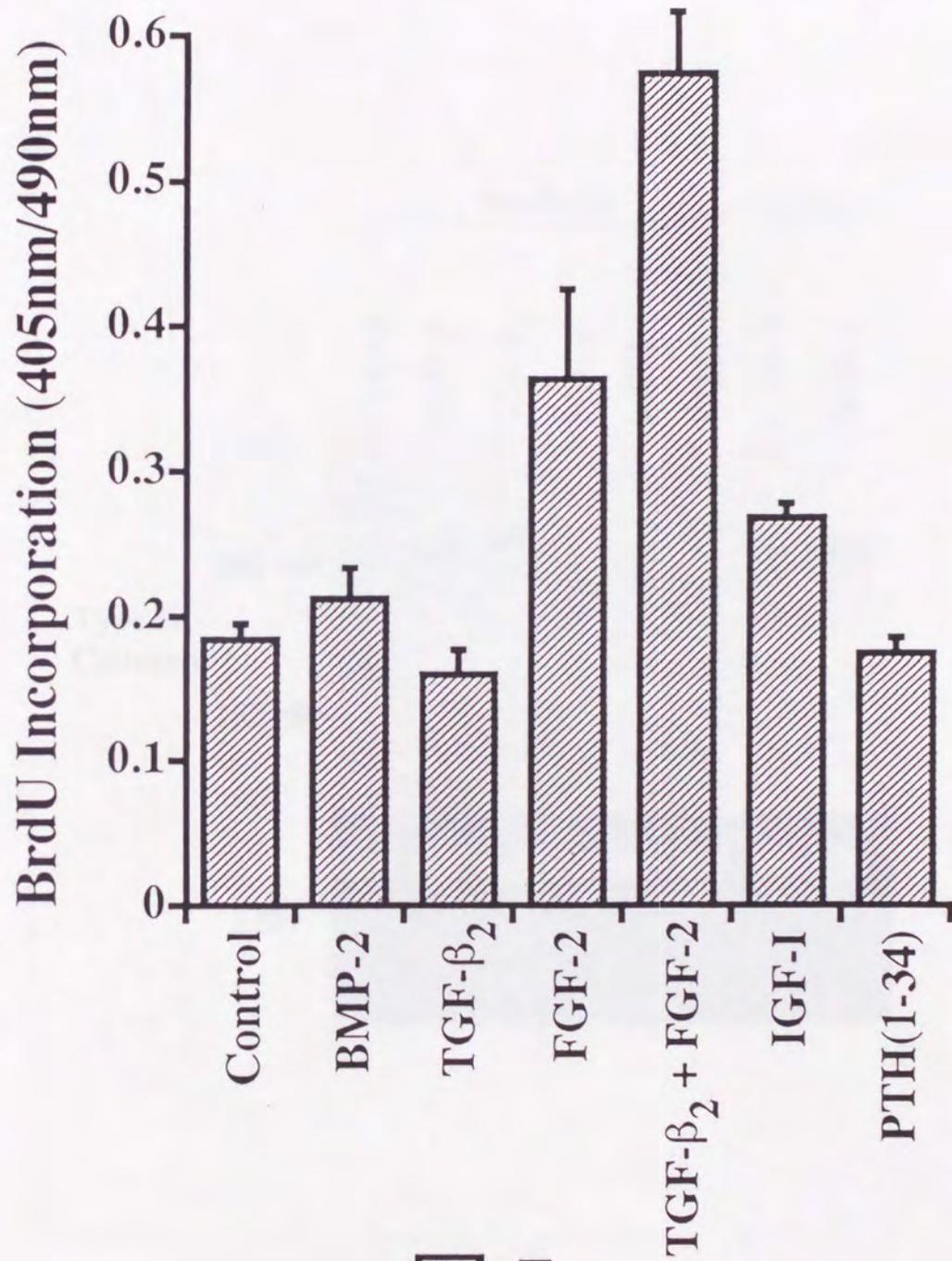
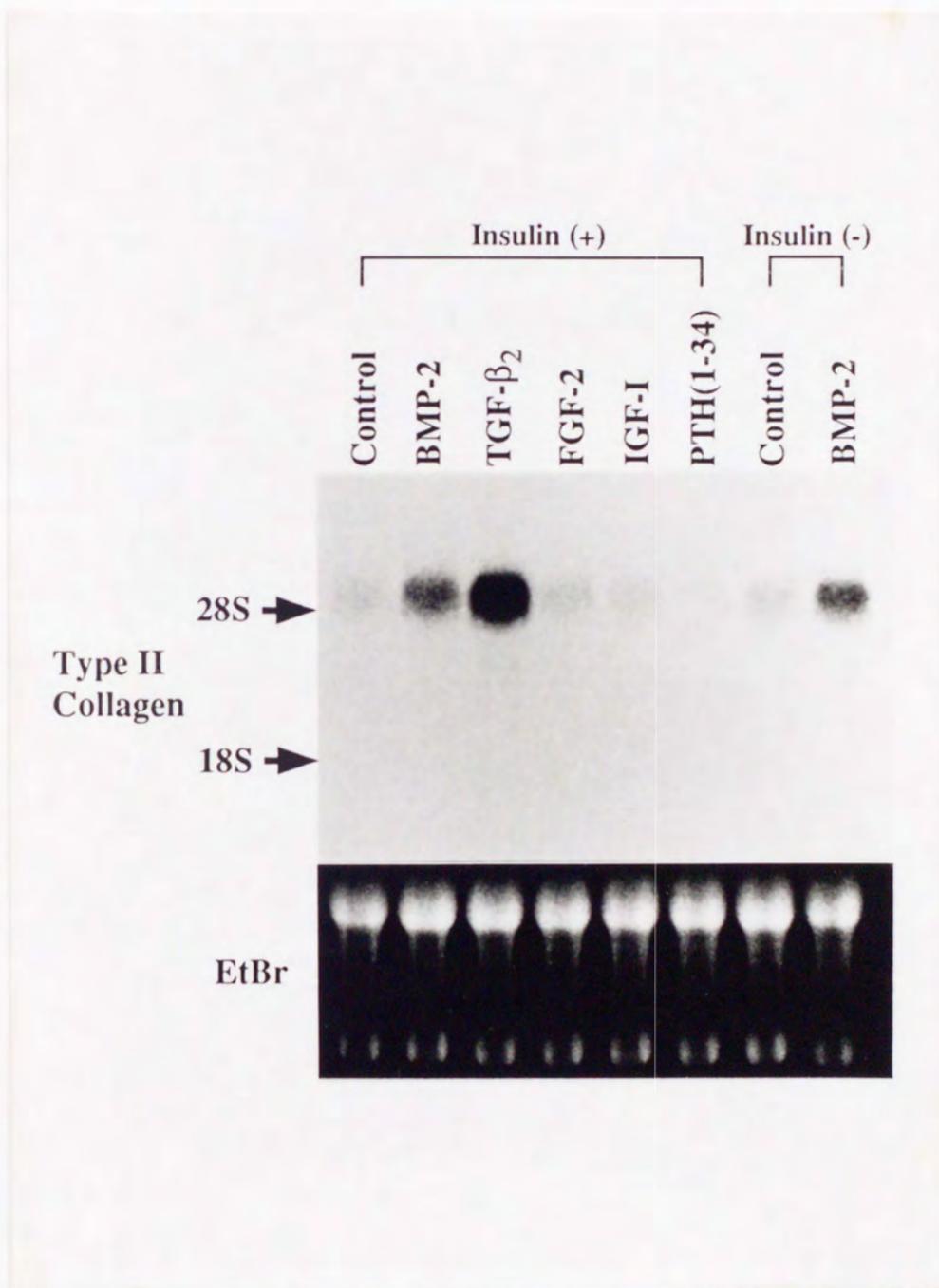


