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

「軟骨細胞の分化に伴う線維芽細胞成長因子受容体の変動」

Reduction in basic fibroblast growth factor receptor during terminal differentiation of chondrocytes.

大阪大学大学院歯学研究科
歯学基礎系博士課程生化学専攻
島津　　篤

緒　言

成長板軟骨細胞の増殖と分化は，骨格の発生，形態形成，および骨折治癒の過程で重要な役割を果たしている．肋軟骨の骨・軟骨移行部に存在する成長板軟骨細胞は，まず増殖層で活発に分裂した後，多量に軟骨基質を分泌する球型の成熟軟骨細胞へと分化する．次いで，石灰化担当細胞である直径が5倍もの大型の肥大軟骨細胞へと最終分化し，細胞外基質の石灰化を誘導する．そして，肥大層の石灰化軟骨が，新生骨に置き代わることによって骨が伸展する．しかしながら，永久軟骨部では，一生涯石灰化が起こらない．

成長板軟骨細胞の増殖と分化および石灰化の機構は，興味ある題材として古くから研究されている．形態学的な研究から，永久軟骨には肥大軟骨細胞は存在しないことが判明しているので，この最終分化段階の軟骨細胞が石灰化誘導の主役を演じていると考えられている．また，生化学的な研究から肥大軟骨細胞は，アルカリホスファターゼ(ALPase)活性[1]，1,25(OH)$_2$ビタミンD_3受容体[1]

[2]，およびX型コラーゲン[3〜6]などの特殊な高分子を産生することが明らかにされ，これらの高分子と石灰化との関連が示唆されている．

塩基性線維芽細胞成長因子（basic fibroblast growth factor；bFGF）は，分子量16,000の単鎖ポリペプチドで[7]，Klagsbrunにより仔ウシ肩甲骨軟骨より精製された軟骨由来成長因子（cartilage-derived growth factor；CDGF）と同一の物質であった[8]．このbFGFは，以前の研究で，軟骨細胞の最も強力な増殖促進因子であり，しかも軟骨細胞の分化機能を安定化することが報告されている[9, 10]．また，bFGFは増殖軟骨細胞からの成熟軟骨細胞への分化を促進するのみならず，成熟軟骨細胞への最終分化をも抑制した[11]．しかも，軟骨中には多量のbFGFが存在しているので[12]，*in vivo*でもbFGFは軟骨細胞の増殖と分化を制御している可能性がある．

また，副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone；PTH）は，骨および腎に作用して血中カルシウムレベルを調節するのみならず，軟骨にも

作用して軟骨細胞の増殖と分化機能の発現に多様な影響を及ぼすことが報告されている[13]．単層および軟寒天培養系で，PTHは軟骨細胞の細胞外基質プロテオグリカンの合成を促進し，胎生期では増殖促進因子としても作用した[13, 14]．また遠心管軟骨細胞培養系では，PTHは最終分化マーカーであるALPase活性の誘導と石灰化を抑制した[15]．

そこで本研究では，成長板で，増殖軟骨細胞が成熟軟骨細胞さらに肥大軟骨細胞へと分化して形質を変換していく過程におけるbFGF受容体レベルの変動を他のホルモンや成長因子の受容体の変動と比較検討した。

材料と方法

1. 試薬

ウシ脳下垂体由来の塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)[7]はD. Gospodarowicz博士(カルフォルニア大学), トランスフォーミング成長因子-β1 (transforming growth factor-β1; TGF-β1, ウシ)はS. M. Seyedin博士(Collagen社)から, 1α,25水酸化ビタミン D_3 [1α,25-dihydroxycholecalciferol; $1,25(OH)_2D_3$]は, 西井博士(中外製薬)から, インスリン様成長因子-I (insulin-like growth factor-I; IGF-I, ヒト)は, 堀合博士(藤沢薬品)から供与された. [$Nle^{8,18}$, Tyr^{34}]-ウシPTH[1-34]amideはPenninsula Laboratories社から, 上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF, マウス)は東洋紡から, ^{125}I-EGF (500 Ci/mmol, マウス), ^{125}I-bFGF (1,000 Ci/mmol, ウシ), 1α,25-dihydroxy [26,27-methyl-^{3}H] cholecalciferol (180 Ci/mmol), ^{125}I-IGF-I (2,000Ci/mmol, ヒト)

は，Amersham社から，^{125}I-TGF-β1 (1,900 Ci/mmol，ヒト)は，Biochemical Technology社(Stoughton,米国)，[6-^{3}H]チミジン(2.0 mCi/mmol)は日本アイソトープ協会から，[^{35}S]硫酸(1.0 Ci/mmol)と$^{45}CaCl_2$(1.0 Ci/mmol)はNew England Nuclear社から購入した．Disuccinimidyl suberate (DSS)は，Pierce Chemical社のものを使用した．

2. 軟骨細胞

ウサギ肋軟骨及び膝関節軟骨細胞は，生後4週齢の雄性ニュージーランド白ウサギ(体重400g)より鈴木，下村らの方法に準じて単離した[13, 16]．すなわち，肋軟骨成長板および大腿骨遠位関節軟骨を分離し，メスにて軟骨を細切した後，0.1% EDTAを含む0.15%トリプシン(Difco社)にて1時間，次いで0.15%コラゲナーゼ(Worthington社)存在下で2時間30分インキュベートした後，120μmナイロンフィルター(NBC工業)を通過する細胞を回収した．

分離した軟骨細胞(8×10^{4}個)は，10%ウシ胎仔

血清(FBS；GIBCO社)，60μg/mlのカナマイシン(明治製薬)，50μg/mlのアスコルビン酸(和光純薬)を含む1mlのイーグル最小必須培地(MEM；日水製薬)に混和し15mlのポリプロピレン製遠心管(Corning社)内でペレット状にして，37℃，5% CO_2気相下で培養した．なお，新鮮培地との交換は，培養6日目より2日毎に行なった[17]．

3. 軟骨スライス

生後4週齢のニュージーランド白ウサギの肋軟骨成長板を分離した後，実体顕微鏡下で0.2mm間隔の連続スライスを作製した．各スライスは，0.2-0.3mm^3に細断した後0-4℃にて各種の蛋白分解酵素阻害剤(1mM phenylmethylsulfonyl fluoride；PMSF，10mM N-ethylmaleimide，2 units/mlのaprotinin，5mM EDTA)を含む20mMトリス緩衝液(pH7.4)で洗浄し，蛋白分解酵素阻害剤を含むPBSで洗浄した後，実験に供した．軟骨スライスを用いた^{125}I-bFGFの結合実験では，3M MgClを含む20mMトリス緩衝液(pH7.4)にて30分処置することにより内在性の

bFGFを除去して実験に用いた[18].

4. DNA，ウロン酸及びALPase活性の定量

軟骨細胞塊は，PBSにて2回洗浄した後，0.2% Triton-X100を含む0.9% NaCl溶液中で4℃でPhyscotron(model NS-310E，日音医理科器械製作所)で粉砕し，DNA，ウロン酸及びALPase活性測定用の試料とした.

DNA含量は，標準物質としてウシ胸腺由来DNA(Sigma社)を用いてJohnsonらの方法に従い測定した[19]．すなわち，細胞懸濁液を1mg/mlアクチナーゼE(科研製薬)と5mM $CaCl_2$を含む0.2Mトリス緩衝液(pH7.8)中で56℃で16時間消化した．その後，1/10量の100%トリクロロ酢酸(TCA)を加え，4℃で30分間放置して，DNAを沈殿させた．次いで，5,000xgで15分間遠心し，回収した沈殿にエタノール;エーテル(v/v;3;1)を加え，4℃で4時間放置した．3,000xgで15分間遠心し沈殿を0.3mlの0.2%Triton-X100を含む0.01N NaOH溶液に溶解した．再び，3,000xgで15分間遠心しその上清0.2mlに0.1mg/mlのdiaminobenzoic

acidを加え，65℃で45分間反応させた後，0.6mlの2N NaOHを添加して反応を停止した．次いで，分光蛍光光度計(RF-5000, SHIMADZU)にて，波長420nmの励起光で出現した蛍光を510nmで測定した．

ウロン酸含量は，標準物質としてβ-グルクロン酸(生化学工業)を用いてBitterらの方法に準じて測定した[20]．すなわち，DNA定量と同様にアクチナーゼEで消化した試料に，1.3%酢酸カリウムを含む95%エタノールを3倍量加え，4℃にて3,000xgで15分間遠心した．沈殿を0.5mlの蒸留水に溶解し，氷冷した2.5mlの0.95%硼酸ナトリウムを含む濃硫酸に0.5mlの試料を重層した．氷冷下で十分に攪拌して100℃で15分間加熱した．その後，0.1mlの0.125%カルバゾールを含むエタノール溶液を加え，再度100℃で15分間加熱した後，分光光度計(Microplate 2wavelength Photometer；MTP-22, Corona Electric)にて530nmでの吸光度を測定した．

ALPase活性は，標準物質としてパラニトロフェ

ニル(和光純薬)を用いてBesseyらの方法に従い測定した[17, 21]．すなわち，細胞懸濁液を12,000xgで5分間遠心し，その上清を0.5mMパラニトロフェノールリン酸ナトリウム(pNP)，0.5mM $MgCl_2$を含む0.5 Mトリス緩衝液(pH9.5)の反応系で37℃で30分間インキュベートした．次いで，全体の1/4量の1N NaOHを添加して反応を停止し，分光光度計(MTP-22)にて410nmでの吸光度を測定した．なお，30分間に1nmolのpNPを水解するALPase活性を1ユニット(unit)とした．

5. DNA合成能の測定

DNA合成は細胞の酸不溶性画分への^{3}H-チミジンの取り込みを指標として測定した[22]．すなわち，軟骨細胞を^{3}H-チミジンを含む培地で3時間標識し，次いで細胞層をPBSで2回洗浄した後，10% TCAで2回，エタノール;エーテル(v/v;3;1)で2回洗浄して遊離の放射能を除去した．次に細胞層を0.1N NaOHで溶解して回収し，6N HClで中和後，液体シンチレーションカウンター(LKB-Wallac 1215 CompuGamma, Wallac Oy., Turku, フィンラン

ド)で放射能を測定した.

6. プロテオグリカン合成能の測定

プロテオグリカン合成は，プロテオグリカン合成の最終段階である硫酸エステル化を指標として測定した[10]．軟骨細胞の培養液(1ml)に最終濃度20μCi/mlとなるように[^{35}S]硫酸を含む溶液(MEM)を10μl添加し24時間標識した．標識終了時に細胞および組織をPBSにて2回洗浄し，1mg/mlのアクチナーゼEと5mM $CaCl_2$を含む1mlの70.2M トリス緩衝液(pH7.8)存在下で55℃で16時間インキュベートした後，2mM $MgSO_4$を含む0.2Mトリス緩衝液(pH7.8)を1ml，0.1 mg/mlのコンドロイチン硫酸を100μl，20mM NaClを含む1%CPC (cetylpyridinium chloride；ナカライテスク)を1ml加え，3時間インキュベートした．次いで沈殿したプロテオグリカンをガラスフィルター(直径25mm，アドバンテック東洋)上に回収して放射能を測定した.

