The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	軟骨細胞の分化に伴う塩基性線維芽細胞成長因子受容体の変動
Author(s)	島津, 篤
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3060213
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏　　名	島　津　　篤（しまづ　あつし）
博士の専攻分野の名称	博　士　（歯学）
学位記番号	第　10214　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　歯学基礎系専攻
学位論文名	**軟骨細胞の分化に伴う塩基性線維芽細胞成長因子受容体の変動**
論文審査委員	(主査) 教　授　鈴木不二男 (副査) 教　授　浜田　茂幸　　助教授　雫石　聰　　講師　工藤　照夫

論文内容の要旨

（目　的）

軟骨細胞の増殖と分化は，骨格の成長および骨折治癒の過程で重要な役割を果たしている。骨・軟骨移行部に存在する成長板や骨折部に出現する一時性軟骨では，軟骨細胞が増殖，基質形成，肥大化という一連の細胞変化を経た後基質の石灰化を誘導する。さらに石灰化軟骨部に毛細血管と骨前駆細胞が侵入して骨の形成が起こる。

以前の研究で塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）は，軟骨細胞の最も強力な増殖促進因子であり，しかも軟骨細胞の基質産生能を安定化することが判明している。また，bFGFは，基質を産生する成熟軟骨細胞から石灰化担当細胞である肥大軟骨細胞への最終分化をも抑制する。即ち，bFGFは軟骨細胞の各分化過程で多様な作用を有する。しかも軟骨細胞自身がbFGFを産生することは興味深い。しかし軟骨細胞のbFGF受容体についてはこれまで報告がない。本研究では，bFGFおよびbFGF以外の成長因子と各種のホルモンの受容体が軟骨細胞の分化過程でどのように変動するかを検討した。

（方　法）

1．ウサギ肋軟骨及び膝関節軟骨は，生後4週齢のニュージランド白ウサギより鈴木らの方法に従って単離培養した。

2．^{125}I－bFGFの結合は，^{125}Iで標識したbFGFを4℃で維持した軟骨細胞培養系に添加し90分間インキュベートした後，細胞に結合した^{125}I－bFGFの放射能をγ－カウンターにて測定した。

3．bFGF受容体の検出は，^{125}Iで標識したbFGFとDSS（化学架橋剤：disccinimidyl suberate）存在下で軟骨細胞または軟骨スライスをインキュベートして，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に

展開した後オートラジオグラムにて検出した。

4．肥大軟骨細胞の分化機能の指標としてアルカリホスファターゼ（ALPase）活性と^{45}Caの取り込みを測定した。

（結　　果）

1．軟骨細胞と^{125}Iで標識したbFGFをDSS存在下でインキュベートして，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に展開すると155 kdのbFGF－受容体複合体を示すバンドが出現した。従って，bFGFの分子量を差し引くとbFGF受容体の分子量は約135kdであった。

2．軟骨細胞のbFGFの結合能は増殖期で最も高く，成熟期よりやや減少しはじめ，最終分化が終了するとほとんど消失した。なお，Scatchard解析によりbFGF結合の減少は親和性の低下ではなく受容体の減少であることが判明した。また増殖軟骨細胞は細胞1個あたり1900個のbFGF受容体を発現していた。

3．軟骨細胞培養系にbFGFを添加して，肥大軟骨細胞の指標であるALPase活性と^{45}Caの取り込みの変動を検討した。最終分化の前にbFGFを添加すると，ALPase活性と^{45}Caの取り込みは低下するが，最終分化が完了した時期にbFGFを添加してもALPase活性と^{45}Caの取り込みに影響しなかった。すなわち軟骨細胞は最終分化するとbFGFへの感受性を失った。

4．最終分化能のない関節軟骨細胞を用いて，bFGF受容体の変動を追跡すると，成長板軟骨細胞ではbFGF受容体は16日以降減少するのに対して，関節軟骨細胞では全培養期間を通じてbFGF受容体は緩やかにしか減少しなかった。従って，bFGF受容体の減少は最終分化と密接に連動していた。

5．一方，1,25(OH)$_2$ビタミンD_3受容体は，増殖期にほとんど検出されなかったが，肥大化期に約40倍増加した。副甲状腺ホルモンとインスリン様成長因子-I受容体は，増殖期で低く成熟期で最も高レベルとなり肥大期には低下した。上皮成長因子（EGF)とトランスフォーミング成長因子－β1（TGF-β1）の受容体は，各分化段階でほとんど変動しなかった。すなわち軟骨細胞の最終分化に伴う受容体の消失はbFGFに特異的であった。

6．実体顕微鏡下で分離した肋軟骨成長板連続スライス（0.2mm)を用いて，軟骨細胞の最終分化に伴うbFGF受容体の減少が組織レベルにおいても，実際に起こっているか否かを検討した。成長板では軟骨細胞が最終分化すると共に，bFGFの結合が1／4に減少したが，静止軟骨部ではbFGFの結合は場所によって変化しなかった。

（考察と結論）

本研究により，軟骨細胞の増殖と分化に伴って各種の成長因子とホルモンの受容体が著しく変動することが初めて明らかになった。しかも，最終分化に伴う受容体の消失はbFGF受容体に特異的であった。これらの受容体の変動は軟骨細胞が連続的かつ一方的に分化して行くために不可欠であると推察される。

論文審査の結果の要旨

塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）は軟骨細胞の増殖因子であり，かつ基質産生能を安定化させることが知られていたがbFGFの受容体についてはこれまで報告がなかった。本研究はウサギ肋軟骨細胞培養系の増殖・分化過程においてbFGF受容体がどのように変動するかについて他の因子の受容体の変動と比較検討したものである。

その結果，肋軟骨細胞のbFGF受容体数は増殖期で最も多く成熟期よりやや減少しはじめ，肥大期（最終分化期）には，殆ど消失すること，また副甲状腺ホルモンとインスリン様成長因子の受容体は増殖期では低いものの，成熟期で最も高くなり肥大期には低下することが分かった。一方，活性型ビタミンD_3受容体は逆に肥大期で著しく増加したが，上皮成長因子やトランスフォーミング成長因子βの受容体は各分化段階で殆ど変動しないことが明らかとなった。以上のように軟骨細胞の増殖と分化に伴い各種の成長因子やホルモンの受容体は各々独特の発現パターンを示すこと，また軟骨細胞の最終分化に伴う受容体の消失はbFGFに特異的であることが分かった。従って本論文は軟骨細胞の分化過程を解析する上で重要かつ新たな知見を加えたものであり，博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認める。