图 5



 6-a

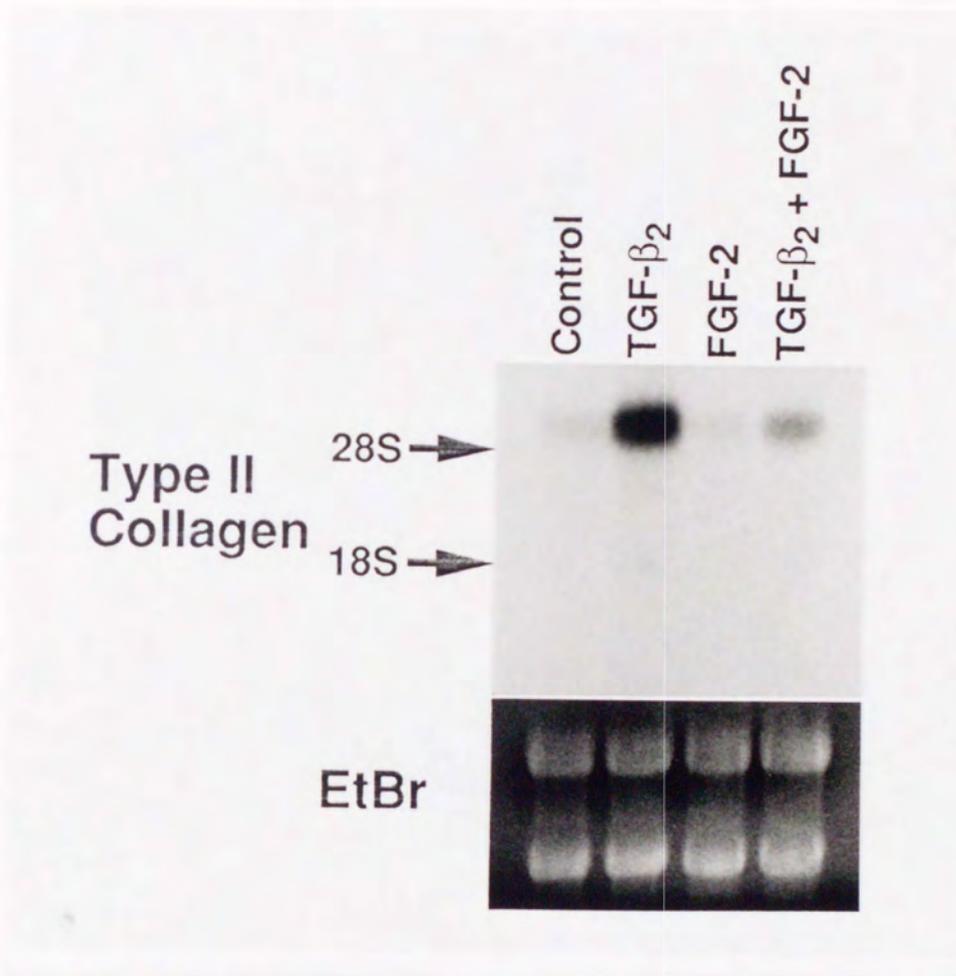
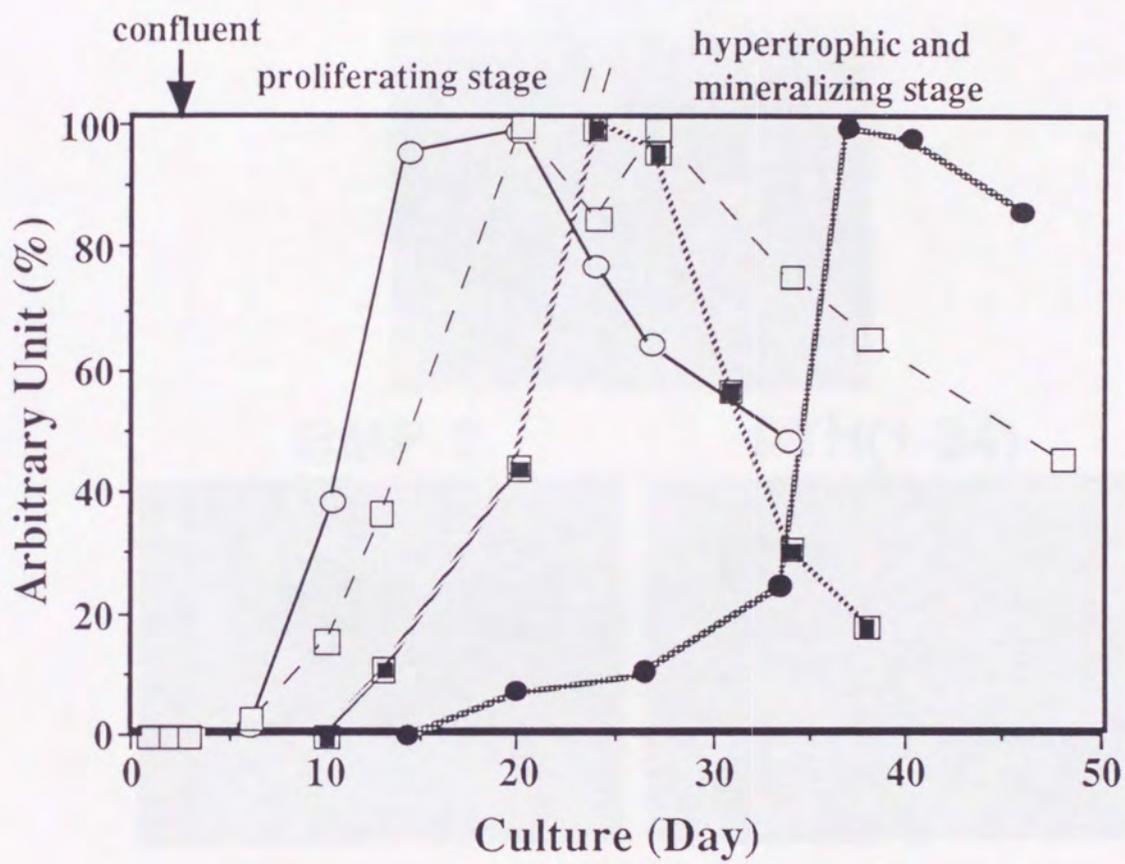