7. 石灰化能の測定

石灰化能は細胞の酸可溶性画分への^{45}Caの取り

込みを指標として測定した[15]．すなわち，軟骨細胞を最終濃度2μCi/mlの$^{45}CaCl_2$を含む溶液(MEM)中で3時間標識した．細胞層をPBSで2回洗浄した後，0.2%Triton-X100を含む0.9% NaCl溶液中で4℃でPhyscotronで粉砕した．次に，12,000xgで15分間遠心し，回収した沈殿を0.1M $CaCl_2$を含む0.05Mトリス緩衝液(pH7.4)で20℃で30分間洗浄し，遊離の放射能を除去した．次いで3,000xgで15分間遠心し，沈殿に0.5mlの0.5M HCl溶液を添加し，20℃で3時間インキュベートした．再び，3,000xgで15分間遠心し上清の放射能を測定した．

8. ^{125}I-[Nle^{8,18}, Tyr^{34}]-ウシPTH[1-34]amideの調製

^{125}I-[Nle^{8,18}, Tyr^{34}]-ウシPTH[1-34]amide(^{125}I-PTH[1-34])は，0.2ng/mlのクロラミンTを用いて，蛋白質1μg当たり1μCiのNa^{125}Iと30秒インキュベートしてヨード化し，C_{18}逆相カラムを用いたHPLC (high-performance liquid chromatography)にて精製した[23, 24]．

9. ^{125}I-bFGF, ^{125}I-EGF, ^{125}I-TGF-β1, ^{125}I-PTH[1-34]および^{125}I-IGF-Iの結合

^{125}I-bFGFの結合実験は，軟骨細胞をPBSで2回洗浄した後，1mlの結合緩衝液A [25mM n-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; Hepes, 0.1%ゼラチンを含むHam's F-12培地(pH7.5)]置き換え，放射性リガンドとして^{125}I-bFGF(2x10^{4} cpm/0.15 ng)と100ng/mlのbFGF存在あるいは非存在の条件にて，4℃で90分間インキュベートした.

次いで，細胞を0.1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)を含むPBSで2回，洗浄液(0.1% BSA, 0.8M NaCl, 10mM Hepes, pH8.0)で2回洗浄し，0.1N NaOHにて細胞層を溶解回収後，結合した^{125}I-bFGFの放射活性をγ-カウンター(LKB-Wallac 1282 CompuGamma, WallacOy., Turku, フィンランド)にて測定した.

^{125}I-EGFと^{125}I-TGF-β1の結合実験では，^{125}I-EGF (2x10^{4} cpm/90pg)と非標識の100

ng/mlのEGFの存在あるいは非存在の条件にて，軟骨細胞を4℃で2時間インキュベートした．また，^{125}I-TGF-β1 (2x10^{4} cpm/130pg)と非標識の10ng/mlのTGF-β1の存在あるいは非存在の条件にて，軟骨細胞を4℃で90分間インキュベートした．次いで，細胞を0.1%BSAを含むPBSで2回，洗浄液で2回洗浄し，0.1N NaOHにて溶解回収後，γ-カウンターにて放射能を測定した．

^{125}I-PTH[1-34]の結合実験は，軟骨細胞を1mlの緩衝液A中で^{125}I-PTH[1-34](5x10^{5} cpm/ml)と5x10^{-8} Mの非標識PTH[1-34]の存在あるいは非存在の条件にて，15℃で5時間インキュベートした．

^{125}I-IGF-I結合実験は，軟骨細胞を1mlの緩衝液A中で^{125}I-IGF-I(2x10^{4} cpm/ml)と非標識のIGF-I(1μg/ml)の存在あるいは非存在の条件にて，4℃で3時間インキュベートした．次いで，0.1%BSAを含むPBSで5回洗浄し，0.1N NaOHにて溶解回収後，γ-カウンターにて放射能を測定した．

10. ^{3}H-1,25(OH)$_{2}$D$_{3}$の結合

軟骨細胞をPBSで2回洗浄した後，2mM EDTA，0.5mM DTT(dithiothreitol)，0.3M KCl，1mM PMSFを含む10mM トリス緩衝液(pH7.4)を添加し，Physcotronにて粉砕した．次いで，1,000xgで10分間遠心し，その上清を226,000xgで1時間遠心し上清を回収した(cytosol分画)．一部を用いてLowryらの方法[25]により蛋白質定量を行ない，残りの試料を1mg蛋白質/mlの濃度に調製した．[^{3}H]-1,25(OH)$_{2}$D$_{3}$(10,000 dpm/13pg)と各種濃度の非標識の1,25(OH)$_{2}$D$_{3}$と試料を試験管内で25℃で1時間インキュベートし，なお15分毎に軽く攪拌した．反応終了時に攪拌しながら，5%活性炭，0.5%デキストラン(分子量70,000)を添加し5分毎に攪拌した．25分後に卓上型遠心機にて3,000rpmで10分間遠心し上清の放射能を測定した[1, 2]．

11. ウサギ各組織の^{125}I-PTH[1-34]の結合

ニュージーランド白ウサギの胎仔より，皮膚，筋肉及び成長板軟骨を，また生後4週齢のニュ

ージーランド白ウサギより皮膚，筋肉，脳，腎臓，成長板軟骨，膝関節軟骨及び線維芽細胞を調製した．これらの組織及び細胞は，0-4℃にて各種蛋白分解酵素阻害剤（1mM PMSF，10mM N-ethylmaleimide，2 units/mlのaprotinin，5mM EDTA）を含む 20mM トリス緩衝液（pH7.4）中にてPhyscotronにて粉砕した．次いで，これらの懸濁液と^{125}I-PTH[1-34]（5x10^{5} cpm/ml）を4℃で5時間インキュベートした．

12. bFGF，EGF，TGF-β1およびIGF-I受容体の検出

bFGF受容体の検出実験は，結合実験と同条件にて，軟骨細胞を種々の濃度の^{125}I-bFGF（2x10^{5} cpm/0.4 ng - 2x10^{6} cpm/4ng）および非標識bFGF，EGF，TGF-β1あるいはIGF-Iとインキュベートした．EGF受容体の検出実験は，^{125}I-EGF（10^{6} cpm/0.5ng）と非標識EGF（5μg）の存在あるいは非存在条件下にて，TGF-β1受容体の検出実験は，^{125}I-TGF-β1（10^{6} cpm/0.7ng）と非標識TGF-β1（0.2μg）の存在あるいは非存在条件下にて行なった．次いで，0.15mM DSSを

含むPBSを加え，bFGF受容体の検出実験では，室温で15分間[26]，EGFあるいはTGF-β1受容体の検出実験では，0℃で20分間化学架橋反応を行なった．そして200mM グリシンと2mM EDTAを含むトリス緩衝液(pH7.5)を添加し反応を停止させた．化学架橋反応の終了後，PBSで2回洗浄し，3% SDS(sodium dodecyl sulfate,和光純薬)，1%メルカプトエタノール，5%グリセロールを含む10mM トリス緩衝液(pH6.8)にて可溶化し，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に展開し，リガンド-受容体複合体をオートラジオグラフィーにて検出した．

軟骨スライスでのbFGF受容体の検出実験は，蛋白分解酵素阻害剤と3M MgClを含む20mM トリス緩衝液(pH7.4)にて30分間処置することにより内在性のbFGFを除去し[18]，^{125}I-bFGF(10^6 cpm)と100 ng/mlの非標識bFGFの存在あるいは非存在条件下にてインキュベーションした．さらに，常温にて0.15mM DSSを添加し上記の方法で化学架橋反応を行なった．

結　果

1. 軟骨細胞のbFGF受容体

軟骨細胞のbFGF受容体を検出するために，^{125}I-bFGFを添加し4℃で90分間インキュベートした．^{125}I-bFGFと受容体をDSSを用いて化学架橋して，反応終了後，細胞を回収し，還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に展開した．オートラジオグラフィーによる分析の結果，155kDと17kDのバンドが検出できた(図1-A)．17kDはbFGF自身で155kDはbFGF-受容体複合体を示している．したがって，軟骨細胞のbFGF受容体の分子量はおよそ135kDであることが判明した．この分子量は，線維芽細胞や他の組織で報告されているbFGF受容体と一致していた[26, 27]．

155kDのバンドは，^{125}I-bFGFの添加量に応じて増加した(図1-A, B, C)．また，過剰量の未標識のbFGFの添加により完全に消失した(図1-D, E, F)．しかし，IGF-I，EGFおよびTGF-β1を添加してもbFGFの結合能には影響しなかった(図1-G, H, I)．

2. 遠心管軟骨細胞培養系における最終分化と

bFGF受容体レベルの関連

図2は，遠心管軟骨細胞培養系を用いてbFGFの結合能の経時的変動を示している．bFGFの結合は増殖期で最も高く，成熟期よりやや減少しはじめ，最終分化が完了する20-24日目にはほとんど消失した．増殖期に相当する培養8日目の細胞と成熟期に相当する培養16日目の細胞に対して，Scatchard解析を行なうと培養8日目には細胞当たり1,900個の受容体が存在したが，16日目では800個に減少した．bFGF受容体のKdは増殖期で27pM，成熟期で37pMであった．従って，bFGF受容体の減少は親和性の低下ではなく受容体数の減少であることが判明した．本研究では，高濃度(0.8M)のNaClを含有する緩衝液で細胞層を洗浄したため，他の研究で報告されているヘパラン硫酸への低親和性の結合は検出できなかった．なお，軟骨細胞のヘパラン硫酸産生能は低いことが知られている．

3.軟骨細胞のALPase活性と^{45}Caの取り込みに及ぼすbFGFの影響

次に，遠心管軟骨細胞培養系を用いて，ALPase活性(図3-A)および^{45}Caの取り込み(図3-B)に及ぼすbFGFの影響を検討した．最終分化の前(培養8，14日目)にbFGFを添加すると，ALPase活性および^{45}Caの取り込みは低下した．しかし，最終分化が完了した18日目にbFGFを添加してもALPase活性や^{45}Caの取り込みに影響しなかった[11]．この分化段階に依存した軟骨細胞のbFGF応答能の変化はbFGF受容体レベルの変動と密接に連関していた．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. bFGF受容体の変動に及ぼすbFGFの影響

軟骨細胞は増殖し，多量の細胞外基質を産生蓄積した後，最終分化するとともにbFGFに対する感受性を失った．そこで，bFGF存在下で維持した軟骨細胞のbFGF受容体の変動を検討した(図4)．

成長板軟骨細胞に培養12日目よりbFGFを添加するとDNA含量にはほとんど影響しなかったが(図4-B)，軟骨細胞へのbFGFの結合の減少が著しく遅延した(図4-A)．つまり，bFGFの添加により，

最終分化を抑制した軟骨細胞では，bFGF受容体は減少しなかった．なお，この実験ではbFGF受容体がdown-regulationから回復するbFGF添加24時間後のbFGF結合能を測定した．

5.関節軟骨細胞と成長板軟骨細胞の最終分化とbFGF受容体

関節軟骨は，他の部位の軟骨と異なり，負荷荷重に耐える十分な強度が必要であり，かつ関節面での円滑な運動を保証するために石灰化が抑制されている．関節軟骨は，深層においては成長板軟骨と同様に軟骨自身が石灰化し，骨と置換する．しかし，関節表層に分布する関節軟骨細胞は，最終分化も石灰化もしない．遠心管培養系で維持した関節軟骨細胞は成長板軟骨細胞と同様に活発に増殖した後，多量の細胞外基質を産生蓄積し成熟軟骨細胞に分化したが(図5-A)，ALPase活性や石灰化を誘導せず肥大軟骨細胞にはほとんど変換しなかった(図5-B,C)．

図5-Dは，最終分化能のない関節軟骨細胞と成長板軟骨細胞のbFGF受容体の変動を示している．

成長板軟骨細胞ではbFGF受容体は16日以降急速に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．この結果は，成長板軟骨細胞のbFGF受容体の減少が最終分化に密接に連動していることを示唆している．

