

Title	Epidermal growth factor attenuates cell proliferation by down-regulating the transforming growth factor- $\beta$ receptor in the osteoblastic cell line MC3T3-E1
Author(s)	直原, 廣明
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38385">https://hdl.handle.net/11094/38385</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 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	じき 直	はら 原	ひろ 廣	あき 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)			
学位記番号	第 1 0 3 7 9 号			
学位授与年月日	平成 4 年 8 月 3 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	Epidermal growth factor attenuates cell proliferation by down-regulating the transforming growth factor- $\beta$ receptor in the osteoblastic cell line MC3T3-E1 (骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞における epidermal growth factor の transforming growth factor- $\beta$ 受容体を介する増殖減弱作用)			
論文審査委員	(主査) 教授 谷澤 修 (副査) 教授 越智 隆弘 教授 荻原 俊男			

## 論文内容の要旨

### 【目的】

骨芽細胞より多量の transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が分泌および生成されていることが知られており、骨代謝において TGF- $\beta$  が重要な働きをしていることが推測される。しかしながら、骨芽細胞の増殖、分化における TGF- $\beta$  の作用は細胞の種類、報告者によりまちまちで必ずしも統一した見解はない。また近年、骨芽細胞での TGF- $\beta$  受容体の存在が明らかにされたが、その変化における役割については未だ明かでない。わたしは、マウスの骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いてその増殖における TGF- $\beta$  および TGF- $\beta$  受容体の役割さらには EGF の影響について検討した。

### 【方法】

- ① ミンクの肺上皮細胞株 MV1-Lu 細胞をもちいて、 $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを測定することにより、MC3T3-E1 細胞の培養上清中の TGF- $\beta$  活性を測定した。MC3T3-E1 細胞は 10%胎児牛血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地下で継代培養し、48時間無血清培地下での培養上清を酸処理し測定した。
- ② MC3T3-E1 細胞より CsCl 法にて total RNA を抽出し、マウス TGF- $\beta$  cDNA をプローブとして、Northern analysis をおこない、TGF- $\beta$  mRNA の発現を検討した。
- ③ 10%胎児牛血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地下で、TGF- $\beta$  および EGF を 12-48 時間投与した後に、MC3T3-E1 細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込み能を測定した。
- ④ MC3T3-E1 細胞を 10%胎児牛血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地下で 3 日間培養し、ほぼ confluent になった後培養上清を洗浄後、 $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$  と 15°C で 3 時間 incubation し、TGF- $\beta$  の特異的結合能を検討した。また、EGF の添加によるその変化を検討した。
- ⑤  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$  を用いて cross-linking study をおこない、TGF- $\beta$  受容体を検討した。
- ⑥ 10%胎児牛血清存在下で TGF- $\beta$  (1ng/ml) あるいは EGF (10nM) で 18 時間前培養の後、培養上清洗浄後再度 TGF- $\beta$  (1ng/ml) で 24 時間 incubation し、 $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを測定した。

### 【成績】

- ① MC3T3-E1 細胞培養上清により MV1-Lu 細胞への  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みが抑制され、TGF- $\beta$  活性が認められた ( $2040 \pm 157 \text{ pg/ml} / \times 10^6 \text{ cells} / 48 \text{ hr}$ )。培養上清の酸処理によりさらに強い取り込み抑制を認めた。その抑制は TGF- $\beta$  の中和抗体により解除された。
- ② Northern blot 解析で 2.5Kb の単一の band を認め、MC3T3-E1 細胞より多量の TGF- $\beta$  mRNA の発現を認めた。
- ③ TGF- $\beta$  (1ng/ml) あるいは EGF (10nM) を 24-48 時間添加することにより、MC3T3-E1 細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを増加させ、細胞増殖を促進した。
- ④ Kd 196 pM,  $2.8 \times 10^4$  sites/cell の高親和性の TGF- $\beta$  受容体が検出され、EGF の添加によりその受容体数が減少した。その受容体数の減少は 10nM EGF の添加 20 時間で plateau に達し約 60% まで減少した。また EGF の濃度依存的に受容体数が減少することを確認した。
- ⑤ cross-linking study により 280,95,65KDa の 3 種の TGF- $\beta$  receptor 複合体を確認した。
- ⑥ 10nM EGF で 18 時間前処置の後、1 ng/ml TGF- $\beta$  を 24 時間添加することにより、TGF- $\beta$  単独添加に比し、MC3T3-E1 細胞への  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みが約 1/2 倍に抑制された。

### 【総括】

骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞は多量の TGF- $\beta$  を産生、分泌し TGF- $\beta$  受容体を保有している。この細胞において TGF- $\beta$  は細胞増殖に対して促進的に働いており、EGF は TGF- $\beta$  受容体数を減少させ、TGF- $\beta$  の細胞増殖促進作用を抑制した。したがって、MC3T3-E1 細胞においては一部には TGF- $\beta$  受容体の調節による細胞増殖制御機構が存在する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、マウスの骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いてその増殖における TGF- $\beta$  および TGF- $\beta$  受容体の役割さらには EGF の影響について検討した。その結果、MC3T3-E1 細胞において TGF- $\beta$  は細胞増殖に対して促進的に働いており、EGF は TGF- $\beta$  受容体数を減少させ、TGF- $\beta$  の細胞増殖促進作用を抑制した。MC3T3-E1 細胞においては一部には TGF- $\beta$  受容体の調節による細胞増殖制御機構が存在する可能性が示唆され、この論文は博士（医学）の学位を授与するに値するものとする。