図 6 - b



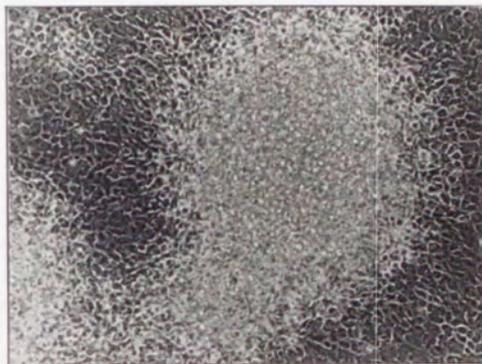
图 7



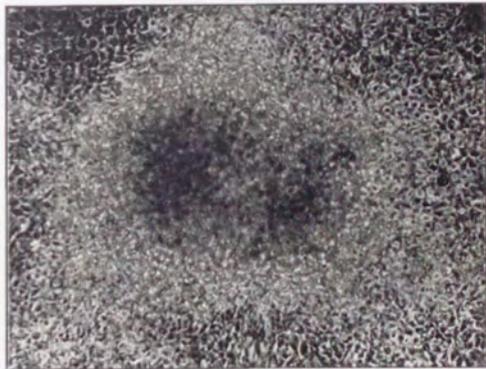
- — ○ Type II Collagen
- - - □ PTH/PTHrP Receptor
- // ■ Aggrecan
- — ● Type X Collagen

图 8

Control



BMP-2



PTH(1-34)

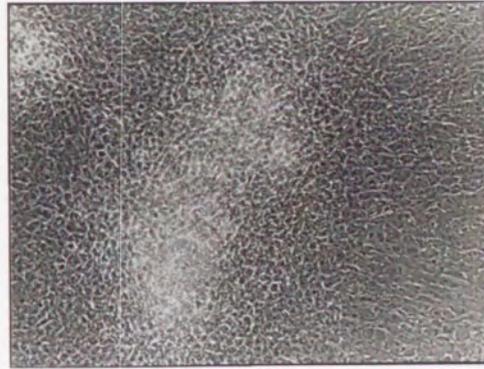
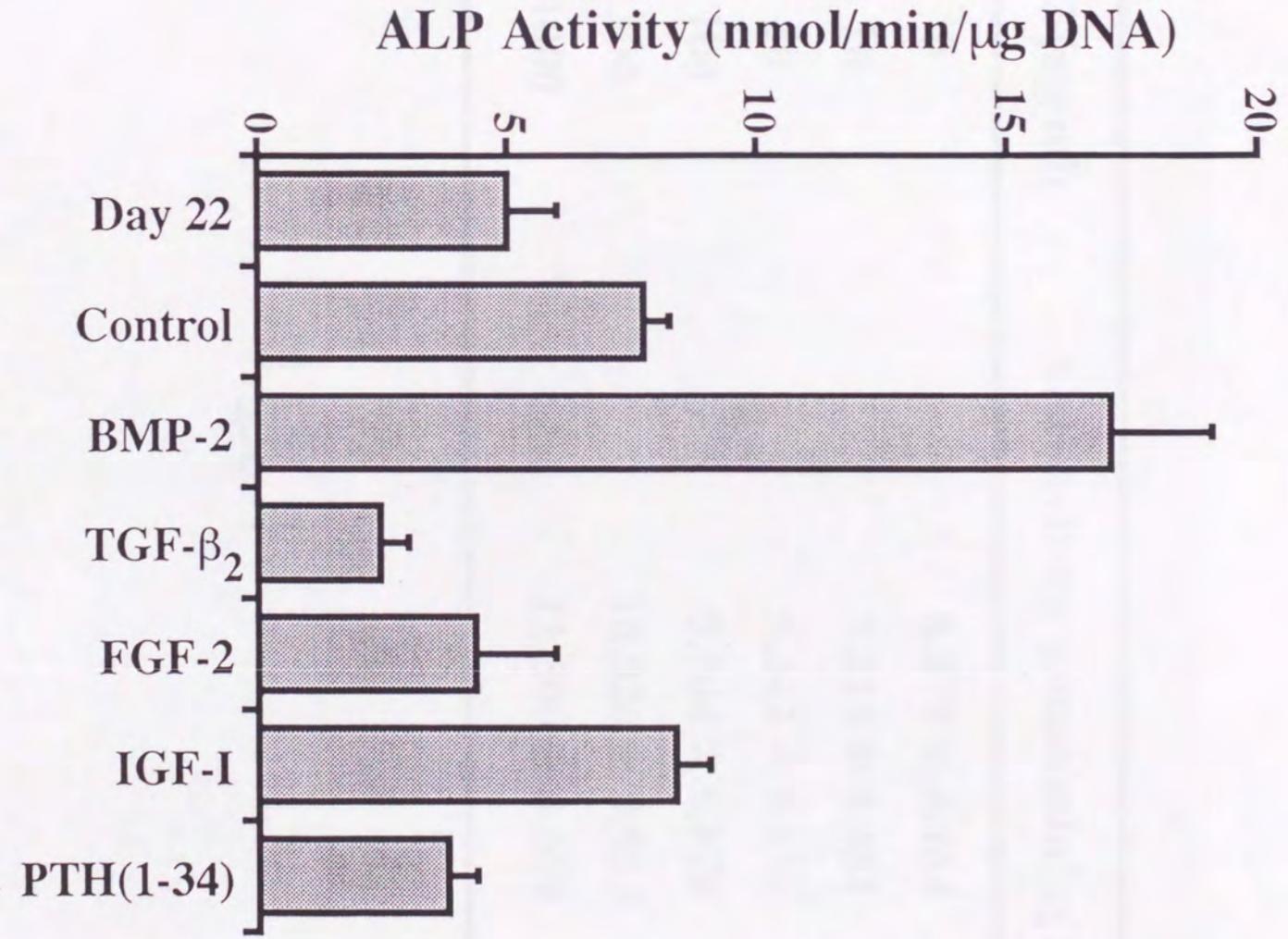