6. 軟骨成長板連続スライスを用いたbFGF受容体レベルの検出

軟骨細胞の最終分化に伴うbFGF受容体の減少が，実際に成長板軟骨で観察されるか否かを検討するために実体顕微鏡下でウサギ肋軟骨の成長板から0.2mm間隔の連続したスライスを分離した(図6-A)．各スライスにおける肥大軟骨細胞の存在はALPase活性を測定することにより検定した(図6-B)．成長板では軟骨細胞が最終分化して肥大化すると共に，bFGFの結合が1/4に減少した．しかしながら，静止軟骨では場所の変化に伴うbFGFの変動は観察されなかった(図6-C)．

図6-Dは，増殖層(スライス4)，成熟層(スライス2)，肥大層(スライス0)のbFGF-受容体結合体

をDSSを用いて検出したものである．肥大層では増殖層と比較してbFGF-受容体複合体のバンドが1/4以下に減少した．すなわち成長板軟骨においても，最終分化に伴ってbFGFの受容体が減少することが判明した．

7. 副甲状腺ホルモン受容体の生体内での分布

図7は，ウサギの各組織のPTH結合能の比較を示している．ウサギ胎仔および4週齢のウサギより，各種の組織を取り出し，これらの組織への^{125}I-PTHの結合を検討した．皮膚と筋肉ではPTHの結合がほとんど検出できなかったが，脳，腎臓および軟骨で高レベルのPTHの結合が検出された．また，胎生期および出生後を通じて成長板軟骨には，最も高レベルの結合が観察された．この結果は，PTHが成長板軟骨で特に重要な役割を果たしていることを示唆している．

8. 遠心管軟骨細胞培養系での副甲状腺ホルモン受容体の変動

軟骨細胞は，分子量76kDで，Kdが0.7-1.1 nMのPTH受容体を細胞1個当たり3.5-4万個発現して

いる．また，軟骨細胞にPTHを添加すると1分以内にcAMPレベルが約40倍に増加することが報告されている[14]．

そこで，遠心管軟骨細胞培養系で維持した軟骨細胞の分化とPTH受容体の関連を検討した(図8)．遠心管軟骨細胞培養系では，^{3}H-チミジンの取り込みのピークが増殖期(図8-A)，^{35}S-硫酸の取り込みのピークが成熟期(図8-B)，ALPase活性の上昇のピークが肥大期(図5-B)に相当する．PTH受容体レベルは，増殖期では低く，成熟期に相当する13日目で最大となり，肥大期では低下した(図8-C)．

9.軟骨成長板連続スライスを用いたPTH受容体レベルの検出

成長板軟骨においても実際にPTH受容体が成熟期で増加しているか否かを成長板軟骨の連続スライスを用いて検討した．

図6と同様に肋軟骨成長板の0.2mm間隔の連続スライスを作製し(図9-A)，プロテオグリカン合成を検討すると，増殖層，肥大層では^{35}S-硫酸の取

り込みが低レベルであったが，成熟層(スライス3，4)において高レベルの^{35}S-硫酸の取り込みが観察された(図9-B)．また，この^{35}S-硫酸の取り込みのピークに一致して，スライス3，4に最も高レベルのPTHの結合が検出され，スライス0，1，スライス5-7で低下した(図9-C)．一方，関節軟骨は^{35}S-硫酸の取り込みもPTHの結合も低レベルであった(図9-B,C)．従って，組織レベルにおいても，成長板軟骨の成熟層に，特に高レベルのPTH受容体が存在していた．

10.遠心管軟骨細胞培養系でのインスリン様成長因子-1 (IGF-I)の受容体の検討

遠心管培養系で維持した軟骨細胞に^{125}I-IGF-Iの結合実験を行なうと低親和性(Kd，50nM)と高親和性(Kd，0.5nM)のIGF-I受容体が検出された(図10-A)．低親和性のものは細胞1個当たり36万個，高親和性のものは細胞1個当たり3万6千個であった．また，遠心管培養系の成熟期において最も高レベルのIGF-I受容体が存在しており，増殖期および最終分化期ではそのレベルが低下した(

図10-B).

11. 遠心管軟骨細胞培養系での1,25(OH)$_2$D$_3$, トランスフォーミング成長因子-β1および上皮成長因子の受容体の検討

遠心管培養系で維持した成長板軟骨細胞と関節軟骨細胞の1,25(OH)$_2$D$_3$の受容体の変動を検討した(図11). 成長板軟骨細胞の1,25(OH)$_2$D$_3$受容体は, 最終分化期で著しく増加したが, 関節軟骨細胞ではほとんど検出されなかった.

^{125}I-TGF-β1を用いて, 遠心管培養系で維持した軟骨細胞のTGF-β1受容体を検討すると, 分子量280, 97, 70kDのTGF-β1-受容体複合体が検出できた(図12-A). このTGF-β1受容体は, 各分化段階を通じてほとんど変動しなかった(図12-B).

^{125}I-EGFを用いて, 遠心管培養系で維持した軟骨細胞のEGF受容体を検討すると, 分子量180kDのEGF-受容体複合体が検出できた(図12-A). このEGF受容体は, TGF-β1受容体と同様に各分化段階を通じてほとんど変動しなかった(図12-B).

考察

1. 軟骨細胞に対するbFGFの作用

bFGFは，Gospodarowiczにより脳下垂体より線維芽細胞の増殖を促進する因子として見つけられ，その後中胚葉由来の多くの細胞の増殖と分化を制御していることが明らかにされた[26, 27]．またbFGFは，軟骨細胞の最も強力な増殖促進因子であり，軟骨細胞の分化機能をも安定化する[1, 9, 17, 28〜30]．しかも各種のホルモンと成長因子を添加した無血清培養系で，bFGFのみを除去すると軟骨細胞の増殖と基質産生が著しく低下して，細胞を維持することができなくなった[9, 29]．さらに遠心管培養系で，bFGFは，増殖期の軟骨細胞の増殖を強力に促進し，成熟期ではALPase活性の誘導と石灰化を抑制し，肥大軟骨細胞への最終分化を抑制した（図3，5）．また，骨折後の修復の過程でbFGFが放出され，骨細胞，軟骨細胞や血管内皮細胞の増殖を促進し，治癒を促進すると考えられている．

軟骨細胞の分化は抑制因子と促進因子のバラン

スに従って一定の速度で進行しているが，軟骨細胞培養系に外因性のbFGFを添加すると，抑制因子と促進因子のバランスがくずれて最終分化が完全に阻止された(図3, 4)．すなわち，本研究と以前の研究の結果からbFGFは軟骨細胞の最終分化を強力に抑制することが判明した．

2. 軟骨細胞のbFGF受容体

軟骨細胞のbFGF受容体を検出するために，^{125}I-bFGFと軟骨細胞を結合させた後，DSSを添加し化学架橋させた．反応終了後，SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に展開すると，軟骨細胞には分子量135kDの高親和性のbFGF受容体を発現していることが明らかとなった(図1)．このbFGF受容体は，^{125}I-bFGFの添加量に応じて結合量を増し，過剰量の未標識bFGFの添加により^{125}I-bFGFの結合が阻害された．またEGFやIGF-Iなどの添加は^{125}I-bFGFの結合に影響を及ぼさなかった(図1)．

bFGF受容体には3つのサブタイプが存在するが，分子量135kDのbFGF受容体は，他の組織や細胞で発現している主要なbFGF受容体の分子量とほぼ一

致していた．また近年，bFGFとアミノ酸配列の類似した蛋白質が相次いで発見された．acidicFGF(aFGF)，KFGF(hst)，int-2，FGF-5およびKGFは，bFGFに対して40-50%の相同性をもち，bFGF，aFGF，KFGFは共通の受容体に結合することが報告されている[26, 31～37]．しかし，軟骨細胞のbFGF受容体に，aFGFやKFGFが結合するかはまだ不明である．

bFGFはaFGFやインターロイキン-1βと同様に，その前駆体にシグナルペプチド領域を持たないため，その分泌機構については明らかではない．しかし，軟骨にはbFGFとaFGFが存在するので，軟骨細胞の特定の分化段階で，bFGFやaFGFが細胞あるいは細胞外基質より遊離して，軟骨細胞の増殖と分化を制御すると推測される．

bFGF受容体に結合したbFGFは，イノシトールリン酸回路を促して，プロテインキナーゼC活性と細胞内Caの遊離を促進する[38]．bFGF受容体には，チロシンキナーゼ領域が存在し，軟骨細胞培養系にbFGFを添加すると160kD，90-95kDおよび

55kDの蛋白質が2分以内にリン酸化された[39,40]．bFGFによる90kD蛋白質のリン酸化については，線維芽細胞においても観察されている[40]．チロシンキナーゼ領域を欠いたbFGF受容体を導入したアフリカツメガエルの卵は正常な発育を営むことができないと報告されているので[41]，最終分化の抑制には，bFGFによるチロシン-リン酸化の亢進が関与しているかもしれない．

3. 軟骨細胞のPTH受容体

PTHは，血中カルシウム濃度を調節する最も古典的なホルモンである．PTHは，破骨細胞を活性化し，骨芽細胞に対しては，コラーゲン合成やALPase活性の誘導を促進する[42]．

種々の組織のPTH結合能を検討すると脳と成長板軟骨に高レベルの結合が観察された(図7)．脳においてPTHの結合は広範囲に分布し，カルシウムイオンの輸送とアデニレートシクラーゼ活性を刺激する[43,44]．軟骨細胞に対してPTHは，cAMPなどを介してプロテオグリカンの合成を促進し，増殖軟骨細胞から成熟軟骨細胞への変換を促進する

[13, 45]．また，胎生期では増殖因子としても働く[14]．遠心管培養系でPTHは，最終分化マーカーであるALPase活性の誘導と石灰化を抑制した[15]．これらのPTHの抑制作用は可逆的かつ濃度依存性で，薬理的な濃度(10^{-8}M)で最大となるが，生理的濃度(10^{-10}M)付近でも有意な影響を示した[15]．

遠心管培養系で軟骨細胞は，成熟期に相当する培養14日目にプロテオグリカンの合成の指標となる^{35}S-硫酸の取り込みレベルが最大となった(図8)．また，成長板軟骨の連続スライスにおいても，成熟層で^{35}S-硫酸の取り込みが高レベルを示した(図9)．PTH結合能は，遠心管培養系でも連続スライスを用いた実験でも，基質形成期で最も亢進していた(図8, 9)．そして，軟骨細胞の最終分化に伴い，PTH受容体は減少した(図8, 9)．さらにPTH受容体レベルの変動は，IGF-I受容体と挙動を共にし，軟骨のプロテオグリカン産生能の変動と合致していた(図8, 9, 10)．PTHとIGF-I受容体の密接な関係は，PTHとIGF-Iが連携してプロテオグリカン合成を促進していることを示唆している．

Canalisらの報告によると，骨細胞でのPTHのコラーゲン合成促進作用は，IGF-Iの産生を仲介しており，抗IGF-I抗体によって抑制された[42]．成長板軟骨の連続スライスのIGF-I含量を測定すると増殖層，肥大層に比べて成熟層に高レベルに検出され，軟骨細胞培養系でもPTHはIGF-Iの産生を促進した[46]．軟骨でのPTHの作用のすべてが，IGF-I産生の亢進によって説明できるかどうかは不明だが，少なくとも一部はIGF-I産生の亢進と関係しているかもしれない．

4. 軟骨細胞のホルモンや成長因子受容体の変動

軟骨細胞の分化段階に応じたbFGF受容体の変動は，bFGFが軟骨細胞集団全体に作用した時，増殖および成熟軟骨細胞に対してのみ選択的にbFGF応答を誘導させるために必要である．軟骨細胞が増殖と基質合成を維持するためには，増殖と軟骨基質合成の最も強力な促進因子であるbFGFの受容体を発現していなければならない．同時に増殖と基質合成は肥大化と両立しえないので，最終分化はbFGFによって抑えられている．しかしその一方で

