

| | |
|--------------|---|
| Title | 内軟骨性骨化における肝細胞増殖因子(HGF)の生理的役割 |
| Author(s) | 山下, 和夫 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | none |
| URL | http://hdl.handle.net/11094/39822 |
| DOI | |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

| | |
|------------|--------------------------------------|
| 氏名 | 山 下 和 夫 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (歯 学) |
| 学位記番号 | 第 1 2 4 4 2 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 | 内軟骨性骨化における肝細胞増殖因子 (HGF) の生理的役割 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 作田 守 |
| | (副査) 教授 鈴木 不二男 助教授 三木 靖夫 講師 岩本 容泰 |

論 文 内 容 の 要 旨

成長軟骨は成長時の長管骨や肋骨などに存在し、長管骨の伸長に必須の内軟骨性骨化の過程で主要な役割を演じている。未分化間葉系細胞から分化した成長軟骨細胞は、増殖、成熟した後に、さらにX型コラーゲンやアルカリフォスファターゼ (APase) を発現する肥大軟骨細胞に最終分化し、軟骨細胞外基質の石灰化を誘導する。石灰化軟骨基質は毛細血管の侵入を受けると同時に、破軟骨細胞により吸収され、骨芽細胞の骨基質添加により最終的に新生骨と置換される。このような内軟骨性骨化における一連の成長軟骨細胞の分化過程は、多様なサイトカインにより制御されていることが明らかになっている。

肝細胞増殖因子 (HGF) は、種々の間葉系細胞において産生され、上皮系細胞の増殖、運動性、形態形成、およびある種の癌細胞の殺細胞作用を促進する多機能なサイトカインとして知られていたが、最近になって一部の間葉系細胞に対しても作用を示すことが明らかになってきた。また、発生中の肢芽内で、HGF の受容体である *c-met* の遺伝子が発現していることが報告された。肢芽内では、軟骨および骨が活発に形成されており、HGF が骨格形成に密接に関与していると考えられる。

そこで、本研究では、骨格形成に主要な役割を演じる成長軟骨細胞の増殖・分化に対する HGF の作用を、ウサギ成長軟骨細胞の培養系を用いて検討した。また成長軟骨における HGF 遺伝子の発現および HGF 蛋白の局在を調べた。

まず、ラット軟骨組織および培養軟骨細胞から全 RNA を調整し、RT-PCR 法により成長軟骨における HGF および *c-met* の遺伝子発現の有無を調べた。その結果、成長軟骨が *in vivo* でも *in vitro* でも HGF および *c-met* の遺伝子を発現していることが明らかになった。

次に、軟骨細胞の増殖および基質産生に対する HGF の作用を検討したところ、HGF は成長軟骨細胞の DNA 合成を若干促進したが、その作用は関節軟骨細胞に対する作用ほど著明ではなかった。また、HGF は関節軟骨細胞のプロテオグリカン合成を促進したが、成長軟骨細胞に対しては作用しなかった。

さらに、成長軟骨細胞の最終分化マーカーである APase 活性および X 型コラーゲンの産生に対する HGF の作用を検討した。その結果、10ng/ml の HGF は培養 8 日目の成長軟骨細胞の APase 産生を約 80% 抑制し、その抑制効果は分化段階の初期に有効であり、また可逆的であることが明らかになった。また、X 型コラーゲンの産生は、HGF により濃度依存性に抑制され、10 ng/ml の HGF は X 型コラーゲンの蓄積をほぼ完全に抑制した。さらに培養 40 日

目の成長軟骨細胞の細胞外基質に沈着したカルシウム含量は、HGFの濃度に依存して減少し、3 ng/mlのHGFによりカルシウム含量はコントロールの約20%に減少した。

次に、3週齢ラットの肋軟骨を用いて、成長軟骨におけるHGF遺伝子の発現およびHGF蛋白の局在を調べた。HGF遺伝子は軟骨膜ならびに増殖軟骨細胞および成熟軟骨細胞に、HGF蛋白は肥大軟骨層に発現していた。

今回の研究により、HGFは、成長軟骨細胞のAPaseの産生、X型コラーゲンの産生および石灰化を強力に抑制すること、および成長軟骨組織においては主に肥大軟骨層に存在することが明らかになった。これらの事実は、HGFが成長軟骨細胞の最終分化を抑制する因子として、生理的に内軟骨性骨化に関わることを示唆している。

一方、HGF蛋白の局在は、主に肥大軟骨層を中心に、骨と隣接する石灰化層にも認められた。HGFは血管新生の促進、造血幹細胞から破骨細胞への分化促進、破骨細胞の骨吸収能の促進、さらに、骨芽細胞の増殖およびAPase産生の促進に関与することが報告されている。従って、石灰化層に存在するHGFは、成長軟骨細胞の分化過程のみならず、軟骨から骨への変換過程にも何らかの役割を担っていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、成長軟骨細胞の培養系を用いて、成長軟骨細胞の増殖、分化に対する肝細胞増殖因子(HGF)の作用を検討するとともに、成長板におけるHGFの局在を分子生物学的および免疫組織化学的に検討したものである。

その結果、HGFは成長軟骨細胞の最終分化および石灰化を生理的濃度の範囲内で濃度依存性に抑制すること、またその遺伝子は増殖軟骨細胞層および成熟軟骨細胞層において発現し、その蛋白は肥大軟骨層を中心に局在することが明らかになった。

以上のように、本論文は多様な実験的手法を駆使して、内軟骨性骨化におけるHGFの生理的役割を初めて解明した優れた業績であり、博士(歯学)の学位請求に値するものと認める。