图 9

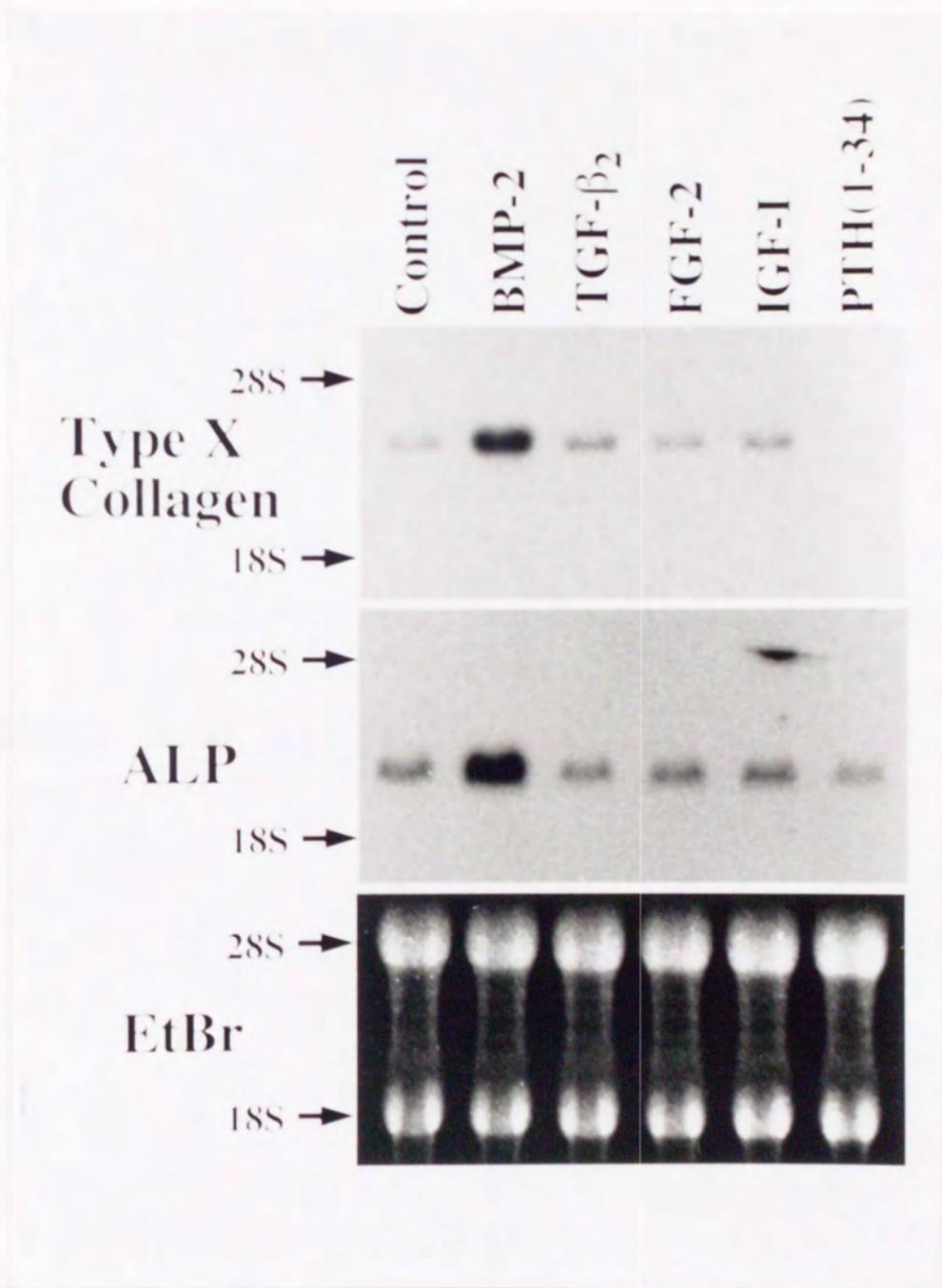
☒ 10

Day 29



BMP-2 (ng/ml)	ALP Activity (nmol/min/ μ g DNA)
0	8.079 \pm 0.464
10	9.211 \pm 0.481
30	9.342 \pm 0.155
100	9.804 \pm 0.078
300	10.926 \pm 0.953
1000	11.300 \pm 0.619

