



Title	ヒト軟骨肉腫由来のクローン化軟骨培養細胞株（HCS-2/8）の分化機能に関する研究：プロテオグリカンの構造と組成並びに合成能維持機構について
Author(s)	潘, 海鷗
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37249">https://hdl.handle.net/11094/37249</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	潘	海	鷗
学位の種類	歯学	博士	
学位記番号	第	9709	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	ヒト軟骨肉腫由来のクローン化軟骨培養細胞株 (HCS-2/8) の分化機能に関する研究: プロテオグリカンの構造と組成並びに 合成能維持機構について		
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木不二男 (副査) 教授 猪木 令三 講師 三木 靖夫 講師 浦出 雅裕		

### 論文内容の要旨

#### (目的)

由来組織特有の機能を有し、また、無限に増殖する培養細胞株、いわゆる「樹立細胞株」は最近のバイオテクノロジーの進歩とともにますますその重要性を増してきた。しかし、軟骨細胞に関しては、分化機能を保持した培養細胞株の樹立は長らく成功しなかったが、最近申請者らはヒト分化型軟骨肉腫よりクローン化軟骨肉腫培養細胞株HCS-2/8を樹立した。本細胞は軟骨細胞の分化機能の指標とされるプロテオグリカン (PG) を活発に合成し、また、軟骨に特異的なII型コラーゲンを合成する性質を有している。

本研究では、HCS-2/8細胞が真に軟骨細胞としての分化機能を有しているか否かをさらに詳細に調べるために、最も重要なマーカーであるPGを分析し、正常軟骨細胞と比較するとともに、本細胞がいかにして分化機能を維持し得るかその機構について検討を加えた。

#### (結果)

##### 1 HCS-2/8細胞が産生するPGの分析

- 1) 細胞を<sup>35</sup>S-硫酸でラベルし、PGモノマーを4Mグアニジン塩酸で抽出後、dissociativeな条件下でSepharose CL-2Bカラムに展開すると高分子の軟骨型PGモノマーの大きなピークが認められた。
- 2) PGを<sup>3</sup>H-グルコサミンでラベルし4Mグアニジン塩酸で抽出後、通法にしたがってassociative及びdissociativeな条件下で塩化セシウム密度勾配遠心を行いPGモノマーとリンク蛋白質を調製した。まず、SDS-PAGEでリンク蛋白質の分子量を求めるところ42kDaであった。一方、PGモ

ノマーをアルカリ及びプロナーゼ処理してグリコサミノグリカン (GAG) 鎖を Superose 12 FPLC に展開すると分子量38kDa に単一の大きなピークが認められた。なお、このピークのGAG 鎖は主にコンドロイチン6-硫酸、4-硫酸、コンドロイチンにより構成されており、特にコンドロイチン6-硫酸が多かった。

3)  $^{35}\text{S}$ -硫酸でラベルした全GAGをコンドロイチナーゼAC II, ABC 及びケラタナーゼで消化して、硫酸化GAGの構成糖を分析したところ、コンドロイチン6-硫酸、4-硫酸、ケラタン硫酸が存在した。

4) ウロニン酸定量により求めた全GAGに対するヒアルロン酸の含量は約24%であった。

## 2 HCS-2/8細胞の分化機能発現におけるインシュリン様成長因子 (IGF) の役割

1) IGFは軟骨細胞の分化機能の発現と増殖に重要な役割を果たしていることはすでに報告されているが、HCS-2/8細胞に IGF-I および II を作用させると軟骨型PGの合成が著明に亢進した。しかし、本細胞はウサギ肋軟骨初代培養細胞とは異なり、IGF-I よりも IGF-II によく応答した。

2) コンフルエントに達した本細胞を血清不含培地で培養しても PG合成は少なくとも72時間は低下しなかったが、途中で培地を交換すると PG合成が顕著に低下した。

3) 本細胞の conditioned medium (CM) を透析、濃縮して HCS-2/8 細胞に添加すると PG 合成が亢進した。

4) 本細胞の CM 中の IGF-I 及び II をラジオイムノアッセイで測定したところ、自身の PG 合成を促進する濃度の IGF-II が検出できた。なお、本細胞は IGF-I も産生していたがその濃度は低かった。

5) 本細胞に IGF-I 及び IGF-II 受容体が存在した。

### (考 察)

HCS-2/8細胞はコンドロイチン6-硫酸と4-硫酸、さらにケラタン硫酸から構成されるGAGを主な構成糖鎖とする軟骨型PGモノマーを産生しており、このモノマーとヒアルロン酸及び分子量42kDaのリンク蛋白質とがPG集合体を形成していることが明らかとなった。また、本細胞のPG合成が軟骨細胞の分化機能の発現に基本的な役割を果たす成長因子であるIGFで亢進したこと、本細胞にIGF受容体が存在したことは、本細胞が軟骨細胞として基本的な分化機能を有することを示している。さらに、IGF-I よりも IGF-II によく応答したこと、PG合成を促進する濃度の IGF-II を産生したことから本細胞の分化機能の維持に自身が産生する IGF-II が重要な働きをしている可能性が示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

近年、分化機能を保持した各種組織の培養細胞株が基礎研究や生理活性物質の生産に活用されている

が、軟骨細胞に関しては、このような細胞株は得られていなかった。しかし、最近、滝川らによってヒト軟骨肉腫由来細胞株が樹立されHCS-2/8と命名された。そこで本研究者はこの細胞が産生するプロテオグリカン（PG）を分析するとともに、PG合成の制御機構について検討した。

その結果、HCS-2/8細胞は軟骨型PG・モノマー、ヒアルロン酸および42kDaのリンク蛋白質から成る分化型PG集合体を産生していること、この細胞にはインスリン様成長因子（IGF）の受容体が存在するばかりではなくこの細胞自身もIGFを産生していること、またHCS-2/8細胞はIGF-IIに強く応答してPG合成を亢進することなどを明らかにした。以上のように、新たに樹立されたヒト軟骨肉腫細胞株が分化型軟骨細胞としての特徴を高度に保持していることを明らかにした本論文はこの細胞の増殖・分化の維持機構の解明や、この細胞株を利用した生理活性物質の生産を試みる際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。