

Title	軟骨分化に伴う副甲状腺ホルモン応答能の獲得
Author(s)	宿南, 知佐
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39087">https://hdl.handle.net/11094/39087</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>〉</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	宿 南 知 佐
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 11827 号
学位授与年月日	平成7年3月23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	軟骨分化に伴う副甲状腺ホルモン応答能の獲得
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木 不二男  (副査) 教授 齋藤 喜八 助教授 白砂 兼光 講師 山本 照子

### 論文内容の要旨

胎生期における長管骨の形成は、軟骨内骨化によってもたらされる。すなわち、未分化間葉細胞の凝集に始まる軟骨分化によって形成された骨原基が、石灰化を経て骨組織へと置換される。この間、未分化細胞は、初期軟骨分化から成熟・肥大化の各分化段階を経て最終的に石灰化に至る。しかし、その制御機構は、未だ明らかではない。細胞分化機構の解明には、これを制御するホルモンや成長因子に対する応答能の獲得の面から解析することが不可欠である。

副甲状腺ホルモン (PTH) は、一般に、骨と腎を標的とするカルシウム調節ホルモンとして知られている。ところが、成熟軟骨細胞にも PTH 受容体が発現していることが知られている。一方、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因因子のひとつとして同定された副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) は、局所因子として正常組織でも広く発現し、PTH と共通の受容体 (PTH/PTHrP 受容体) を介して作用を発現する。

本研究では軟骨分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞 (EC 細胞) 由来クローン化細胞株 ATDC 5 細胞を用いて、まず軟骨内骨化における軟骨細胞の多段階分化をシミュレートできる *in vitro* 培養系を確立し、これを用いて軟骨分化に伴う PTH/PTHrP 応答能の獲得過程を解析した。

#### [実験方法]

ATDC 5 細胞は、5%ウシ胎仔血清 (FBS) 存在下に培養した。細胞の軟骨分化誘導は、培地にインスリン (10 μg/ml) を添加して行った。培養系の細胞数、DNA 含量、アルカリホスファターゼ活性を経時的に測定すると共に、アルシアンブルー染色、アリザリンレッド染色を行って軟骨分化の進行を追跡した。ATDC 5 細胞の分化段階は、ノーザンブロット法により軟骨分化マーカー遺伝子の発現パターンから特定した。PTH/PTHrP 受容体の同定は、<sup>125</sup>I 標識した [Nle<sup>8</sup>, Nle<sup>18</sup>, Tyr<sup>34</sup>] bovine PTH (1-34) amide ([<sup>125</sup>I] PTH (1-34)) を用いた結合実験によって行った。また、分化に伴う細胞の超微形態の変化を透過電子顕微鏡にて観察した。

#### [結果]

- 1) ATDC 5 細胞は、5%FBS 存在下に旺盛に増殖し、コンフルエントに達すると接触阻害によって完全に増殖を停止した。細胞は紡錘形を呈するが、線維芽細胞や骨芽細胞に発現する I 型コラーゲン遺伝子の発現を認めなかった。また、軟骨マーカーである II 型コラーゲンやアグリカン遺伝子の発現も認めなかった。
- 2) インスリン添加培地で培養を続けると細胞凝集過程を経て軟骨分化が高頻度で誘導され、軟骨細胞の増殖により軟骨結節が形成された。さらに、培養 3 週間後に軟骨細胞の増殖は再び停止し、培養系は増殖期から成熟期へ移行し

た。軟骨結節の形成と並行してアグリカンとⅡ型コラーゲン遺伝子の発現が認められ、その mRNA レベルは急速に上昇した。分化した ATDC 5 細胞は、電顕的にも粗面小胞体の発達した典型的な成熟軟骨細胞の形態を示した。

3) 培養 4 週間後には、多数の肥大軟骨細胞の出現が認められた。さらに、肥大軟骨細胞の周辺からアリザリンレッドに濃染される沈着物が認められ、電顕像は基質小胞を介する典型的な軟骨石灰化像を呈した。培養 6 から 7 週間にかけて、培養系の石灰化は広範に拡大し、培養系のアルカリホスファターゼ活性は増殖期の数百倍に達した。

4) 成熟期に達した ATDC 5 細胞における PTH/PTHrP 受容体の発現を、 $[^{125}\text{I}]$  PTH (1-34) を用いた飽和結合実験によって検索した。Scatchard 解析から、受容体の Kd 値および Bmax は、それぞれ 3.87nM,  $32.2 \times 10^4$  sites/cell であった。

5) 未分化な ATDC 5 細胞に  $[^{125}\text{I}]$  PTH (1-34) の特異的結合を検出することはできなかった。 $[^{125}\text{I}]$  PTH (1-34) の特異的結合は、軟骨結節の形成と共に出現した。

6) 未分化な ATDC 5 細胞は、PTH/PTHrP 受容体遺伝子を発現していなかった。PTH/PTHrP 受容体遺伝子の発現は軟骨初期分化と共に検出され、その発現レベルは培養 3 週間まで著明に上昇した。

#### [結語]

マウス胚性腫瘍細胞由来クローン化細胞株 ATDC 5 は、インスリンの存在下に間充織凝集に類似の細胞凝集過程を経て極めて高頻度で軟骨細胞に分化するのみならず、肥大化を経て石灰化に至ることが明らかとなった。したがって、申請者は、軟骨内骨化に関与する骨端軟骨細胞の全分化段階を再現する単一クローン細胞による軟骨分化誘導系を確立することに成功した。さらに、本培養系を駆使して、PTH/PTHrP 応答能の獲得が軟骨初期分化と緊密に連動して確立されることを明らかにし、これが PTH/PTHrP 受容体遺伝子の発現レベルによって調節されていることを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス胚性腫瘍細胞由来クローン化細胞株 ATDC 5 細胞系が、内軟骨性骨形成における軟骨細胞の多段階分化をシミュレートしうるか？ また、この系を用いて軟骨分化に伴う副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) 応答能を獲得しうるか？ について検討したものである。

その結果、ATDC 5 細胞培養系にインスリンを添加することにより、内軟骨性骨形成に関与する骨端軟骨細胞の全分化過程を再現しうる「単一クローン細胞による軟骨分化誘導系」を確立することに成功した。さらにこの培養系を駆使して PTHrP 応答能の獲得が軟骨初期分化と密接に連動していることを明らかにした。従って本論文は、軟骨初期分化の機構を解明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。