表 1



☒ 1 1 -a

Type X Collagen

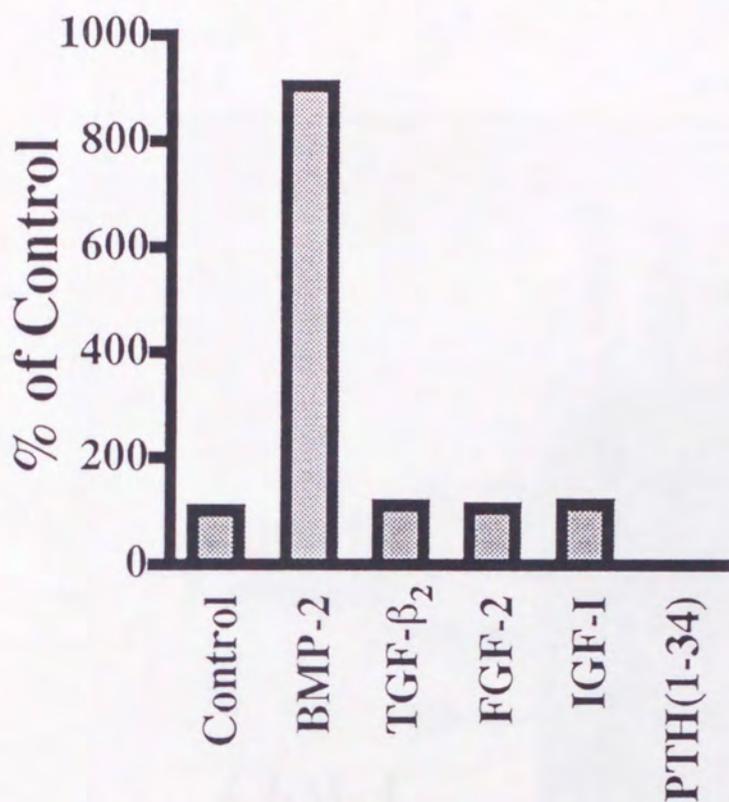


図 11-b

ALP

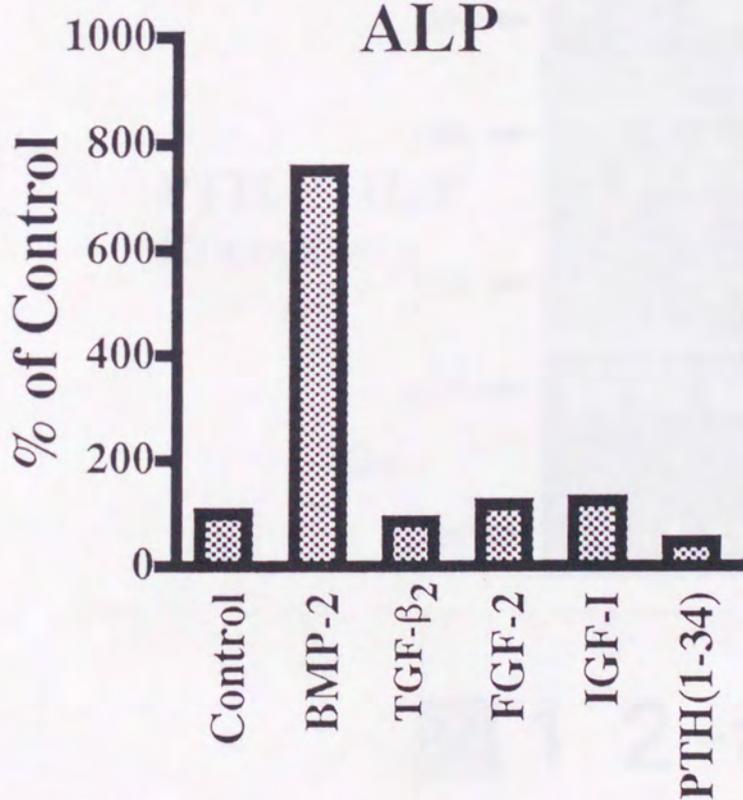


図 11-c

