

Title	ヒト軟骨肉腫由来クローン化軟骨細胞様細胞株における結合組織増殖因子の遺伝子発現とその機能解析
Author(s)	木村, 祐輔
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/39811">http://hdl.handle.net/11094/39811</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	木村祐輔
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第12436号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	ヒト軟骨肉腫由来クローン化軟骨細胞様細胞株における結合組織増殖 因子の遺伝子発現とその機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 作田 正義  (副査) 教授 栗栖 浩二郎 助教授 開 祐司 講師 村上 伸也

## 論文内容の要旨

## 【目的】

内軟骨性骨形成過程において静止軟骨細胞は成長軟骨細胞へと分化して増殖し、成熟して多量の基質を産生する。その後、細胞自身は肥大化すると共に基質の石灰化が起り、この石灰化軟骨に血管が侵入し、最終的には軟骨組織は骨組織に置換する。本研究では最近開発された differential display (DD) 法を内軟骨性骨形成にあずかる軟骨細胞系の細胞と膜性骨形成にあずかる骨芽細胞系の細胞との間に適用し、内軟骨性骨形成過程において特異的に発現していると考えられる遺伝子の同定とその機能の解析を試みた。

## 【方法】

## 1. DD-PCR

軟骨系の細胞としてヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 および HCS-2/A, ウサギ成長軟骨細胞、同静止軟骨細胞, 同関節軟骨細胞, 骨芽細胞系の細胞としてヒト骨肉腫由来細胞株 Saos-2, マウス骨芽細胞株 MC3T3E-1 各細胞より全 RNA を抽出し, mRNA の 3' 末端 poly(A)<sup>+</sup> 部分にアニールするよう設計したアンカープライマーと上流の任意プライマーとの組合せによる PCR を行った。PCR 産物を電気泳動後, 軟骨系の細胞に特異的に検出されるバンドから DNA 断片を抽出して塩基配列を決定し, ヒト結合組織増殖因子 (CTGF) と相同性を有する HCS 由来のクローン 24 (*hcs24*) について以下の解析を行った。

## 2. ノーザンプロット

各細胞より抽出した全 RNA あるいはヒト各種臓器の poly(A)<sup>+</sup> RNA を用い, プロブは *hcs24* の遺伝子断片を [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP で標識したものを使用した。

3. *in situ* ハイブリダイゼーション

*hcs24* の遺伝子断片をもとにジゴキシゲニン標識リボプロブを作製し, 胎生17日のマウス胎仔切片を標本とした。

4. *hcs24* cDNA のクローニング

CTGF が属する CCN ファミリーにおいてアミノ酸配列が高度に保存されている領域の塩基配列に基づきプライマーを作製した。このプライマーを用い, HCS-2/8 より調製した poly(A)<sup>+</sup> RNA をもとに作製した cDNA プールを鋳型にして PCR により行った。

## 5. ウェスタンブロット

HCS-2/8の細胞抽出物を試料とし、一次抗体にCTGFを認識することが知られている抗ヒトPDGF抗体を用い、二次抗体にALPase標識抗体を用いた。

## 6. アンチセンスDNA法による機能解析

アンチセンスオリゴマーは翻訳開始部位に設定した。DNA合成は $[^3\text{H}]$ チミジンの酸不溶性画分への取り込み量を、プロテオグリカン合成は $[^{35}\text{S}]$ 硫酸のCPC不溶性画分への取り込み量を指標とし、ALPase活性はBesseyの方法に準じて測定した。

### 【結果】

1. DD-PCRの結果、軟骨細胞に特異的な約30種のバンドが得られ、これらの塩基配列を決定したところ、7種の未知遺伝子断片と既知遺伝子と相同性を有する数種の遺伝子断片が含まれていた。
2. そのなかで1991年に初めて報告され、軟骨細胞では今まで全く報告のみられない新しい増殖因子であるCTGFと相同性を有する *hcs24* はノーザンブロットの結果、両HCS細胞、ウサギ成長軟骨細胞に特異的に発現しており、軟骨以外の組織では腎臓、胎盤などにわずかに発現を認めた。また、*in situ*ハイブリダイゼーションにより肥大軟骨細胞に強い発現局在が認められた。
3. *hcs24* cDNAのクローニングの結果、CTGF蛋白質をコードしていることが判明し、CTGFと同一の染色体DNAに由来することが判明した。また、ウェスタンブロットによりHCS-2/8がCTGFを産生していることが確認された。
4. HCS-2/8培養系においてこの遺伝子の発現は内軟骨性骨形成に重要な役割を果たしていると考えられるTGF- $\beta$ やBMP-2により誘導を受けた。
5. アンチセンスDNA法によりCTGFの産生を抑制すると増殖期のHCS-2/8のDNA合成は著明に抑制され、一方、プロテオグリカン合成能やウサギ成長軟骨細胞におけるALPase活性は軽度上昇した。

### 【結論】

ヒト軟骨肉腫由来の細胞株においてCTGFの遺伝子が発現し、同因子を産生していることが明らかとなった。生体では同因子は肥大軟骨細胞により産生され、増殖期の軟骨細胞に対して細胞が分化、成熟するのを抑え増殖を促進する作用を有することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、最近開発された differential display 法を用いて、内軟骨性骨形成過程において特異的に発現していると考えられる遺伝子の同定と、その機能の解析を試みたものである。

その結果、今まで軟骨細胞では全く報告のみられないヒト結合組織増殖因子の遺伝子の発現をヒト軟骨肉腫由来の細胞株において明らかにし、さらにこの遺伝子産物が生体内では肥大軟骨細胞によって産生され、軟骨細胞の増殖に重要な役割を果たしていることを示唆する知見を得た。

上述の知見は、最新の高度な実験技術を駆使することによって得られたものであり、内軟骨性骨形成のメカニズムを解明する上で価値ある研究業績であると判定される。

よって、申請者は博士(歯学)の学位を得る資格があると認める。