



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 軟骨細胞の増殖及び分化機能発現に及ぼす軟骨由来因子（CDF）の作用                                                                                                                                                                                                                                    |
| Author(s)    | 井上, 博之                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 1987, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/35577">https://hdl.handle.net/11094/35577</a>                                                                                                                                                                                  |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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

【16】

|         |                                   |       |     |       |
|---------|-----------------------------------|-------|-----|-------|
| 氏名・(本籍) | 井                                 | 上     | 博   | 之     |
| 学位の種類   | 歯                                 | 学     | 博   | 士     |
| 学位記番号   | 第                                 | 7583  | 号   |       |
| 学位授与の日付 | 昭和62年3月12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  | 軟骨細胞の増殖及び分化機能発現に及ぼす軟骨由来因子(CDF)の作用 |       |     |       |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授                        | 作田    | 守   |       |
|         | (副査)<br>教授                        | 鈴木不二男 | 教授  | 常光 旭  |
|         | 助教授                               | 高野 吉郎 | 助教授 | 恵比須繁之 |

論文内容の要旨

骨格の成長には、種々のホルモンが関与しているが、なかでも成長ホルモンの成長促進作用を仲介するソマトメジン(インスリン様成長因子)は、軟骨・骨の形成にとっても、もっとも基本的な役割を演じていると考えられている。また、軟骨・骨細胞は、自ら軟骨・骨の代謝と成長を促進する因子を産生している。ウシ胎仔軟骨から発見された軟骨由来因子cartilage-derived factor(CDF)は、ソマトメジン様の作用を有し、ウサギ肋軟骨細胞の増殖と基質高分子合成を促進することが既に判明している。ところで、軟骨形成のみならず骨格形成とも密接に関連している軟骨培養細胞の増殖と分化機能の発現には、ホルモンや成長因子の他に細胞密度が著明な影響をおよぼすことが知られている。そこで、本研究では、CDFの生理的役割を追求するために、まずウサギ軟骨培養細胞のCDFに対する応答性によぼす細胞密度の影響を検討した。軟骨細胞を低密度( $10^4$ 個/ $\text{cm}^2$ )で培養用ディッシュに播種して、10%血清を含むMEM培地で培養すると、大部分の細胞は線維芽細胞様の扁平な形態を示し、プロテオグリカン合成能は著しく低いものの高レベルの増殖能を示した(sparse培養系)。一方、細胞が増殖してconfluentになると、高レベルの増殖能を有する細胞は減少するものの、高レベルのプロテオグリカン合成能を持った多角型の細胞が出現した(confluent培養系)。軟骨細胞を高密度( $9 \times 10^4$ 個/ $\text{cm}^2$ )で培養用ディッシュに播種して10%血清を含むMEM培地で培養すると、大部分の細胞は球型の形態を呈して互いに重なりあって増殖するとともに、軟骨に特異的な高分子のプロテオグリカンを旺盛に合成した(multilayer培養系)。

これらの軟骨細胞培養系に対するCDFの影響を検討すると、sparseの培養系ではCDFはfibroblast growth factor(FGF)及びepidermal growth factor(EGF)に匹敵する強いDNA合成促

進作用を発現した。しかし、CDFはプロテオグリカン合成に対してほとんど影響を与えなかった。さらに、confluent培養系では、CDFのDNA合成促進作用は弱いものの、プロテオグリカン合成に対してCDFは協力的な促進作用を示した。さらに、multilayerの培養系では、EGFはDNA合成促進活性を発現したが、CDFはDNA合及びプロテオグリカン合成のいずれに対しても殆ど影響を与えなかった。すなわち、軟骨細胞のCDFに対する応答は細胞密度依存性であるとともに、高度に分化した軟骨培養細胞は外因性のCDFに依存することなく増殖して、かつ分化機能を発現することが示された。

次に、CDFの作用機序をさらに追求するために、CDFとFGF及びEGFとの協同作用についてconfluentの軟骨細胞培養系を用いて検討した。CDF単独では、FGFやEGFよりも軟骨細胞のDNA合成促進作用は弱いものの、CDFをFGFあるいはEGFと同時に培養系に添加すると相乗的にDNA合成促進作用を発現した。CDFは、5時間程細胞に作用をさせるだけで持続的に作用させる場合と同等のDNA合成促進作用が発現した。しかし、EGF及びFGFは、G<sub>1</sub>期の間持続的に培養液中に存在することによって最大のDNA合成促進作用を発現した。しかも、DNA合成の協同作用の発現にはCDFが軟骨細胞のG<sub>1</sub>期初期に作用するとともに、EGFあるいはFGFが残りのG<sub>1</sub>期に作用することが必要であった。逆に、G<sub>1</sub>期初期にEGFあるいはFGFを作用させた後、CDFを作用させても相乗作用は発現しなかった。これらの相乗作用は、CDFと同様にMSAについても認められた。すなわち、CDF及びMSAは軟骨細胞のFGF及びEGFなどの非ソマトメジン成長因子に対する感受性を高め、さらにFGF及びEGFは単独でも細胞増殖を促進するものの、CDFやソマトメジンの存在下においてのみその細胞増殖促進作用を最大限に発揮しうることが判明した。

以上の結果から、CDFが直接軟骨細胞の分化機能発現を促進するのみならず、他の成長因子に対する軟骨細胞の増殖応答を制御し、軟骨成長を調節するうえで中心的な役割を演じている事が示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

ウシ胎仔軟骨から発見された軟骨由来因子（CDF）は、ソマトメジン様作用を有することが知られている。本論文はウサギ肋軟骨培養細胞の増殖と分化機能の発現におけるCDFの作用について検討したものである。

まず、軟骨細胞の密度が低い時には、CDFの細胞増殖促進作用のみが発現し、密度が高くなるにつれてプロテオグリカン合成などの分化機能がCDFによって強く発現されること、すなわち、CDFが軟骨細胞の増殖分化の過程で合目目的に機能していることを明確にした。

さらに、CDFは細胞周期のG<sub>1</sub>期初期に作用してDNA合成を促進すること、また、この時期に上皮成長因子や線維芽細胞成長因子と共存させること、DNA合成促進の相乗効果が発現することを明示した。すなわち、軟骨細胞の細胞周期上のG<sub>1</sub>期初期にCDFの作用点があり、この段階で細胞は活性化されて他の成長因子に対する応答性を高めることを明らかにした。

以上のように、CDFが軟骨細胞の増殖と分化機能発現に中心的な役割を演じていることを示した井上君の論文は、今後、顎・顔面の発育における軟骨成長の役割を解明する上での重要な手掛かりを与えたものであり、歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。