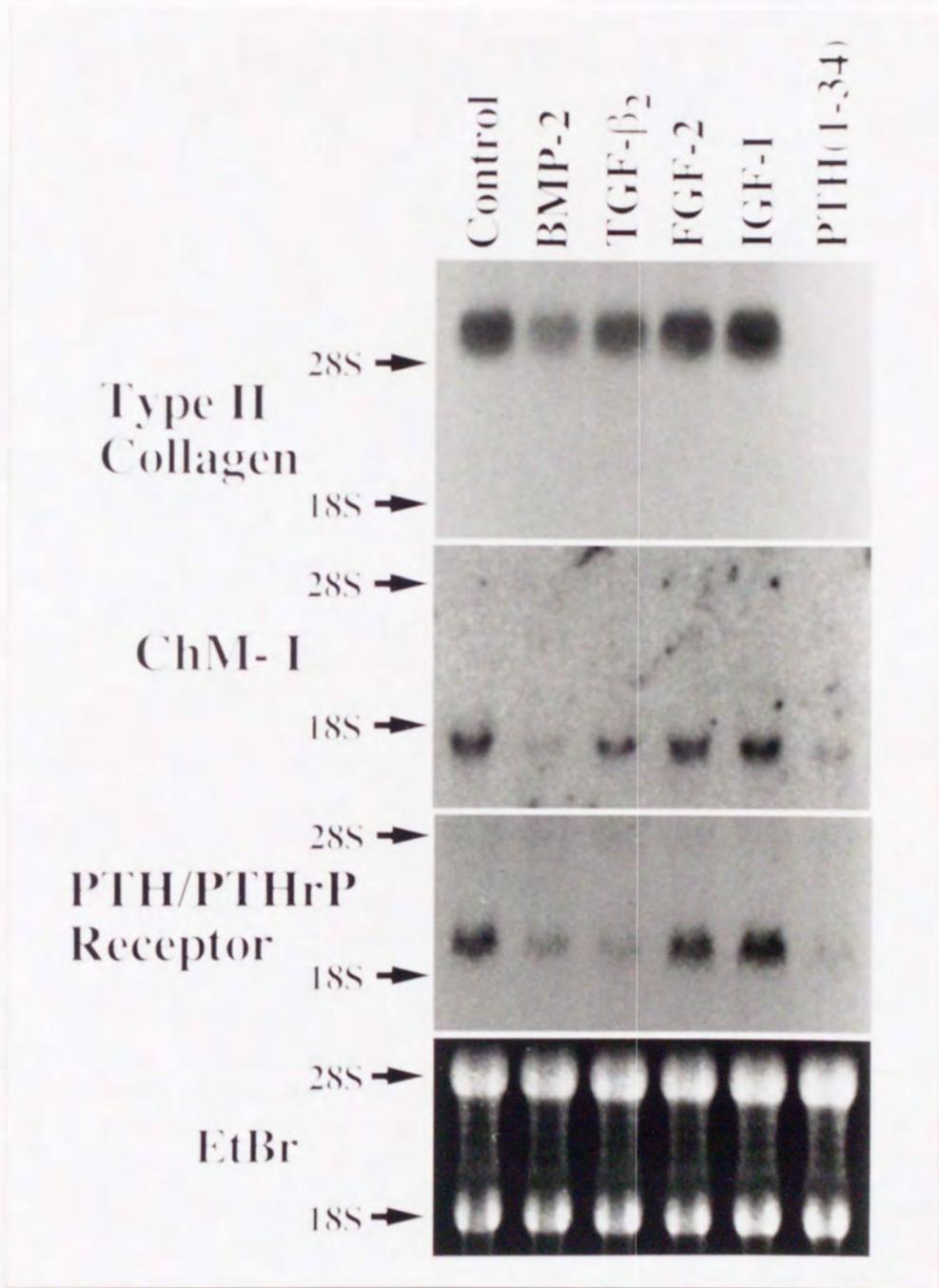


图 1 2-a

図 1 2 - b

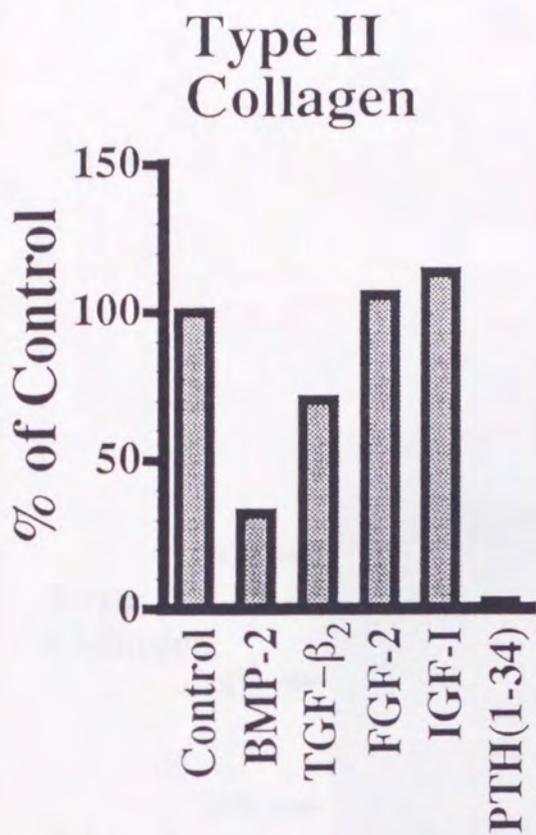
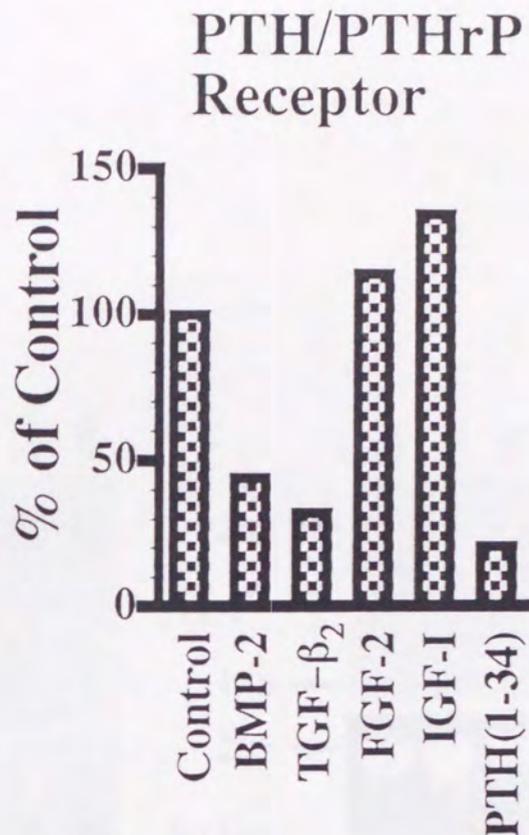


