



Title	軟骨細胞の肥大化と石灰化に対する副甲状腺ホルモンの作用 : cAMPの関与
Author(s)	實光, 章年
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38042">https://hdl.handle.net/11094/38042</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

氏 名	じつ  こう  あき  とし 實  光  章  年
博士の専攻分野の名称	博 士  ( 歯 学 )
学位記番号	第 1 0 2 2 1 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科 歯学臨床系専攻
学位論文名	軟骨細胞の肥大化と石灰化に対する副甲状腺ホルモンの作用 : cAMPの関与
論文審査委員	(主査) 教 授  淵端  孟 (副査) 教 授  鈴木不二男  講師  松尾  三郎  講師  山本  照子

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

副甲状腺ホルモン (PTH) は、血中のカルシウム濃度の調節に重要な役割を果たしている。また、PTH は成長板軟骨細胞に対して、軟骨プロテオグリカンの合成を促進するほかに最終分化の強力な抑制因子として作用することが判明している。一方、細胞内セカンドメッセンジャーとして多様な反応に関与している cAMP は軟骨細胞でも PTH に応答して、細胞内レベルが上昇することが報告されている。本研究では、ウサギ成長板軟骨細胞石灰化システムを用いて、軟骨細胞の肥大化と石灰化に対する PTH と cAMP の役割について検討した。

### (材料と方法)

生後 4 週齢のウサギ肋軟骨より、成長板軟骨細胞を分離し、Ⅱ型コラーゲンでコートした 96 穴プレートに 2 万個播種し、10% 牛胎児血清を含む  $\alpha$  MEM にて培養した。本実験系に、各種の PTH 断片および、細胞膜透過性の cAMP 誘導体である dibutyryl cAMP (DBcAMP) や 8-bromo-cAMP (8-br-cAMP), adenylate cyclase の活性化剤である forskolin, phosphodiesterase の阻害剤である methylisobutylxanthine (MIX) を添加して細胞内の cAMP 濃度を変化させ、成長板軟骨の肥大化と石灰化に対する影響を評価した。

### (結 果)

#### 1. 成長板軟骨細胞の最終分化に対する PTH 断片の作用

成長板軟骨石灰化システムでは、軟骨細胞は、培養 3 日目にコンフルエントになり、培養 8 日目よりアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性が上昇し始め、培養 28 日目に最大となる。また、ALPase

活性の上昇に10日遅れて、培養18日目より細胞外基質への $^{45}\text{Ca}$ の取り込みが上昇し、培養35日目には細胞層は硬組織を形成する。本培養系に各種のPTH断片を添加したところ、細胞内cAMPレベルを上昇させるPTH 1-34断片は成長板軟骨細胞の肥大化と、石灰化を濃度依存性に抑制した。一方、細胞内cAMPレベルを変動させない他のPTH断片3-34, PTH 7-34, PTH 13-34, PTH 39-68は、軟骨最終分化に影響しなかった。

## 2. 成長板軟骨細胞の肥大化に対するcAMPの作用

本培養系に、 $20\mu\text{M}$ のDBcAMPを培養3日、7日、12日、16日、19日、24日、32日から添加するとALPase活性抑制効果は24時間後より現われ最大で95%抑制した。しかも培養3日目から添加した群では34日間の培養でもALPase活性は全く上昇しなかった。しかも、この抑制は可逆的でありDBcAMPを培養液中から除くと速やかにALPase活性は対照群と同レベルにまで回復した。次に培養8日目から12日目までの4日間、 $0.3\mu\text{M}$ から $1\text{mM}$ まで各濃度のDBcAMPを培地に添加したところ、 $5\mu\text{M}$ のDBcAMP添加によりALPase活性をほぼ完全に抑制した。また、8-br-cAMPを添加してもほとんど同じ効果であった。同様にforskolinやMIXを添加し細胞内のcAMPレベルを上昇させると $1\mu\text{M}$ のforskolinは85%、 $0.1\text{mM}$ のMIXはALPase活性を65%抑制した。しかしDBcGMP, cAMP, AMP, ATP, sodium butyrateは $0.1\text{mM}$ の高濃度でもALPase活性にほとんど影響しなかった。これらの結果より、細胞内cAMP濃度の上昇は成熟軟骨細胞から肥大化軟骨細胞への分化を抑制することが判明した。

## 3. 石灰化に対するcAMPの作用

培養17日目より培地中に様々な濃度のDBcAMPを添加し、細胞層を $^{45}\text{Ca}$ で3時間ラベルして $^{45}\text{Ca}$ の取り込みを測定した。DBcAMPは濃度依存性( $\text{ED}_{50}$ ,  $3\mu\text{M}$ )に $^{45}\text{Ca}$ の取り込みを抑制した。次に $20\mu\text{M}$ のDBcAMPを培地に添加して培養35日目、50日目に細胞外基質に沈着したカルシウム含量を測定した。DBcAMP添加群では培養50日目でもカルシウム含量が増加せず石灰化しない関節軟骨と同レベルであった。

## 4. プロテオグリカン合成に及ぼすcAMPの作用

培養細胞がコンフルエントに達した後、各濃度のDBcAMP、8-br-cAMPを36時間作用させ $^{35}\text{S}$ 硫酸で3時間ラベルし $^{35}\text{S}$ 硫酸のグリコサミノグリカンへの取り込みを測定した。DBcAMPと8-br-cAMPは濃度依存性に取り込みを促進したが、このときの $\text{ED}_{50}$ は約 $30\mu\text{M}$ であり最終分化および石灰化を抑制する $\text{ED}_{50}$ の10倍もの高濃度であった。

### (考 察)

本研究の結果より、軟骨細胞でcAMPは低濃度で最終分化を抑制し、高濃度でプロテオグリカン合成を促進することが判明した。cAMPが異なる濃度で二種類の作用をもつ理由は不明であるが、最終分化が進行すると軟骨細胞は増殖能も基質産生能も不可逆的に失うことが知られている。したがって、高レベルのcAMPによる基質合成の促進の以前に、低レベルのcAMPにより早熟な最終分化が完全に抑制されているという前提が必要であると推察される。また、これらの結果は、PTHの作用の一部にcAMP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

生体組織における石灰化の機構の解明には細胞培養系で石灰化を誘導することができる実験系の開発が重要である。本研究ではまず、石灰化を広範囲に再現性よく誘導できる簡便な実験系を開発し、次いで本実験系を用い成長板軟骨細胞の肥大化と石灰化に対する PTH の作用と cAMP の役割について検討した。その結果、cAMP の細胞内レベルを上昇させる PTH [1-34] 断片のみが成長板軟骨細胞の肥大化と石灰化を抑制し cAMP は 0.003-0.01mM の低濃度で軟骨細胞の最終分化と石灰化を強力かつ可逆的に抑制することが判明した。以上の研究は生体の石灰化機構の解明に有用な実験系を開発するとともに、軟骨細胞の最終分化に対する PTH の作用と cAMP の役割を明かにした点で価値ある業績であり、博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認められる。