Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Effects of Retinoic Acid on Steroid and Vitamin D3 Receptors in Cultured Mouse Osteosarcoma Cells |
| Author(s) | 鈴木, 省三 |
| Citation | 大阪大学, 1993, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38154 |
| 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。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 鈴　木　省　三（すずき しょうぞう） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　10677　号 |
| 学位授与年月日 | 平成5年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科外科系専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Effects of Retinoic Acid on Steroid and Vitamin $D_3$ Receptors in Cultured Mouse Osteosarcoma Cells<br>**（マウス骨肉腫細胞におけるステロイドホルモンレセプター及びビタミン$D_3$レセプターに対するレチノイン酸の影響）** |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　小野　啓郎<br>（副査）<br>教　授　岡田伸太郎　　教　授　谷口　直之 |


## 論　文　内　容　の　要　旨

（目　　的）

レチノイン酸（RA）は，胎生期ラットの長管骨において骨吸収を促進し，マウスやニワトリの頭蓋冠でコラーゲン合成を減少させるなど，骨組織の分化や代謝に影響を与える因子として知られている。しかし，その作用機序は未だ不明である。正常骨由来の細胞は不均一で様々な分化段階における細胞が混在し，実験系として必ずしも適当でないため，さらに単純化された条件下でRAの影響をみる必要がある。当教室では，in vitroでBone Morphogenetic Protein（BMP）産生その他の骨芽細胞の形質を有するマウス骨肉腫細胞株BFO細胞を樹立維持している。本研究では，このBFO細胞を用いて，RAによる骨芽細胞に特異的な形質発現の変化を検討した。さらに，骨芽細胞の機能に関与していると思われるエストロゲンレセプター（ER），グルココルチコイドレセプター（GR）及びビタミン$D_3$レセプター（VDR）に対するRAの影響について検討した。

（方法ならびに成績）

骨芽細胞形質発現に対するRAの影響；1．RAは0.1％BSA添加MEM培地下にて作用させた。RA（$10^{-7}$M）の細胞増殖に対する時間依存性及び，用量依存性（RA$10^{-12}$～$10^{-6}$M）を検討した。RAは時間，用量に依らずBFO細胞の増殖に影響を与えなかった。2．骨芽細胞の産生物質であるosteocalcin，type I collagen，BMP 4のcDNAをprobeとしてnorthen blotをおこなった結果，各mRNAともに，基礎発現量が非常に多く見られたが，RA（$10^{-7}$M）24時間作用後の発現量の変化は見られなかった。3．アルカリフォスファターゼ（ALP）活性は，ヤトロン社製ALP活性測定キットを用いて細胞抽出液より測定した。

ALP活性はRAにより時間依存性及び用量依存性（96時間にてコントロール比300％）に，活性が増加した。

ステロイドホルモンレセプターに対するRAの影響；BFO細胞のステロイドホルモンレセプターを検定するため[$^3$H]-estradiol，[$^3$H]-triamcinolon acetonide，[$^3$H]-1，25-(OH)$_2$vitamin $D_3$を用いてsingle point saturation assayを行なった。その結果，BFO細胞では，ER，GR，VDRが認められた（ER：1.0x$10^3$，GR:3.7x$10^4$，VDR：6.6x$10^4$ sites／cell)。RA前処置により，用量依存性にERとVDRのspecific bindingの増加（ER：2.0倍，VDR：2.1倍）が認められたが，GRは変化しなかった。ERは，24時間後に$10^{-7}$MのRAによりspecific bindingが最高となった。Scatchard解析により細胞あたりのERの数がRA処理により2000から4000に増加していたが，解離定数はKd＝5x$10^{-10}$Mと変化しなかった。RAおよびそのanalogue（retinal，retinol acetate，retinol）による処理では，

RA, retinal, retinol acetate の順で，ER 量を増加させたが，retinol にその効果はなかった。これは，RAレセプター（RAR）への親和性と一致した。Dexamethasone, testosterone, 1, 25-$(OH)_2$Vitamin $D_3$, R5020（合成progesterone), triiodothyronine では，ER は増加せず RA に特異的作用であった。northern blot では，RA 刺激により ER mRNA は 3 倍に増加した。また，RAR-$\alpha$ および-$\gamma$ mRNA が確認されたが RAR-$\beta$ mRNA が確認されなかった。RAR-$\alpha$ は-$\gamma$ より10倍の親和性を持つと言われており，BFO 細胞は比較的低濃度のRAに反応していることから，ER 及び VDR の増加は，主として RAR-$\alpha$ を介した RA の作用によるものと考えられた。

（総　　括）

1．BFO 細胞において，骨芽細胞に特異的な osteocalcin, type I collagen, BMP 4 の mRNA の発現が northern blot にて認められた。

2．RA 刺激により BFO 細胞の ER は affinity には変化なしにレセプター数が二倍に増加した。BFO 細胞は RAR-$\alpha$ および-$\gamma$ を有しており，RA は主として RAR-$\alpha$ を介して BFO 細胞の ALP 活性を増加させると共に，ER と VDR 数を増加させると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

レチノイン酸は，胎生期の骨格形成に深く関与する分化誘導因子であるが，その作用機序は未だ解明されていない。本論文では，近年精製された骨形成因子（BMP）を産生する特異的作用をもった骨芽細胞を用い，この細胞の形質発現について詳細に検討すると共に，レチノイン酸が及ぼす影響について明らかにした。レチノイン酸は BMP の産生に影響を与えなかったが，エストロゲンレセプター制御に関わっていることが明らかとなった。これらは，レチノイン酸の骨芽細胞に対する作用の全く新しい重要な知見である。すなわち，レチノイン酸がエストロゲンレセプター制御を介して骨芽細胞に作用していることを示唆し，レチノイン酸作用機序解明に重要であるのみならず，内因性エストロゲン減少後に生じる閉経骨粗しょう症とも関連する臨床的にも意味のある発見である。以上より，学位論文としての価値を有すると認められた。