



Title	軟骨細胞の基質産生と最終分化における活性型ビタミンD3の役割
Author(s)	佐藤, 克彦
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38270
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	佐藤克彦
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第10326号
学位授与年月日	平成4年5月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	軟骨細胞の基質産生と最終分化における活性型ビタミンD ₃ の役割
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木不二男 (副査) 教授 岡田 宏 助教授 斎藤 喜八 助教授 雪石 聰

論文内容の要旨

$1\alpha,25$ -二水酸化ビタミンD₃ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) は生体内カルシウムレベルを調節するホルモンであり、小腸からのカルシウム吸収、骨からのカルシウムの遊離、および腎でのカルシウムの再吸収を促進する。しかも、これらの標的臓器中には $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の特異的なレセプターが存在している。一方、成長板では軟骨細胞は増殖・分化したのち最終的に石灰化し、やがて骨に置き換わることにより骨格成長が進行する。また、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の特異的レセプターが骨細胞および軟骨細胞中にも存在しており、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は骨細胞と軟骨細胞に直接あるいは間接的に作用してその増殖と分化に影響していることが示唆されている。しかし、軟骨細胞の増殖・分化過程における $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の役割についてはまだ不明である。そこで本研究では、軟寒天および遠心管内軟骨細胞培養系を用いて、軟骨の増殖、基質形成および最終分化に対する $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を検討するとともに、ビタミンD欠乏食にて飼育したラットの軟骨に対するビタミンDの効果も併せて検討した。

ニワトリ胚軟骨細胞を10%ウシ胎仔血清を含む軟寒天中で培養すると、軟骨細胞は細胞外基質を産生しながら増殖しコロニーを形成する。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はこの軟骨細胞のコロニー形成、すなわち増殖を促進したが、これは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の単独の作用ではなく、血清中に含まれる因子、あるいは線維芽細胞増殖因子等の他の成長因子と共同して作用していることが示唆された。

次に、遠心管内でウサギ成長板軟骨細胞を培養して $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の軟骨細胞の増殖と分化に対する影響を検討した。軟骨細胞を遠心管内で塊状にして培養すると、軟骨細胞の増殖が停止した後にプロテオグリカンの産生およびアルカリホスファターゼの誘導が起こった。本培養系で $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-9} および 10^{-8} M) は軟骨細胞のDNA量、および初期の分化の指標であるプロテオグリカン含量を増加させた。その一方で、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はアルカリホスファターゼの産生を濃度依存的に抑制した。しかし、他のビタミンD代謝物はこのような作用を示さなかった。

そこで、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の *in vivo* での作用を検討するために、ビタミンD欠乏食にて5週間飼育した“くる病ラット”(D欠乏ラット)を作製し、軟骨に対するビタミンDの影響を検討した。D欠乏ラットに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重あるいはその100倍量の24R,25-二水酸化ビタミンD₃ ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重) を1週間経口投与し

た後、血液および肋軟骨の成長板を採取した。ビタミンD欠乏食により低下した血中のカルシウムおよび無機リン酸レベルは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ および $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の投与により回復した。なお、大量に投与した $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の方がより顕著な血中カルシウムレベル上昇作用を示した。一方、D欠乏ラットでは肋軟骨成長板軟骨のプロテオグリカン含量は正常の約半分に低下したが、軟骨の最終分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性は逆に2倍上昇した。すなわち、D欠乏ラットの成長板では細胞外基質の産生（初期分化）と石灰化へと向かう肥大化（最終分化）との平衡が崩れた。しかし、D欠乏ラットに $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与するとプロテオグリカン含量はビタミンD欠乏群の1.4倍に増加し、アルカリホスファターゼ活性は40%減少して、いずれも正常レベル近くまで回復した。これに対して、 $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は血中のカルシウムレベルを強力に上昇させたにもかかわらず、プロテオグリカン含量とアルカリホスファターゼ活性にはほとんど影響しなかった。なお、静止軟骨部でのプロテオグリカン含量およびアルカリホスファターゼ活性はビタミンD欠乏食飼育あるいは $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 処置によって変化しなかった。

以上の *in vitro* び *in vivo* の実験結果より、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は軟骨細胞の増殖と基質産生および最終分化の制御に関するビタミンDの活性型の代謝物であることが判明した。

論文審査の結果の要旨

$1,25\text{-二水酸化ビタミンD}_3$ ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) は Ca 調節ホルモンであり、小腸からの Ca 吸収、骨からの Ca の遊離および腎からの Ca の再吸収を促進することはよく知られているが、軟骨細胞の増殖と分化の過程における活性型ビタミンD₃の作用については十分明らかにされていない。本研究は軟骨細胞培養系および“くる病”ラットを用いて $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を検討したものである。

その結果、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はウシ胎仔血清あるいは線維芽細胞成長因子の存在下にニワトリ胚軟骨細胞の軟寒天コロニー形成を促進すること、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はウサギ増殖軟骨細胞のDNA量およびプロテオグリカン含量を増加させるが、最終分化のマーカーであるアルカリホスファターゼの産生を抑制することを明らかにした。さらにラットにビタミンD欠乏食を投与して“くる病”を発症させると成長板軟骨中のアルカリホスファターゼ活性は正常ラットよりも高く、軟骨細胞の分化亢進がみられたが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の経口投与によりアルカリホスファターゼ活性および骨端軟骨幅も正常値に戻った。しかし、 $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ など、他のビタミンD代謝産物は以上のような作用を発現しなかった。従って本論文は軟骨代謝における活性型ビタミンD₃の多彩な作用を解析する上で重要な知見をえたものであり、博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認める。