軟骨細胞が最終分化を阻害するbFGFに対する感受性が減少しなければならないと予想される．本研究は，実際にbFGF受容体が最終分化に伴って減少することを証明した．

一方，1,25(OH)$_2$D$_3$はPTHと同様に血中カルシウムを調節する因子として知られている．1,25(OH)$_2$D$_3$の欠乏により，成長板軟骨の小柱構造は拡大して不規則となり骨への置換も抑制されるために骨格の発育障害をおこす[47]．また，1,25(OH)$_2$D$_3$は，静止軟骨細胞にはほとんど作用しないが，成長板軟骨細胞に対して多様な作用を及ぼす[2]．新生仔ラットに1,25(OH)$_2$D$_3$を投与すると軟骨細胞の石灰化が亢進した[48]．しかも，ニワトリ胚軟骨の骨端軟骨部にのみ石灰化と1,25(OH)$_2$D$_3$受容体が観察された[2]．軟骨細胞の肥大化と石灰化には1,25(OH)$_2$D$_3$受容体の発現が，重要な役割を果たしているかもしれない．

EGFは，分子量約6,000の単鎖ペプチドで，軟骨細胞の増殖を促進し，プロテオグリカン合成，ALPase活性の誘導および石灰化を抑制する[49]．

[50]．軟骨細胞には他の組織と同様に分子量約180kDのEGF受容体が存在する(図12-A)．しかしEGF受容体は各分化段階を通じてほとんど変動しなかった(図12-B)．

A431細胞に癌誘発因子であるホルボールエステルを添加し，悪性化を誘発するとEGF受容体が増加し，リン酸化も亢進する[51]．NRK細胞にEGFを添加すると悪性化を誘発し，これはTGF-β1の添加により増幅する[52]．また，軟骨細胞にEGFを添加すると，線維芽細胞様の形態をとり，プロテオグリカン合成が低下する[50]．別の実験で軟骨細胞の一定以上のEGF受容体数の増加は脱分化の兆候を示す結果が得られている(Iwamotoら，未発表)．

TGF-β1は分子量約25,000の2量体ペプチドで，未分化間葉系細胞を軟骨細胞へ誘導すること，骨近傍へのTGF-β1の局所投与が骨を誘導することが知られている[53]．また，TGF-β1は，前駆体として血小板や骨に大量に存在するが，増殖軟骨細胞では細胞内に，肥大軟骨細胞では細胞外基質に

存在すると報告されている[54~58]．また，発生の段階でTGF-β1は骨誘導因子(bone morphogenetic protein；BMP)やbFGFと共に形態形成(中胚葉)を誘導する．*in vivo*において，TGF-β1は単独で未分化間葉系細胞を軟骨へ分化させる．TGF-β1は軟骨細胞の増殖とプロテオグリカン合成を促進し，ALPase活性の誘導と石灰化を抑制する[17]．TGF-β1はIL-1βによる蛋白分解酵素の分泌を抑制する．さらにTGF-β1はbFGFや血清の共存下で，bFGFの増殖促進作用を増強する[28~30]．TGF-β1は軟骨細胞の分化段階の全過程に影響したが，TGF-β1受容体は変動しなかった(図12)．受容体が変動しないのは，TGF-β1が，他の因子の作用を増強する性質を有しているため，それ自身の受容体は変動しないのかもしれない．あるいは，TGF-β1はEGFと同様に通常の生理的条件では，軟骨の最終分化の調節に直接には関与していないのかもしれない．

筋肉細胞は，軟骨細胞と同様に最終分化する能力を有し，最終分化に伴うbFGF受容体の減少は筋

肉細胞でも観察される．筋肉芽細胞は，最終分化前にはbFGF，EGF，TGF-β1およびIGF-Iのレセプターを発現しているが，最終分化するとbFGF，EGFおよびTGF-β1の受容体も減少する[57～59]．その逆に最終分化によってインスリン受容体が高レベルに発現する．また，SH-SY5Y neuroblastoma細胞は，最終分化によって，IGF-IIに対する結合能力を失うという報告がある[60]．

筋肉芽細胞が最終分化すると，融合して巨大な細胞となり増殖能を失う．従って，筋肉細胞でのbFGF受容体の消失は，増殖能の消失と関係している．また，神経細胞も最終分化すると増殖能を失うので，増殖因子の受容体レベルが低下する．一方，軟骨細胞では，bFGF受容体の減少は，増殖能の減少だけのためではなく，むしろ最も強力な最終分化抑制因子への感受性をなくして最終分化の形質発現を保障する機構の一つを代表していると考えられる．

永久軟骨，関節軟骨，成長板軟骨には，bFGFが存在することが知られている．筆者らの別の研究

で，肋軟骨成長板の各スライスのbFGF含量をradioreceptor assay法で測定すると，bFGFは増殖層に多く肥大層では著しく減少するものの，なお最終分化を抑制するのに十分な組織1g当たり45ngもの高レベルのbFGFが存在した(未発表データ)．従って，軟骨細胞は，通常最終分化が抑制された状態で存在しているが，石灰化部位ではbFGFへの感受性をなくす必要がある．すなわち，成長板でのbFGFの特異的な減少は最終分化を誘導するための重要なシグナルの一つである可能性がある．

結　論

1. bFGF受容体は，増殖期において最も高レベルに発現し軟骨細胞1個あたり1,900個の結合部位があり，Kdは27pMであった．しかしbFGF受容体は，基質形成期より次第に減少し，最終分化期ではほとんど消失した．なお，bFGF受容体のKdは，各分化段階でほとんど一定であった．
2. PTH受容体とIGF-I受容体はいずれも成熟期において最も高レベルに発現していた．
3. 1,25$(OH)_2D_3$受容体は，肥大期にのみ特異的に出現した．
4. 一方，TGF-β1とEGFの受容体は各分化段階において変動しなかった．

以上，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向に分化して行くために不可欠であると推察される．

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂き，墾篤なる御指導と御校閲を賜った大阪大学歯学部生化学講座，鈴木不二男教授に深く感謝致します．また，本研究に際し，終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜った広島大学歯学部口腔生化学講座，加藤幸夫教授に深く感謝致します．最後に，本研究の実施にあたり，多くの貴重な御援助と御助言を頂いた中央研究室，浅田　彬講師，徳島大学歯学部歯科放射線学講座，岩本容泰助手および生化学講座教室員諸兄に厚く御礼申し上げます．

Reduction in Basic Fibroblast Growth Factor Receptor during Terminal Differentiation of Chondrocytes

Atsushi SHIMAZU

Department of Biochemistry
and Calcified-Tissue Metabolism
Osaka University Faculty of Dentistry
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: Chondrocyte •Terminal Differentiation •basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) • Parathyroid Hormone (PTH) •Receptor

Proliferation and differentiation of chondrocytes are associated with skeletal growth and repair. Many growth factors and hormones are involved in the control of growth and differentiation of chondrocytes. Basic fibroblast growth factor (bFGF) is the most potent mitogen for chondrocytes. Furthemore, it

stimulates the synthesis of extracellular matrix and inhibits terminal differentiation in chondrocyte cultures. In the present study, changes in bFGF-binding capacity of chondrocytes during cytodifferentiation were examined using cultures of pelleted growth plate and slices of growth plates. In cultures of pelleted growth plate chondrocytes, binding of ^{125}I-bFGF to 135-kD receptors was observed during the mitotic and matrix-forming stages but decreased to a very low level in the hypertrophic stage. Scatchard plot analysis showed that the decrease in binding of bFGF was due to a decrease in the number not in the affinity of the receptor. The loss of bFGF receptor was associated with a decrease in biological responses to bFGF. A rapid decrease in bFGF binding was not observed with articular chondrocytes which rarely undergoes terminal differentiation. Reduction in bFGF binding receptor during terminal differentiation was also demonstrated by examination of sequential slices of growth plates.

On the other hand, receptors for parathyroid hormone (PTH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) increased in the matrix-forming stage, and decreased in the proliferative and hypertrophic stages. The receptor for 1,25-dihydroxycholecalciferol (1,25-dihydroxyvitamin D_3) increased 40-fold during hypertrophic stage. The bindings of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor were constant throughout all stages of growth plate chondrocytes. These observations suggest that rapid reduction in bFGF receptors is a special event associated with terminal differentiation, and that modulation of receptors for bFGF, 1,25-dihydroxyvitamin D_3, PTH and IGF-I is important for endochondral bone formation.

文 献

1) Iwamoto, M., Sato, K., Nakashima, K., Shimazu, A. and Kato, Y. (1989) : Hypertrophy and calcification of rabbit permanent chondrocytes in pelleted cultures: synthesis of alkaline phosphatase and 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor. *Dev. Biol.*, **136**, 500-507.

2) Suda, S., Takahashi, N., Shinki, T., Horiuchi, N., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Enomoto, S. and Suda, T. (1985) : 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D_3 receptors and their action in embryonic chick chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.*, **37**, 82-90.

3) Gibson, G. J., Schor, S. L. and Grant, M. E. (1982) : Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J. Cell Biol.*, **93**, 767-774.

4) Capasso, O., Tajana, G. and Cancedda, R. (1984) : Location of 64K collagen producer chondrocytes in developing chicken embryo tibiae. *Mol. Cell. Biol.*,

4, 1163-1168.

5) Schmid, T. M. and Conrad, H. E. (1982) : Metabolism of low molecular weight collagen by chondrocytes obtained from histologically distinct zones of the chick embryo tibiotarsus. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12451-12457.

6) Leboy, P. S., Vaias, L., Uschmann, B., Golub, E., Adams, S. L. and Pacifici, M. (1989) : Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17281-17286.

7) Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G. M., Baird, A. and Bohlent, P. (1984) : Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-sepharose affinity chromatography : Identity with pituitary fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 6963-6967.

8) Klagsbrun, M., Langer, R., Levenson, R., Smisth, S. and Lillehei, C. (1977) : The stimulation of DNA synthesis and cell division in chondrocytes and 3T3

cells by a growth factor isolated from cartilage. *Exp. Cell Res.*, **105**, 99-108.

9) Kato, Y. and Gospodarowicz, D. (1984) : Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocyte cultures maintained in serum-free medium. *J. Cell. Physiol.*, **120**, 354-363.

10) Kato, Y. and Gospodarowicz, D. (1985) : Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.*, **100**, 477-485.

11) Kato, Y. and Iwamoto, M. (1990) : Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5903-5909.

12) Seed, J., Olwin, B. B. and Hauschka, S. D. (1988) : Fibroblast growth factor levels in the whole embryo and limb bud during chick development. *Dev. Biol.*, **128**, 50-57.

13) Suzuki, F., Yoneda, T. and Shimomura, Y. (1976) : Calcitonin and parathyroid-hormone stimulation of

acid mucopolysaccharide synthesis in cultured chondrocytes isolated from growth cartilage. *FEBS. Lett.*, **70**, 155-158.

14) Koike, T., Iwamoto, M., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki, F. and Kato, Y. (1990) : Potent mitogenic effects of parathyroid hormone (PTH) on embryonic chick and rabbit chondrocytes. Differential effects of age on growth, proteoglycan, and cyclic AMP responses of chondrocytes to PTH. *J. Clin. Invest.*, **85**, 626-631.

15) Kato, Y., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki, F., Jikko, A. and Iwamoto, M. (1990) : Effects of parathyroid hormone and calcitonin on alkaline phosphatase activity and matrix calcification in rabbit growth-plate chondrocyte cultures. *Endocrinology*, **127**, 114-148.

