

|               |  |
|---------------|--|
| Title         | 培養軟骨細胞の細胞外基質構築に及ぼすサイトカインの作用  |
| Author(s)     | 恵, 周一郎   |
| Citation      |  |
| Issue Date    |  |
| oaire:version |  |
| URL           | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38881">https://hdl.handle.net/11094/38881</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</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 <sup>めくみ</sup> 憲 <sup>しゅういちろう</sup> 周一郎

博士の専攻分野の名称 博士(歯学)

学位記番号 第 11324 号

学位授与年月日 平成6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 培養軟骨細胞の細胞外基質構築に及ぼすサイトカインの作用

論文審査委員 (主査)  
教授 鈴木不二男

(副査)  
教授 栗栖浩二郎 教授 齋藤 喜八 助教授 白砂 兼光

## 論文内容の要旨

### 【目的】

骨端成長板に存在する軟骨細胞は長軸方向に特徴的な形態変化を示し、増殖層、成熟層、肥大化層、石灰化層を形成している。増殖層の軟骨細胞は活発に分裂した後に、成熟して大量の細胞外基質を分泌する。次いで細胞は肥大化して基質の石灰化を誘導する。石灰化した基質は最終的に新生骨に置換される。この一連の過程は内軟骨性骨形成と呼ばれ、長管骨の伸長は本過程に依存する。骨の長軸方向への伸長の原動力を担う増殖層の軟骨細胞は、固い細胞外基質の殻に閉じ込められながらも急速な分裂を行う。このように大量の細胞外基質に埋まりながら分裂する軟骨細胞の周囲では活発な細胞外基質の改変が生じていると考えられるが、この細胞外基質の改変を制御する因子や機構についての詳細は不明である。

そこで本研究においては、初代ウサギ肋軟骨成長板軟骨細胞培養系を用いて、軟骨基質の主要成分であるプロテオグリカンに焦点を置き、軟骨基質の改変について検討を行った。すなわち、合成されたプロテオグリカンがどのように細胞層と培地へ分配されるかを指標として、増殖分化刺激あるいは炎症刺激が軟骨基質の改変に対してどのような影響を与えるかを検討した。さらに、ビタミンC添加によりコラーゲン基質の3次元構築を促した軟骨細胞培養系とビタミンC非添加群の培養系における増殖分化刺激あるいは炎症刺激の軟骨基質改変に対する作用について比較検討した。

### 【方法】

ウサギ肋軟骨より分離した成長板軟骨細胞を10%ウシ胎仔血清(FCS)含有培地にて培養した。コンフルエントに達した軟骨細胞を $[^{35}\text{S}]$ 硫酸で5時間プレラベルして軟骨細胞が合成分泌したプロテオグリカンを標識した後、各種成長因子[インターロイキン $1\beta$ (IL- $1\beta$ )、トランスフォーミング成長因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)]を含む0.5%FCS含有培地に交換し2日間培養を続けた。培養終了後、培地と細胞層を別々に回収して標識プロテオグリカンの分布を調べた。

細胞層に蓄積したプロテオグリカン量はアルシアンブルー染色と、ジメチルメチレンブルー法により評価した。またコラーゲナーゼ活性は、FITC-標識コラーゲンを基質として、ストロメライシン活性の測定は、 $[^{14}\text{C}]$ -カゼインを基質として行った。プロテオグリカン分子サイズの測定は、解離条件下でグリセロール濃度勾配上にて超遠心することにより行った。さらにビタミンCを添加することにより、培養系にどのような変化が生じるかを電顕的及び光顕的

に観察し、各種成長因子添加時の標識プロテオグリカンの分布の変動にも検討を加えた。

#### 【結果と考察】

IL-1 $\beta$ は、0.6pg/mlの低濃度より、有意にプロテオグリカンの培地への移行を促進した。200pg/ml以上では90%以上の標識プロテオグリカンが培地に移行した。bFGFやTGF $\beta$ も単独でプロテオグリカンの培地への移行を促進した。しかもこの培地への移行は、IL-1 $\beta$ と異なりプロテアーゼ活性の誘導を伴っていなかった。低濃度(20pg/ml)のIL-1 $\beta$ とbFGF、TGF $\beta$ が共存すると協力的にプロテオグリカンの培地への移行が促進された。また各種成長因子で処置した軟骨細胞の産生するプロテオグリカン・モノマーの分子サイズにも全く変化が見られなかった。一方、ビタミンCを添加してコラーゲン線維の発達を促した培養系では、IL-1 $\beta$ を添加してもプロテオグリカンの培地への移行は全く起こらなかった。bFGFとTGF $\beta$ は、単独で用量依存的にプロテオグリカンを培地に移行させた。さらに低濃度(20pg/ml)のIL-1 $\beta$ が共存するとプロテオグリカンの培地への移行を協同的に促進した。以上の結果より、bFGFやTGF $\beta$ は軟骨細胞の増殖分化を刺激するのみならず、軟骨基質の改変も促進することが示唆された。

ビタミンCを添加してコラーゲン線維の発達を促した培養系では、コラーゲンを主成分とする軟骨細胞を取り囲むカプセル構造により特徴付けられるコンドロン様の構造が認められた。このような細胞外基質構築が認められる系に、IL-1 $\beta$ の様な炎症刺激によりカプセル構造の部分的な破壊が生じても2日間という短期間ではプロテオグリカンは培地に移行せず、bFGFやTGF $\beta$ などによる軟骨細胞周囲での軟骨基質の改変が合併して初めて、プロテオグリカンが急速に細胞層から流出したものであると考えられる。

すなわち、この軟骨細胞培養系による細胞外基質の動的変化モデルの確立は、各種炎症疾患における組織破壊の機序の解析にも有用な知見を提供するものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は初代ウサギ肋軟骨細胞培養系を用いて軟骨基質の主要成分であるプロテオグリカン(PG)がどのように細胞層と培地に分配されるかを指標として基質構築に対する増殖、分化、および炎症刺激の影響を検討したものである。

軟骨細胞の単層培養系にインターロイキン-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )を添加して炎症刺激を与えた場合、およびbFGFやTGF $\beta$ などの増殖、分化刺激を与えた場合は、いずれもPGが細胞層から培地へ移行した。ところが培地にビタミンCを添加すると、細胞はII型コラーゲンから成るカプセルに包まれPGに富むコンドロン様の三次元構造が構築された。このようなin vivoに近い系にIL-1 $\beta$ を単独で添加してもPGの培地への移行は認められず、bFGFあるいはTGF $\beta$ を共存させて初めてPGの流出が起こった。以上のように本論文は軟骨細胞に対する種々のサイトカインの作用を検討する際にコンドロンを考慮する必要性を生化学的及び形態学的に示したものである。従って本論文は、関節炎などの炎症による組織崩壊の機構を解析する上で重要な示唆を与えるものであり、博士(歯学)の学位請求に十分値するものと認める。