

Title	軟骨に存在するプロテオグリカン合成促進因子の精製
Author(s)	中島, 和久
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37245">https://hdl.handle.net/11094/37245</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"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【1】

氏名・(本籍)	なか 中	しま 島	かず 和	ひさ 久
学位の種類	歯	学	博	士
学位記番号	第	9708	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 歯学基礎系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	軟骨に存在するプロテオグリカン合成促進因子の精製			
論文審査委員	(主査)			
	教授 鈴木不二男			
	(副査)			
	教授	常光	旭	助教授 齊藤 喜八 講師 平地 慶行

論文内容の要旨

(目 的)

軟骨細胞は高分子コンドロイチン硫酸プロテオグリカンとⅡ型コラーゲンを大量に産生する高度に分化した細胞である。この軟骨基質の合成は、各種のホルモンと成長因子により制御されている。さらに、軟骨細胞自身が産生する局所因子が軟骨基質合成の調節に関与していることが古くから示唆されている。しかし局所因子については未だ不明な点が多い。最近、軟骨にはインスリン様成長因子 (IGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) およびトランスフォーミング成長因子-β (TGF-β) が存在することが報告された。また、Katoらは軟骨細胞がソマトメジン様因子を産生することを報告した。さらに、ウシ胎仔軟骨よりソマトメジン (somatomedin = IGF) と同等の生物学的活性を持つ分子量11,000の軟骨由来因子 (cartilage-derived factor, CDF) を分離した。本研究では、ウシ胎仔軟骨より分子量17,000 (CDF-1) と22,000 (CDF-2) のプロテオグリカン合成促進因子を精製した。さらに、いずれのCDFも軟骨細胞の受容体と特異的に結合した。

(結 果)

1) ウシ胎仔軟骨を1Mグアニジン塩酸にて抽出した後、アセトン分画と限外濾過法にて、分子量1万から2万の画分 (10-20k画分) および2万から30万の画分 (20-300k画分) を得た。10-20k画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に展開した後、ゲルから蛋白質を抽出してプロテオグリカン合成促進活性を測定すると、分子量6-11kDa, 14-17kDa および22-26kDaに相当する三つの画分に促進活性が出現した。6-11kDa画分には<sup>125</sup>I-IGF-Iの軟骨細胞への結合を阻害するIGFが存在していたが、他の画分には存在しなかった。一方、20-300k画分をSDS-ポリアクリル

アミドゲル電気泳動に展開した後、ゲルから抽出した蛋白質を軟骨細胞培養系に添加すると、分子量22-26kDa, 14-17kDa及び10kDa以下に相当する3つの画分にプロテオグリカン合成促進活性が局在した。しかし、20-300k画分のいずれのゲル部位にもIGFは存在しなかった。

- 2) 10-20k画分をヘパリン親和性クロマトグラフィー、等電点電気泳動、陽イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相のHPLCに転換した。プロテオグリカン合成促進活性は、 $C_{18}$ カラムより31%の2-プロパノールにより溶出した。活性画分を $^{125}$ Iで標識して、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると、還元・非還元条件下ともに分子量17kDaの単一バンドが得られた。
- 3) 17kDa CDF (CDF-1) は20ng/mlの低濃度でプロテオグリカン合成を有意に促進して100ng/mlで最大活性を示した。
- 4)  $^{125}$ I-CDF-1は培養軟骨細胞に4°Cで特異的に結合した。この結合は、過剰量の未標識CDFで阻害されたが、IGF-I, FGF, TGF- $\beta$ あるいはインターロイキン-1では抑制されなかった。
- 5) 20-300k画分を、ウサギ血清蛋白質親和性クロマトグラフィー、等電点電気泳動、陽イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相のHPLCに展開した。プロテオグリカン合成促進活性は $C_{18}$ カラムより26%の2-プロパノールにて溶出した。この活性画分を $^{125}$ Iで標識してSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると、還元・非還元条件下ともに22kDaのバンドが得られた。このバンドはN-グリカナゼ消化により18kDaに分子量が低下した。
- 6) 精製した22kDa CDF (CDF-2) は10ng/mlの濃度でプロテオグリカン合成を促進した。その比活性はIGF-Iよりも10倍高かった。
- 7)  $^{125}$ I-CDF-2は培養軟骨細胞に4°Cで特異的に結合した。この結合は過剰量の未標識CDFで阻害されたがIGF-I, IGF-II, FGFあるいはTGF- $\beta$ では抑制されなかった。

#### (考察と結論)

ウシ胎仔軟骨中には6-11kDa, 14-17kDaおよび22-26kDaの3種類のプロテオグリカン合成促進因子が存在した。低分子量(6-11kDa)のCDFの少なくとも一部はIGFであることが示された。しかし、今回精製したCDF-IとCDF-IIは生物活性、分子量および受容体への結合の特異性などの点からFGFやTGF- $\beta$ およびIGF-Iなどの既知の成長因子とは異なっていた。本研究の結果は、軟骨細胞の分化機能発現の調節機構に分子量17kDaと22kDaのプロテオグリカン合成促進因子が関与していることを示唆している。

### 論文審査の結果の要旨

軟骨細胞が産生する高分子型プロテオグリカンは軟骨細胞の分化機能の指標とされている。この基質の合成が各種のホルモンや成長因子により制御されていることはよく知られているが、この他に軟骨細胞自身が産生する局所因子も基質合成に関与していることが示唆されている。しかし、その実体は未だに解明されていなかったので中島君はウシ胎仔軟骨から軟骨細胞のプロテオグリカン合成促進因子の精

製を試みた。

その結果、新鮮なウシ胎仔軟骨を 1 M グアニジン塩酸で抽出し、アセトン分画、限外濾過、各種のクロマトグラフィーを組み合わせることにより、インスリン様成長因子と一致する画分 (6 - 11kDa) 以外に、既知の成長因子とは異なる少なくとも 2 種類の強力なプロテオグリカン合成促進因子 (17kDa および 22kDa) を精製することに成功した。さらに、ウサギ肋軟骨細胞には、上記両因子に対する受容体が存在することも証明した。以上のように中島君の論文は軟骨細胞の分化機能発現調節機構の解明に貢献するところが大きく、歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。