16) Shimomura, Y., Yoneda, T., and Suzuki, F.(1975) : Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tissue Int.*, **19**, 179-187.

17) Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F. and Takano, Y. (1988) : Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 9552-9556.

18) Courty, J., Dauchel, M. C., Mereau, A., Badet, J. and Barritault, D. (1988) : Presence of basic fibroblast growth factor receptors in bovine brain membranes. *J. Biol. Chem.*, **263**, 11217-11220.

19) Johnson, W. B. and Hollis, S. (1982) : A rapid in situ deoxyribonucleic acid assay for determining cell number in culture and tissue. *Anal. Biochem.*, **122**, 338-344.

20) Bitter, T. and Muir, H. M. (1962) : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334.

21) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. (1946) : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of

serum. *J. Biol. Chem.*, **164**, 321-329.

22) Kato, Y., Hiraki, Y., Inoue, H., Kinoshita, M., Yutani, Y. and Suzuki, F. (1983) : Differential and synergistic actions of somatomedin-like growth factor, fibroblast growth factor and epidermal growth factor in rabbit costal chondrocytes. *Eur. J. Biochem.*, **129**, 685-690.

23) Shigeno, C., Hiraki, Y., Westerverg, D. P., Potts, J. T. and Segre, G. V. (1988) : Photoaffinity labeling of parathyroid hormone receptors in clonal rat osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3864-3871.

24) Goldring, S. R., Tyler, G. A., Krane, S. M., Potts, J. T. and Rosenblatt, M. (1984) : Photoaffinity labeling of parathyroid hormone receptors; comparison of receptors across species and target tissues and after de-sensitization to hormone. *Biochemistry*, **23**, 498-502.

25) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L. (1951) : Protein measuremint with the Folin phenol

reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

26) Neufeld, G. and Gospodarowicz, D. (1986) : Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5631-5637.

27) Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L. and Neufeld, G. (1987) : Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.*, **8**, 95-114.

28) Inoue, H., Kato, Y., Iwamoto, M., Hiraki, Y., Sakuda, M. and Suzuki, F. (1989) : Stimulation of cartilage-matrix proteoglycan synthesis by morphologically transformed chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *J. Cell. Physiol.*, **138**, 329-337.

29) Iwamoto, M., Sato, K., Nakashima, K., Fuchihata, H., Suzuki, F. and Kato, Y. (1989) : Regulation of colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar by transforming growth

factor-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 1006-1011.

30) Kato, Y., Iwamoto, M. and Koike, T. (1987) : Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar. *J. Cell. Physiol.*, **133**, 491-498.

31) Delli, B. P., Curatola, A. M., Kern, F. G., Greco, A., Ittmann, M. and Basilico, C. (1987) : An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family. *Cell*, **50**, 729-737.

32) Finch, P. W., Rubin, J. S., Miki, T., Ron, D. and Aaronson, S. A. (1989) : Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*, **245**, 752-755.

33) Mansukhani, A., Moscatelli, D., Talarico, D., Levytska, V. and Basilico, C. (1990) : A murine fibroblast growth factor (FGF) receptor expressed in CHO cells is activated by basic FGF and Kaposi FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**,

4378-4382.

34) Smith, R., Peters, G. and Dickson, C. (1988) : Multiple RNAs expressed from the int-2 gene in mouse embryonal carcinoma cell lines encode a protein with homology to fibroblast growth factors. *EMBO. J.*, 7, 1013-1022.

35) Wilkinson, D. G., Peters, G., Dickson, C. and McMahon, A. P. (1988) : Expression of the FGF-related proto-oncogene int-2 during gastrulation and neurulation in the mouse. *EMBO. J.*, 7, 691-695.

36) Yoshida, T., Miyagawa, K., Odagiri, H., Sakamoto, H., Little, P. F., Terada, M. and Sugimura, T. (1987) : Genomic sequence of hst, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the int-2-encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 7305-7309.

37) Zhan, X., Bates, B., Hu, X. G. and Goldfarb, M. (1988) : The human FGF-5 oncogene encodes a

novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3487-3495.

38) Kaibuchi, K., Tsuda, T., Kikuchi, A., Tanimoto, T., Yamashita, T. and Takai, Y. (1986) : Possible involvement of protein kinase C and calcium ion in growth factor-induced expression of c-myc oncogene in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **261**, 1187-1192

39) Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T. and Suzuki, F. (1987) : Effect of vanadate on cartilage-matrix proteoglycan synthesis in rabbit costal chondrocyte cultures. *J. Cell Biol.*, **104**, 311-319.

40) Owada, M. K., Iwamoto, M., Koike, T. and Kato, Y. (1989) : Effects of vanadate on tyrosine phosphorylation and the pattern of glycosaminoglycan synthesis in rabbit chondrocytes in culture. *J. Cell. Physiol.*, **138**, 484-492.

41) Amaya, E., Musci, T. J. and Kirschner, M. W. (1991) : Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in

Xenopus embryos. *Cell*, **66**, 257-270.

42) Canalis, E., Centrella, M., Burch, W. and McCarthy, T. L. (1989) : Insulin-like growth factor 1 mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J. Clin. Invest.*, **83**, 60-65.

43) Fraser, C. L., Sarnacki, P. and Budayr, A. (1988) : Evidence that parathyroid hormone-mediated calcium transport in rat brain synaptosomes is independent of cyclic adenosine monophosphate. *J. Clin. Invest.*, **81**, 982-988.

44) Pang, P. K., Kaneko, T. and Harvey, S. (1988) : Immunocytochemical distribution of PTH immunoreactivity in vertebrate brains. *Am. J. Physiol.*, **255**, R643-647.

45) Kato, Y., Koike, T., Iwamoto, M., Kinoshita, M., Sato, K., Hiraki, Y. and Suzuki, F. (1988) : Effects of limited exposure of rabbit chondrocyte cultures to parathyroid hormone and dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate on

cartilage-characteristic proteoglycan synthesis. *Endocrinology*, **122**, 1991-1997.

46) 島津　篤，岩本容泰，小池達也，鈴木不二男，加藤幸夫（1991）：軟骨細胞培養系における副甲状腺ホルモンによるインスリン様成長因子の産生促進. 日本骨代謝学会雑誌, **9**, 37-42.

47) Sato, K., Iwamoto, M., Nakashima, K., Suzuki, F. and Kato, Y. (1990) : 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D_3 stimulates colony formation of chick embryo chondrocytes in soft agar. *Exp. Cell Res.*, **187**, 335-8.

48) Silbermann, M., Mirsky, N., Levitan, S. and Weisman, Y. (1983) : The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on cartilage growth in neonatal mice. *Metab. Bone. Dis. Relat. Res.*, **4**, 337-345.

49) Hiraki, Y., Inoue, H., Hirai, R., Kato, Y. and Suzuki, F. (1988) : Effect of transforming growth factor beta on cell proliferation and glycosaminoglycan synthesis by rabbit growth-plate

chondrocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta.*, **969**, 91-9.

50) Hiraki, Y., Inoue, H., Kato, Y., Fukuya, M. and Suzuki, F. (1987) : Combined effects of somatomedin-like growth factors with fibroblast growth factor or epidermal growth factor in DNA synthesis in rabbit chondrocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, **76**, 185-193.

51) Davis, R., Like, B. and Massague, J. (1985) : Modulation of type alpha transforming growth factor receptors by a phorbol ester tumor promoter. *J. Cell. Biochem.*, **27**, 23-30.

52) Massague, J. (1985) : Transforming growth factor-beta modulates the high-affinity receptors for epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha. *J. Cell Biol.*, **100**, 1508-1514.

53) Noda, M. and Camilliere, J. (1989) : In vitro stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*, **124**, 2991-2994.

54) Carrington, J. L., Roberts, A. B., Flanders, K. C., Roche, N. S. and Reddi, A. H. (1988) : Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor beta during endochondral bone development. *J. Cell Biol.*, **107**, 1969-1975.

55) Carrington, J. L. and Reddi, A. H. (1990) : Temporal changes in the response of chick limb bud mesodermal cells to transforming growth factor beta-type 1. *Exp. Cell Res.*, **186**, 368-373.

56) Thompson, N. L., Flanders, K. C., Smith, J. M., Ellingsworth, L. R., Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1989) : Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J. Cell Biol.*, **108**, 661-669.

57) Beguinot, F., Kahn, C. R., Moses, A. C. and Smith, R. J. (1985) : Distinct biologically active receptors for insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II in cultured skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15892-15898.

58) Ewton, D. Z., Spizz, G., Olson, E. N. and

Florini, J. R. (1988) : Decrease in transforming growth factor-beta binding and action during differentiation in muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4029-4032.

59) Olwin, B. B. and Hauschka, S. D. (1988) : Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle terminal differentiation in culture. *J. Cell Biol.*, **107**, 761-769.

60) Mattsson, M. E., Enberg, G., Ruusala, A. I., Hall, K. and Pahlman, S. (1986) : Mitogenic response of human SH-SY5Y neuroblastoma cells to insulin-like growth factor I and II is dependent on the stage of differentiation. *J. Cell Biol.*, **102**, 1949-1954.

脚注

大阪大学歯学部生化学講座(主任；鈴木不二男教授)

本論文の要旨は，大阪大学歯学会例会（平成元年6月，大阪），第31回歯科基礎医学会総会（平成元年9月，徳島），第62回日本生化学会大会（平成元年11月，京都），日本骨代謝学会（平成2年7月，東京）において一部発表した．

図の説明

図1　ウサギ成長板軟骨細胞の^{125}I-bFGF-受容体複合体のオートラジオグラフィー

軟骨細胞のbFGF受容体を検出するために，種々の濃度の^{125}I-bFGF（2×10^5 cpm/0.4 ng- 2×10^8 cpm/4ng）および非標識bFGF，IGF-I，EGFあるいはTGF-β1を添加し4℃で90分間インキュベートした．DSSを用いて^{125}I-bFGFと受容体を化学架橋して，反応終了後，細胞を回収し，還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に展開しオートラジオグラフィーを行なった．

A；^{125}I-bFGF(0.4ng)

B；^{125}I-bFGF(1.2ng)

C；^{125}I-bFGF(4ng)

D；^{125}I-bFGF(4ng)+bFGF(40ng)

E；^{125}I-bFGF(4ng)+bFGF(120ng)

F；^{125}I-bFGF(4ng)+bFGF(4μg)

G；^{125}I-bFGF(4ng)+IGF-I(2μg)

H；^{125}I-bFGF(4ng)+EGF(0.2μg)

I；^{125}I-bFGF(4ng)+TGF-β1(0.2μg)

図2　遠心管培養系で維持した成長板軟骨細胞のbFGF受容体レベルの変動

A；遠心管培養系で維持した成長板軟骨細胞のbFGF受容体レベルを培養8日から4日毎に測定した．細胞塊は，^{125}I-bFGFおよび100ngの非標識bFGFを添加し4℃で90分間インキュベートした．

B；増殖期に相当する培養8日目(左)と成熟期に相当する培養16日目(右)の軟骨細胞のbFGF受容体のScatchard解析を示す．数値は4個の培養系の平均値±S.D.を示す．

図3　成長板軟骨細胞のALPase活性と^{45}Caの取り込みに対するbFGFの影響

遠心管培養系で維持した軟骨細胞のALPase活性(A)と^{45}Caの取り込み(B)に対するbFGF(0.4ng/ml)の影響を検討した．○は対照群，▲はbFGF添加群を示す．数値は4個の培養系の平均値±S.D.を示す．

