



Title	ウサギ肋軟骨初代培養細胞の上皮成長因子レセプター及び副甲状腺ホルモンレセプターに関する研究
Author(s)	木下, 昭弘
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37242">https://hdl.handle.net/11094/37242</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">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

## 【5】

氏名・(本籍)	木下 昭弘
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 9712 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	歯学研究科 歯学臨床系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ウサギ肋軟骨初代培養細胞の上皮成長因子レセプター及び副甲状腺ホルモンレセプターに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 祖父江鎮雄 (副査) 教授 鈴木不二男 教授 岡田 宏 講師 小川 知彦

## 論文内容の要旨

近年、内軟骨性骨形成過程に、種々ホルモンや成長因子等が重要な役割を果たしていることが、初代軟骨培養細胞を用いて、明らかにされつつあり、また、幾つかのホルモン、成長因子に関しては、軟骨細胞にそのレセプターが存在することも報告されている。しかし、軟骨細胞の増殖を促進する一方、分化機能の重要な指標であるグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan : GAG) 合成を抑制する作用を有する上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) や、GAG合成を亢進する作用のある副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone : PTH) については、その劇的な作用が古くより明らかにされていたにもかかわらず、軟骨あるいは培養軟骨細胞に、レセプターが存在するか否かは今日まで明確にされていなかった。

本研究ではこれらのレセプターがウサギ肋軟骨培養細胞に存在することを明らかにするとともに、軟骨細胞の増殖および分化とこれらのレセプターの発現との関連について検討を加えた。

ウサギ肋軟骨成長軟骨より軟骨細胞を分離し、10%ウシ胎仔血清添加イーグルMEM培地にて培養し、実験に供した。放射性リガンドとしては、EGFに関しては、Amersham社製<sup>125</sup>I-EGFを、PTHに関しては、[Nle<sup>8</sup>, Nle<sup>18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]ウシPTH-(1-34)アミドをクロラミンT法によりNa<sup>125</sup>Iでヨード化し、C<sub>18</sub>カラムを用いて、逆相クロマイトグラフィーにより分離精製したものを用いた。EGFの結合実験では、細胞を0.2%牛血清アルブミン(BSA)含有Hepes緩衝液中で放射性リガンドとインキュベーション後、0.2%BSA含有0.8M NaCl溶液で洗浄し、1N NaOHにて溶解して回収し放射能を測定した。同様にPTHの結合実験では、細胞を0.5%BSAおよび5%馬血清添加トリス緩衝液中で放射性リガンドとインキュベーションし、Hanks溶液で洗浄、回収してその放射能を測定した。GAG合

成は、 $^{35}\text{S}\text{o}_4^{2-}$  のGAGへの取り込みを指標として測定した。

結合実験の結果から、Scatchard解析を行ないリガンドとレセプターの親和性（Kd値）および細胞1個あたりのレセプター数を求めた。ウサギ肋軟骨初代培養細胞のEGFレセプターにはKd値が約1.6nMで、細胞1個あたり約 $1.0 \times 10^4$ 個の低親和性レセプターと、Kd値が約0.3nMで、細胞1個あたり約 $0.3 \times 10^4$ 個の高親和性レセプターの2種が存在した。またレセプターとラジオリガンドをdisuccinimidyl suberateを用いクロスリンクさせ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、オートラジオグラフィーを行ったところ、EGFセレプターの分子量は170kDaであることが判明した。同様に結合実験の結果から、ウサギ肋軟骨初代培養細胞のPTHレセプターはそのKd値が0.6-0.9nMで、細胞1個あたり約 $4.0 \times 10^4 - 9.0 \times 10^4$ 個存在した。またPTHレセプターの分子量は72kDaであることが判明した。

軟骨細胞にレチノイン酸、インターロイキン-1 $\beta$ を添加するとGAG合成が低下し、EGFレセプター数は、高親和性のものも低親和性のものもともに増加した。逆にPTHおよびジブチリルサイクリックAMP(DBcAMP)を添加するとGAG合成が亢進し、両EGFレセプター数はともに減少した。なお、いずれの場合も、EGFレセプターの親和性に変化はなかった。また軟骨細胞をレチノイン酸およびEGFで処置し、GAG合成が低下した状態では、PTHレセプター数が減少した。インシュリン様成長因子-IおよびDBcAMPを作用させ、GAG合成が亢進した状態では、PTHレセプター数が増加した。なお、いずれの場合も、PTHレセプターの親和性に変化はなかった。

すなわち、ウサギ肋軟骨初代培養細胞に、従来他の細胞等で報告されているものと物理化学的に、又、分子量的にも同様のEGFレセプターおよびPTHレセプターが存在することが明らかとなた。またEGFレセプターおよびPTHレセプターは軟骨細胞の分化状態を反映しており、EGFレセプターは軟骨細胞の分化機能の負の指標となり、PTHレセプターは軟骨細胞の分化機能の正の指標となることが明らかとなった。さらに各種ホルモン、ビタミン、成長因子は内軟骨形成過程において、お互いに、そのレセプターの発現を調節することにより、生理作用を発現している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

内軟骨性骨形成の過程では種々のホルモンや成長因子が重要な役割を果たしている。即ち、上皮成長因子(EGF)は軟骨細胞の増殖を促進するものの分化機能を抑制すること、これに対し副甲状腺ホルモン(PTH)は分化機能を亢進することが既に知られているが、軟骨細胞に上記両因子のレセプターが存在するか否かは明らかでなかった。本研究者はこの点を追及した結果、まずウサギ肋軟骨培養細胞にEGFおよびPTHのレセプターが存在することを証明し、両者の性質を明らかにした。さらに種々の分化促進因子はPTHレセプター数を増加させるのに反してEGFレセプター数を減少させること、一方増殖を促進し分化を抑制する因子はPTHレセプター数を減少させ、EGFレセプター数を増加させることが明らかとなった。従ってEGFレセプターは軟骨細胞の分化の負の指標となっているのに反して、PTHレセプターは正の指標とみなしうることが明らかとなった。さらに内軟骨性形成過程にお

いては、種々のホルモン、ビタミンおよび成長因子が、お互いにそのレセプターの発現を調節することにより生理作用を発現している可能性が示された。これらの知見は内軟骨性骨形成過程における軟骨細胞の分化の調節機構を考察する上で極めて有益な示唆を与えるものであり、本研究は歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。