図 1 2 - c



ChM-I

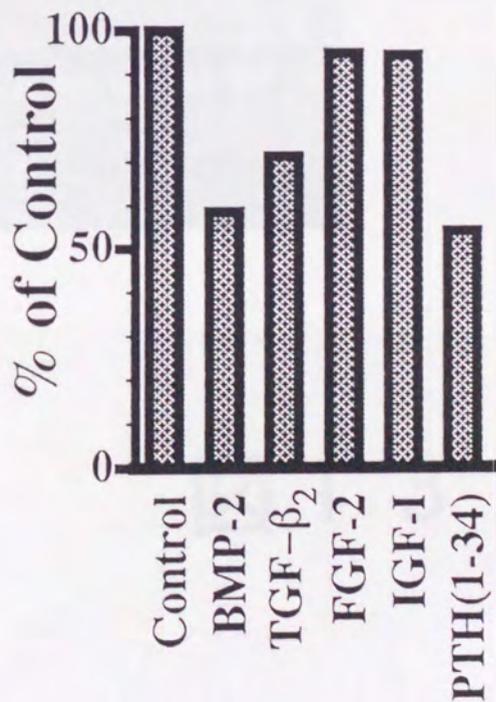


図 1 2 - d

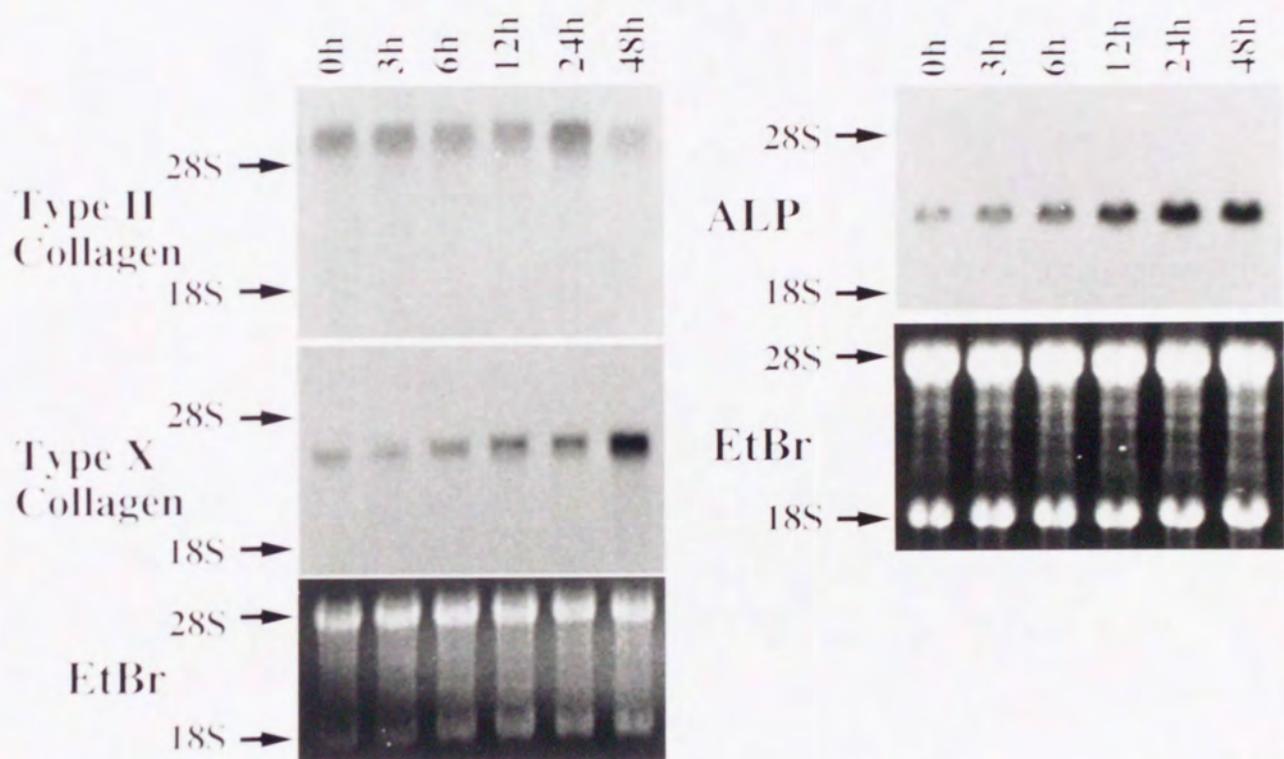


图 1 3

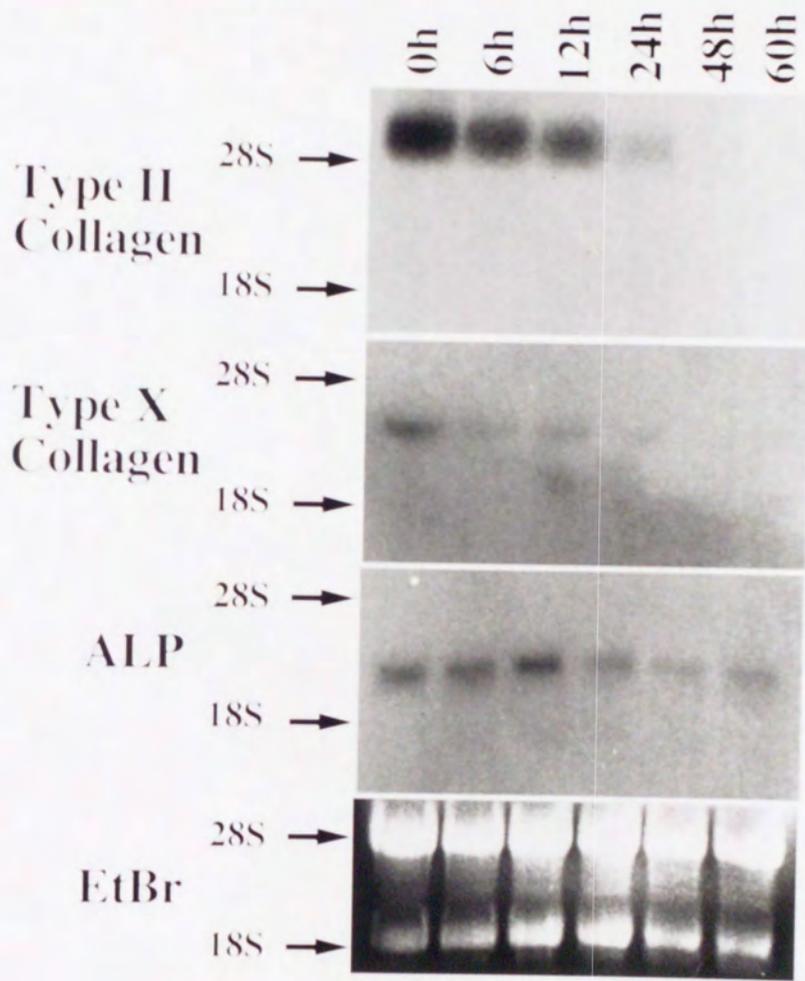


图 1 4