図4　bFGF受容体の変動に及ぼすbFGFの影響

A；遠心管軟骨細胞培養系に培養12日目より2日毎にbFGFを添加し続けた群(●)と，対照群(○)のbFGF受容体数を測定した．

B；遠心管軟骨細胞培養系でのbFGF添加群(●)と対照群(○)の培養系当たりのDNA含量の経時的変化を示す．数値は4個の培養系の平均値±S.D.を示す．

図5　関節軟骨細胞と成長板軟骨細胞の最終分化とbFGF受容体

成長板軟骨細胞(G.C.：○)と関節軟骨細胞(A.C.：●)をそれぞれ遠心管培養系で維持し，DNAおよびウロン酸含量(A)，ALPase活性(B)，酸可溶性画分への^{45}Caの取り込み(C)，bFGF受容体の変動(D)を検討した．

関節軟骨細胞は，多量の細胞外基質を産生し成熟軟骨細胞に分化したが，ALPase活性や石灰化を誘導せず肥大軟骨細胞にはほとんど変換しなかった．bFGF受容体は，成長板軟骨細胞では16日目以

降急速に減少したのに対して，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．数値は4個の培養系の平均値±S.D.を示す．

図6　軟骨成長板連続スライスを用いたbFGF受容体レベルの検出

実体顕微鏡下でウサギ肋軟骨の成長板から0.2mm間隔の連続したスライスを分離し(A)，最終分化に伴うbFGF受容体の減少が，実際に成長板軟骨で観察されるか否かを検討した(C)．各スライスのALPase活性を測定することにより肥大軟骨細胞の存在を検定した(B)．増殖層(スライス4)，成熟層(スライス2)，肥大層(スライス0)のbFGF-受容体結合体を非標識のbFGFの存在(+)あるいは非存在(−)の条件にてDSSを用いて検出した(D)．数値は4個のスライスの平均値±S.D.を示す．

図7　副甲状腺ホルモン受容体の生体内での分布

ウサギ胎仔および4週齢のウサギより，各種の

組織を取り出し，これらの組織への^{125}I-PTHの結合を検討した．数値は3回の実験の平均値を示す．

図8　遠心管軟骨細胞培養系での副甲状腺ホルモン受容体の変動

遠心管培養系で維持した軟骨細胞のPTH受容体レベルの変動を検討した．遠心管培養系で，^{3}H-チミジンの取り込みのピークが増殖期(A)，^{35}S-硫酸の取り込みのピークが成熟期(B)，ALPase活性の上昇のピークが肥大期(図5-B)に相当する．

PTH受容体レベルは，増殖期では低く，成熟期に相当する13日目で最大となり，以降は低下した(C)．　数値は4個の培養系の平均値±S.D.を示す．

図9　軟骨成長板連続スライスを用いたPTH受容体レベルの検出

肋軟骨成長板の0.2mm間隔の連続スライスを作製し(A)，各スライスへの^{35}S-硫酸の取り込み(B)およびPTH受容体レベルの変動(C)を検討した．

PTH受容体は，スライス3，4に高レベルに検出

され，スライス0，1，スライス5-7で低下していた．これは，連続スライスへの^{35}S-硫酸の取り込みのピークに一致していた．Aは，関節軟骨を示す．数値は3回の実験の平均値±S.D.を示す．

図10　遠心管培養系でのインスリン様成長因子-1(IGF-I)受容体

A；成長板軟骨細胞に^{125}I-IGF-Iおよび非標識IGF-I(100pg－1μg)を添加し4℃で3時間インキュベートしIGF-I受容体のScatchard解析を行なった．

B；遠心管培養系における軟骨細胞のIGF-I受容体の経時的変動を測定した．

数値は4個の培養系の平均値±S.D.を示す．

図11　遠心管軟骨細胞培養系での1,25(OH)$_2$D$_3$受容体

成長板軟骨細胞(G.C.：○)と関節軟骨細胞(A.C.：●)の細胞質画分を^{3}H-1,25(OH)$_2$D$_3$とインキュベートして1,25(OH)$_2$D$_3$受容体の経時的変

動を測定した．数値は4個の培養系の平均値±S.D.を示す．

図12　トランスフォーミング成長因子-β1および上皮成長因子受容体

A；培養8日目と16日目のEGF(左)とTGF-β1受容体(右)を検出した．

EGF受容体の検出は，^{125}I-EGFと非標識のEGFの存在(+)あるいは非存在(−)の条件にて，軟骨細胞を4℃で2時間インキュベートした．

TGF-β1受容体の検出は，^{125}I-TGF-β1と非標識のTGF-β1の存在(+)あるいは非存在(−)の条件にて4℃で90分間インキュベートした．

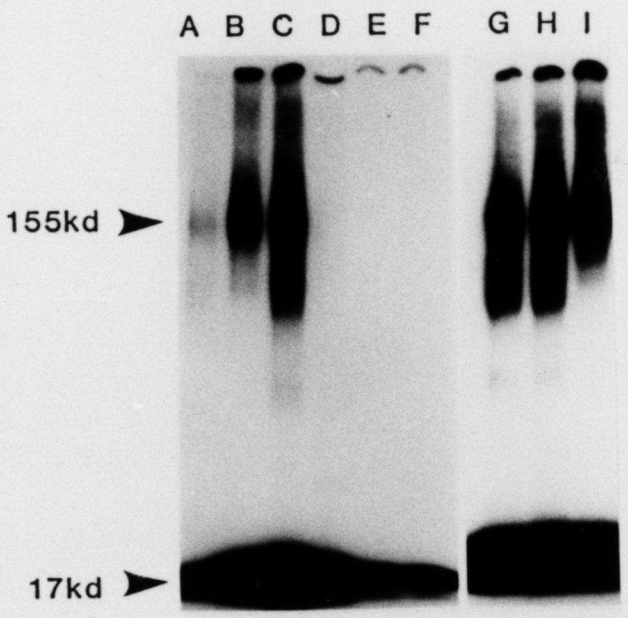

図1

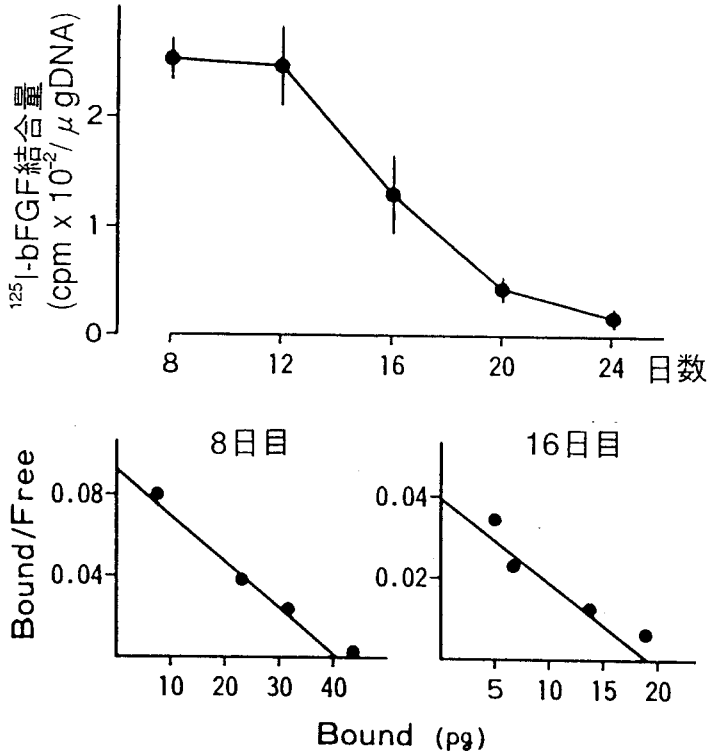
125I-bFGF結合量
(cpm x 10-2/μgDNA)
0
1
2
8
12
16
20
24
日数
8日目
16日目
Bound/Free
0.08
0.04
0.04
0.02
10
20
30
40
5
10
15
20
Bound (pg)

図2

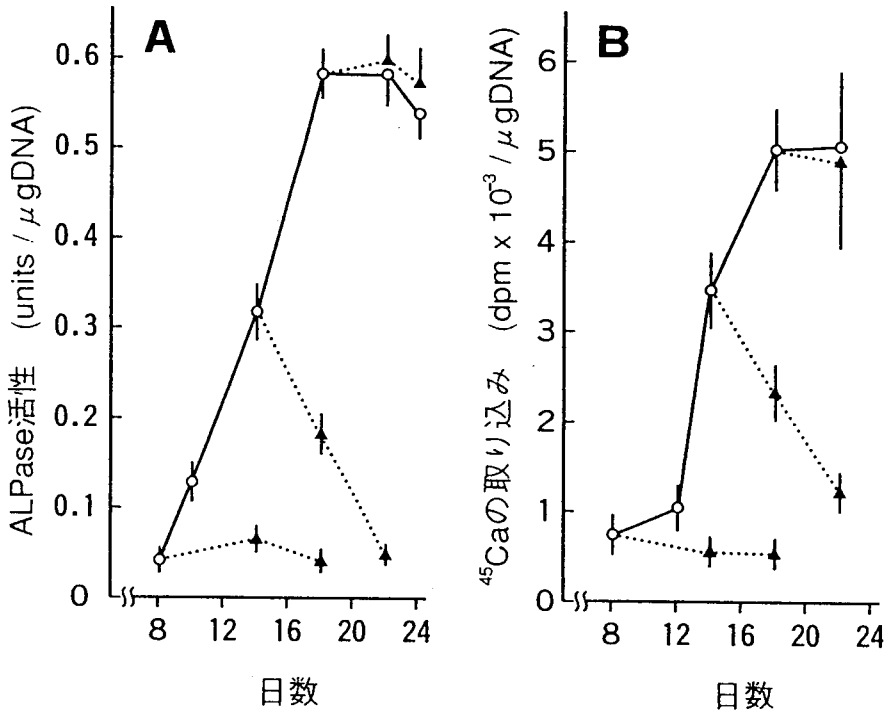
A
B
ALPase活性 (units / μgDNA)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
8
12
16
20
24
日数
45Caの取り込み (dpm x 10-3 / μgDNA)
6
5
4
3
2
1
0
8
12
16
20
24
日数

図3

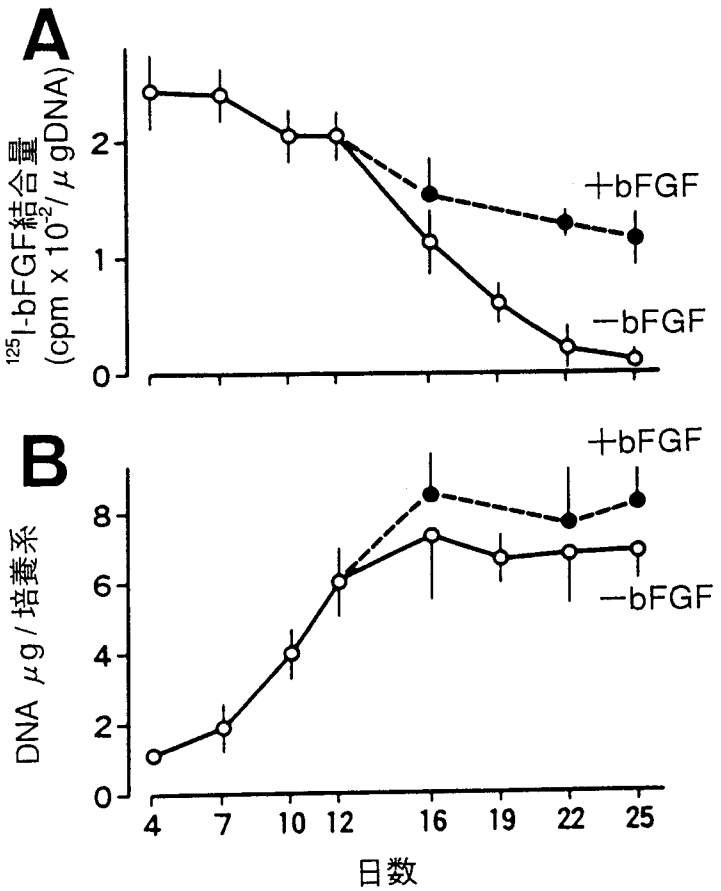
A
^{125}I-bFGF結合量
(cpm x 10^{-2}/μgDNA)
0
1
2
+bFGF
−bFGF
B
DNA μg/培養系
0
2
4
6
8
+bFGF
−bFGF
4
7
10
12
16
19
22
25
日数

図4

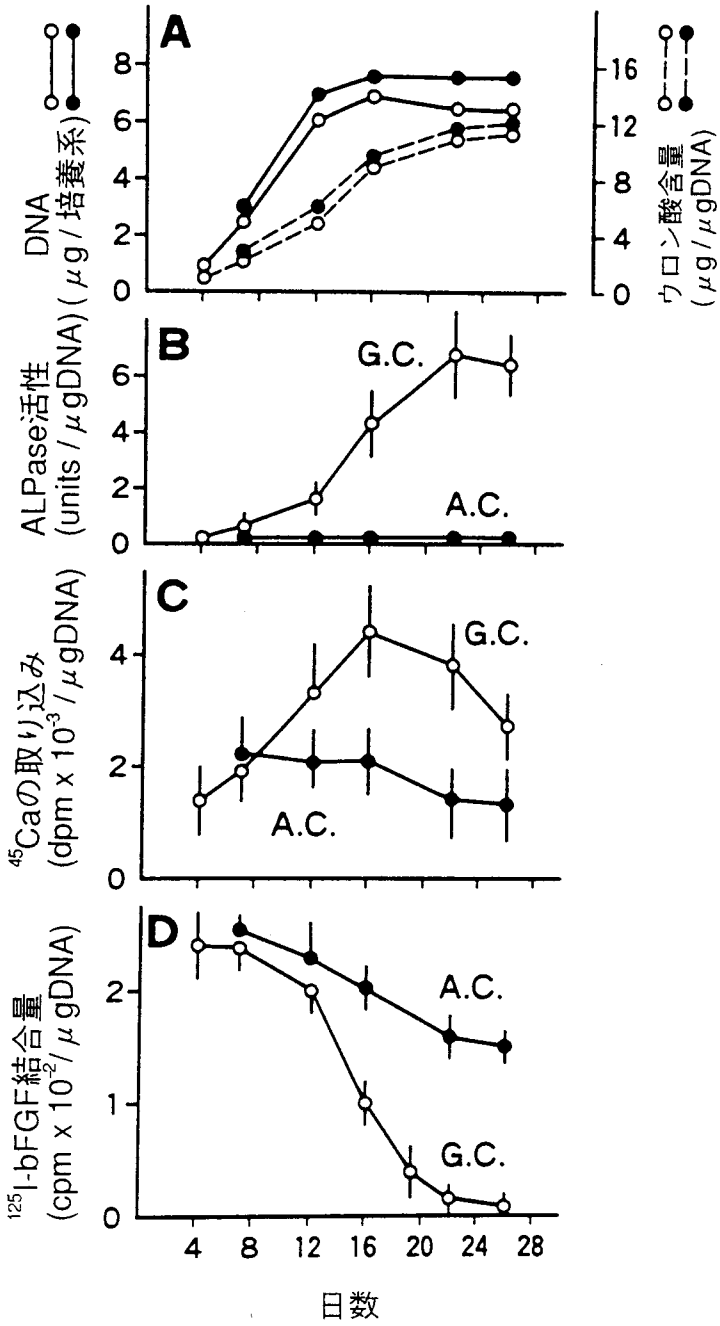
A
DNA
(μg/培養系)
ウロン酸含量
(μg/μgDNA)
B
ALPase活性
(units/μgDNA)
G.C.
A.C.
C
45Caの取り込み
(dpm x 10-3/μgDNA)
G.C.
A.C.
D
125I-bFGF結合量
(cpm x 10-2/μgDNA)
A.C.
G.C.
日数

図5

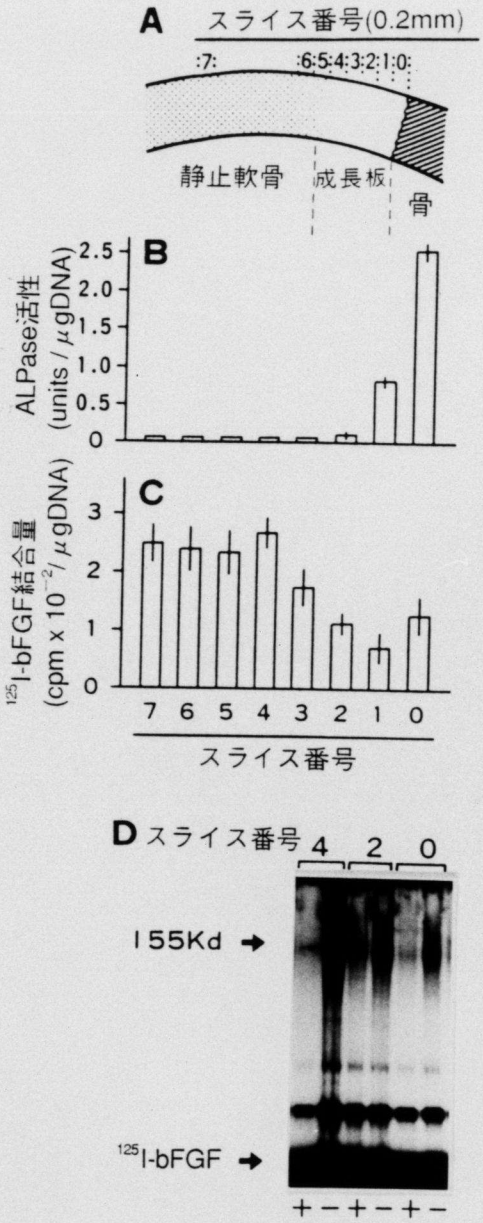
A
スライス番号(0.2mm)
7
6 5 4 3 2 1 0
静止軟骨
成長板
骨
B
ALPase活性
(units / μgDNA)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
C
125I-bFGF結合量
(cpm x 10⁻² / μgDNA)
3
2
1
0
7 6 5 4 3 2 1 0
スライス番号
D
スライス番号
4 2 0
155Kd
125I-bFGF
+ − + − + −

図6

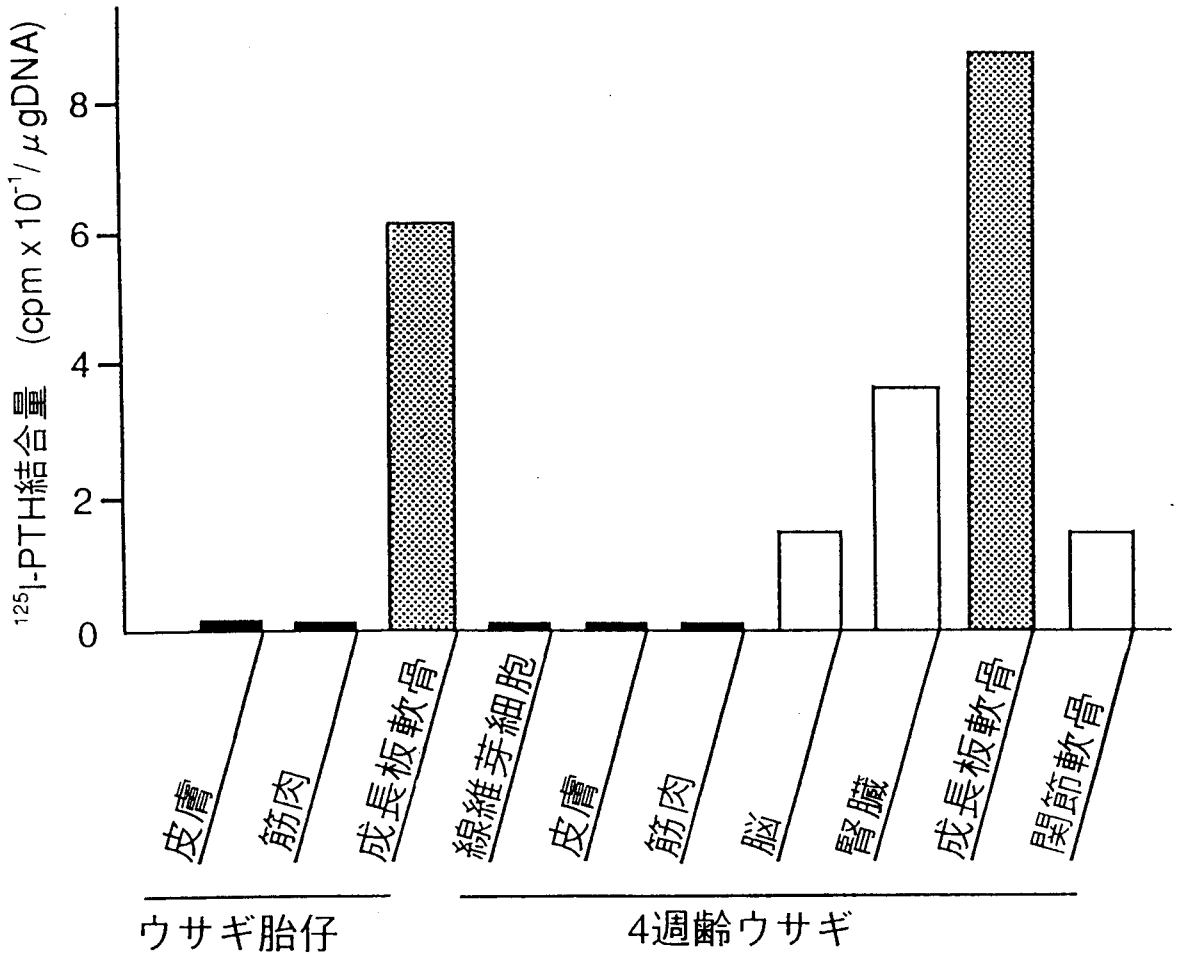
^{125}I-PTH結合量 (cpm x 10^{-1}/μgDNA)
0
2
4
6
8
皮膚
筋肉
成長板軟骨
線維芽細胞
皮膚
筋肉
脳
腎臓
成長板軟骨
関節軟骨
ウサギ胎仔
4週齢ウサギ