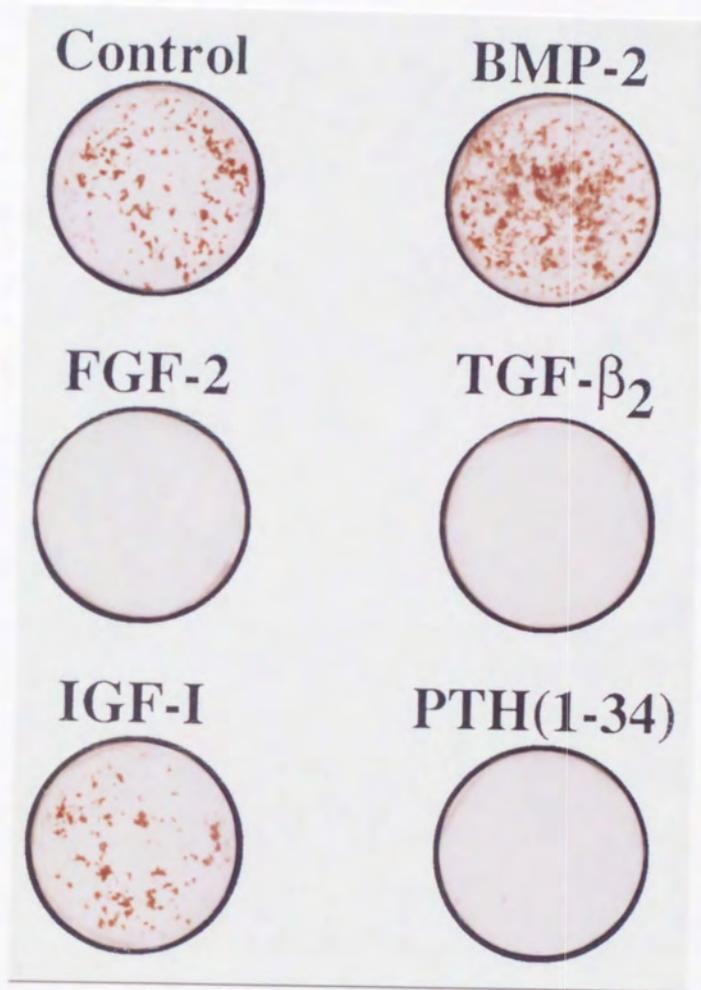


図 1 5

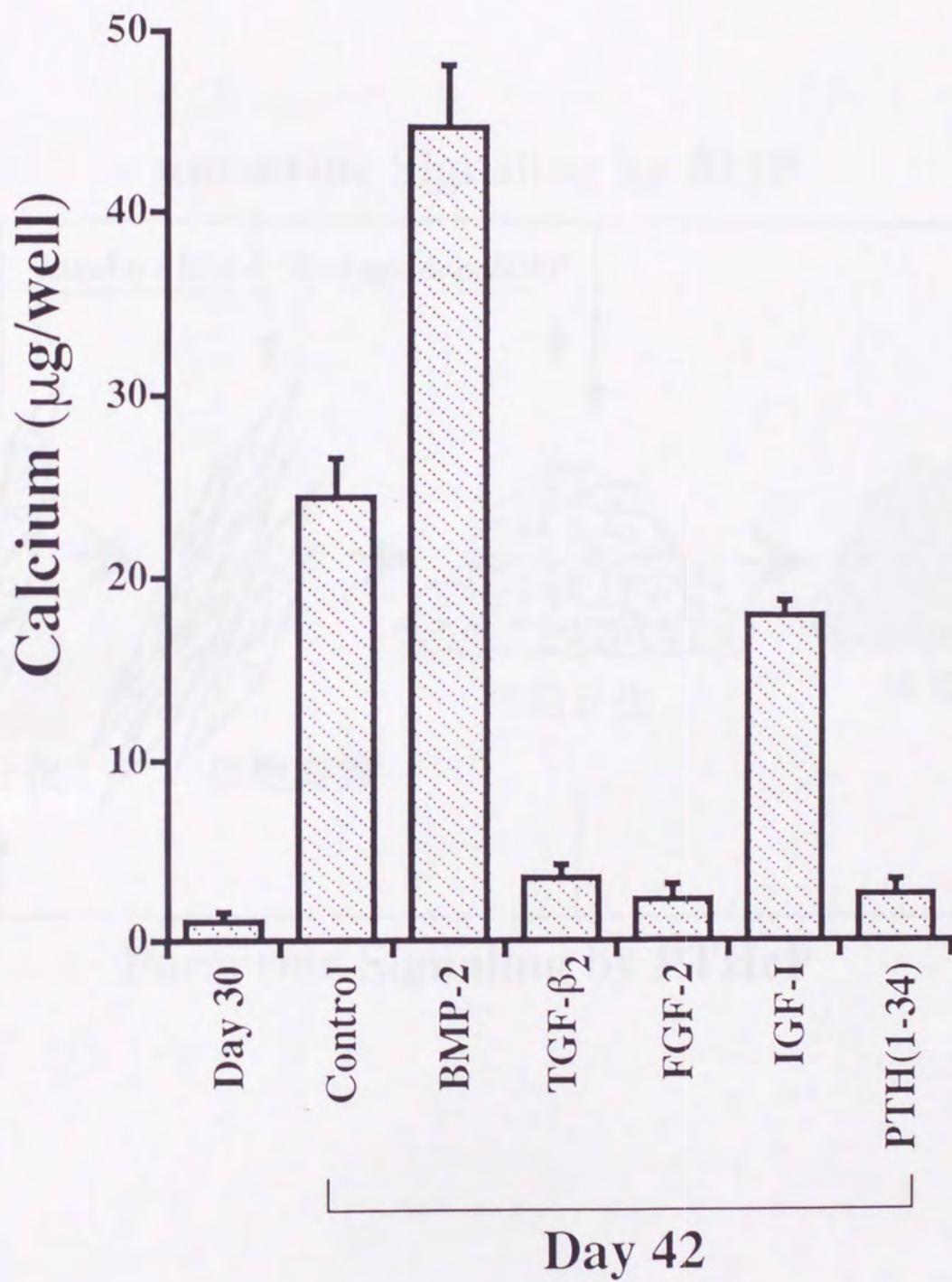


图 1 6

Autocrine Signaling by BMP

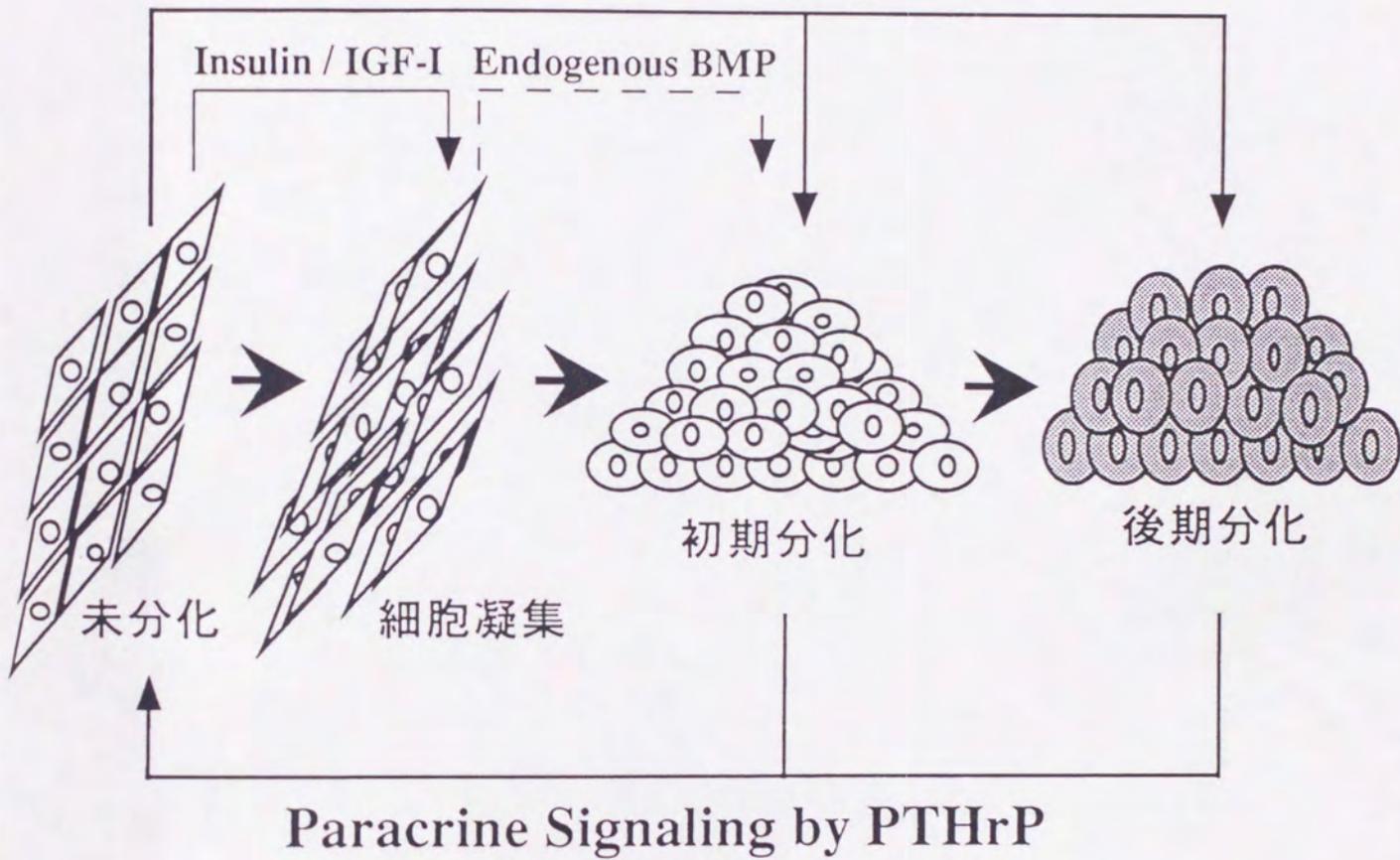


図 1 7