図7

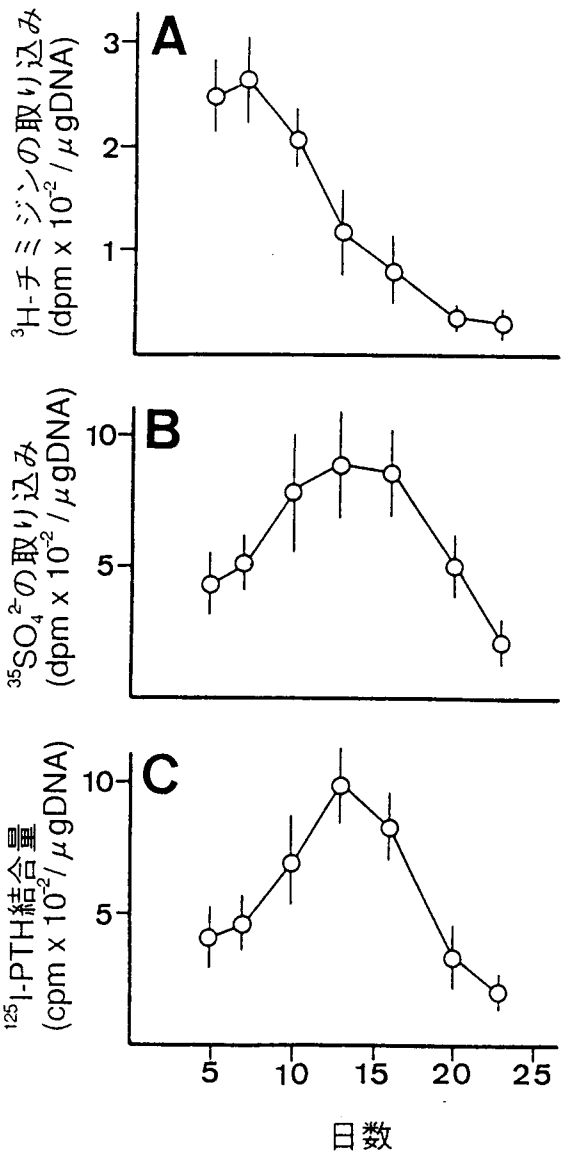
A
B
C
^{3}H-チミジンの取り込み (dpm x 10^{-2} / μgDNA)
$^{35}SO_4^{2-}$の取り込み (dpm x 10^{-2} / μgDNA)
^{125}I-PTH結合量 (cpm x 10^{-2} / μgDNA)
3
2
1
10
5
10
5
5
10
15
20
25
日数

図8

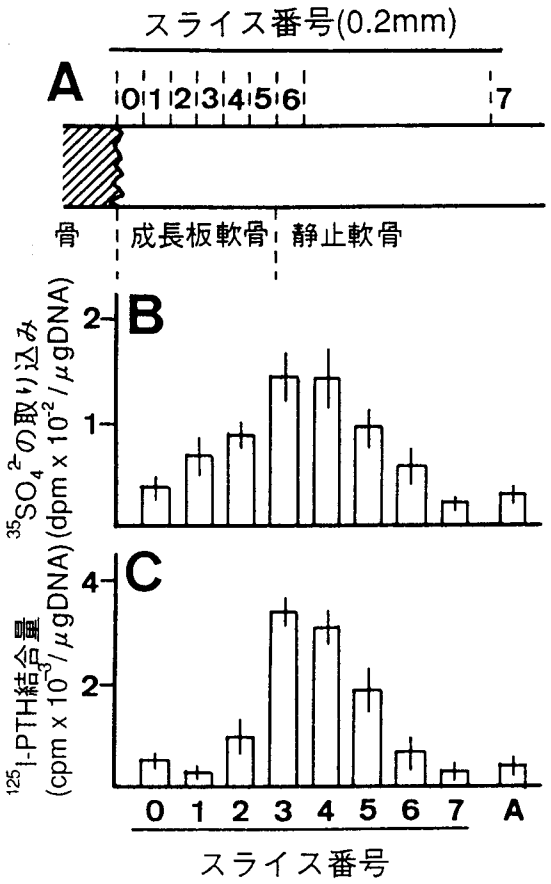
スライス番号(0.2mm)
A
0 1 2 3 4 5 6 7
骨
成長板軟骨
静止軟骨
B
$^{35}SO_4^{2-}$の取り込み
(dpm x 10^{-2} / μgDNA)
2
1
C
^{125}I-PTH結合量
(cpm x 10^{-3} / μgDNA)
4
2
0 1 2 3 4 5 6 7 A
スライス番号

図9

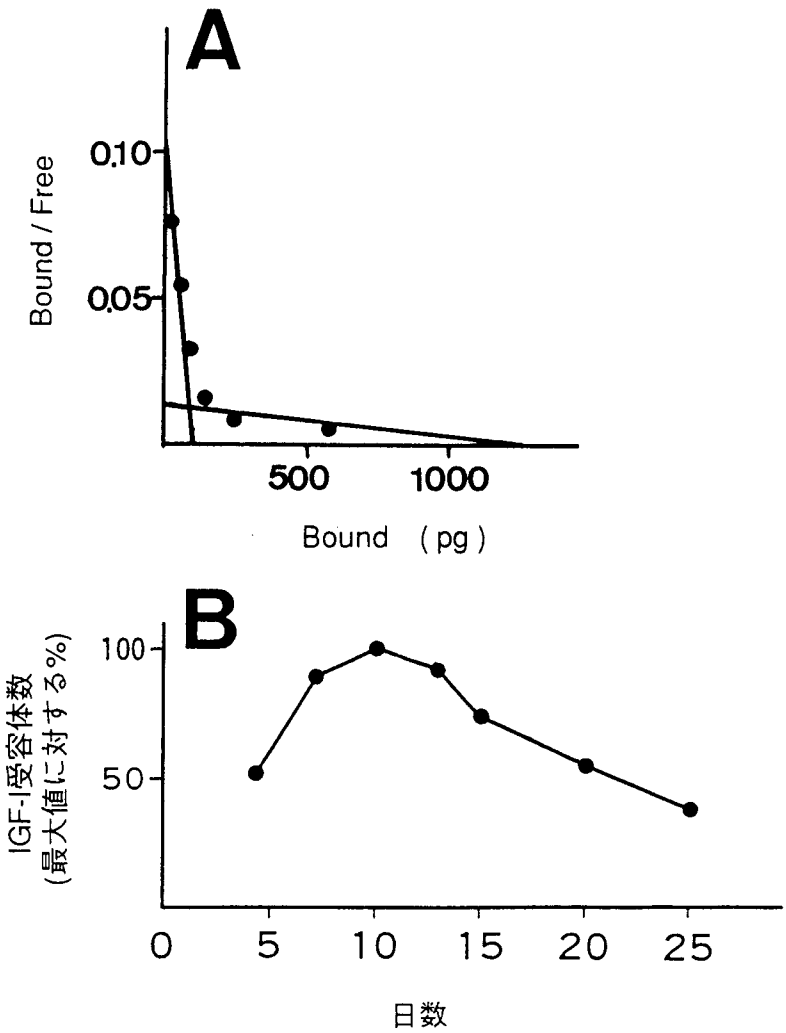
A
0.10
0.05
Bound / Free
500
1000
Bound (pg)
B
100
50
IGF-I受容体数
(最大値に対する%)
0
5
10
15
20
25
日数

図10

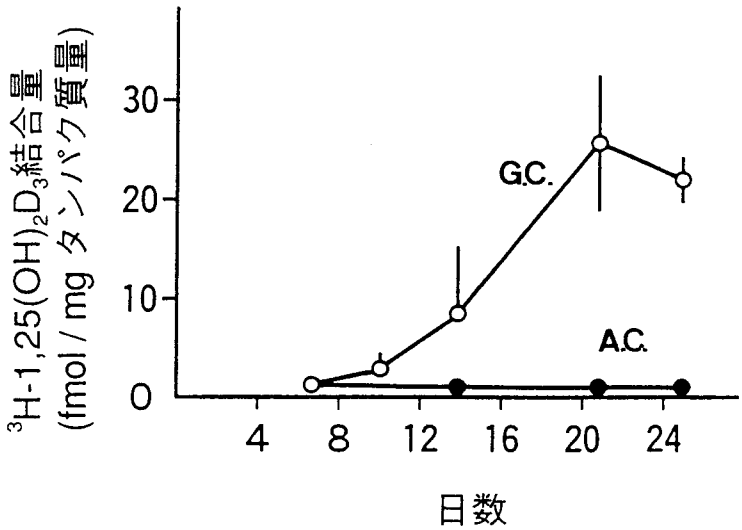

図11

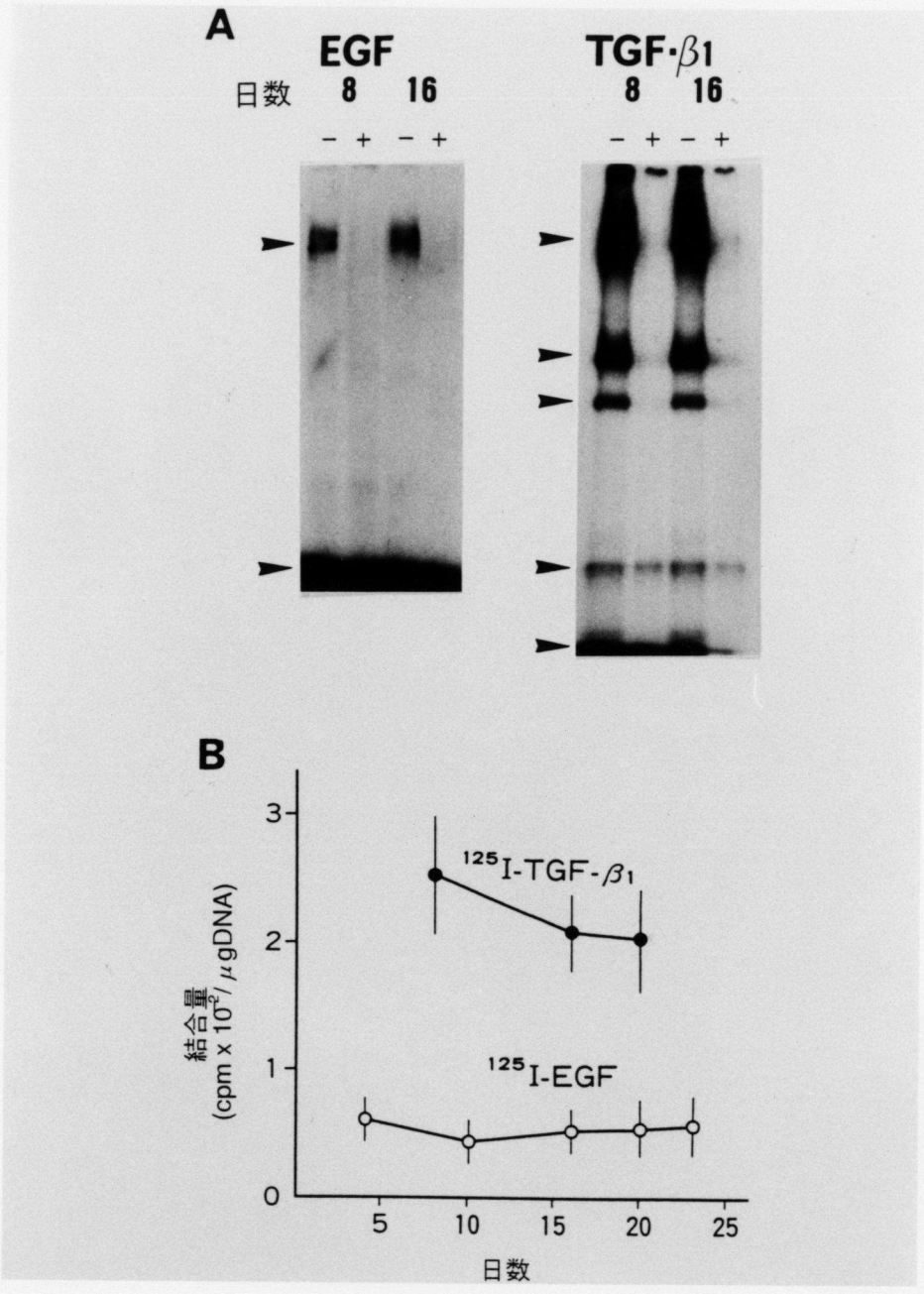
A
EGF
TGF·β1
日数
8
16
8
16
− + − +
− + − +
B
125I-TGF-β1
125I-EGF
結合量
(cpm x 10⁻²/μgDNA)
0
1
2
3
5
10
15
20
25
日数

図12