

Title	内軟骨性骨化におけるFrzbの生理的役割の解明
Author(s)	竹本, 誠司
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41521
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"〉 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	竹本誠司
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第14557号
学位授与年月日	平成11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Frzbの生理的役割の解明』
論文審査委員	(主査) 教授 野首 孝祠 (副査) 教授 栗栖浩二郎 助教授 中川 浩一 講師 岩本 資己

論文内容の要旨

【研究目的】

頭蓋を除く全身の骨格は、内軟骨性骨化の過程を通して形成される。内軟骨性骨化は、軟骨原基の形成および成長とそれに引き続く骨への置換といった複数の細胞が関わる一連の過程であり、その分子制御機構は未だ不明である。

最近、Frzbという分泌蛋白が、軟骨原基に特異的に発現することが報告された。その構造は、Wnt受容体であるFrizzledの細胞膜外部分と高い相同性を示す。また、FrzbはWntに対する可溶性の受容体として、Wntの作用を中和することが明らかになった。Wntは、無脊椎動物から脊椎動物まで高度に保存されたセグメントポラリティー遺伝子であり、種々の細胞の増殖や分化に関与することが知られている。これらの知見より、FrzbおよびWntが骨格形成過程において何らかの役割を果たすことが予想された。

そこで、本研究は骨格形成の制御機構の解析の一環として、軟骨組織におけるFrzbの局在を検討し、またFrzbの軟骨細胞の分化に対する作用を検討した。

【実験方法ならびに結果】

① Frzbのマウス軟骨組織での発現とWnt familyのマウス肢芽組織での発現

Frzbは、マウス胚14日齢の全RNAよりRT-PCR法にてクローニングした。次いで、pBluescript SK II (+)にサブクローニングした。このcDNAよりジゴキシゲニンでラベルしたRNAプローブを調製し、in situハイブリダイゼーション法により、マウス胎児肢芽(E15.0)におけるFrzbの発現を調べた。成長軟骨組織において、Frzbは静止軟骨細胞層から前肥大軟骨細胞層まで発現が認められたが、肥大軟骨細胞層では殆ど発現が認められなかった。また、マウス肢芽組織においてWnt-1, Wnt-3A, Wnt-5BおよびWnt-8の発現が認められた。

② Frzbの軟骨細胞増殖、分化に及ぼす作用の解析

実験①で得られた全長のFrzbをRCASレトロウイルスベクターに組み込み、ニワトリ胚線維芽細胞にFugene 6 reagentを用いて導入し、その培養上清に産生されるウイルスを回収した。このウイルスを濃縮して、16日齢ニワトリ胸骨より分離した軟骨細胞に感染させた。対照群の軟骨細胞には、インサートを含まないウイルスを感染させた細胞群およびウイルス非感染の細胞群を用いた。

6日後に一部の細胞をP19抗ウイルス抗体で染色して、殆どの細胞がウイルスに感染したことを確認した。残りの細胞は継代して、細胞の形態および機能変化を追跡した。対照群の軟骨細胞は、コンフルエントに達するまで殆ど

が紡錘形であったのに対して、Frzbを感染させた細胞は、成熟した軟骨細胞に特徴的な球形あるいは多角形を示すものが多かった。しかし、コンフルエントを過ぎると、全ての群で軟骨細胞は球形および多角形の成熟軟骨細胞へと分化し、群間の軟骨細胞の形態に差は認められなくなった。

また、軟骨細胞の細胞増殖、成熟および肥大化に及ぼすFrzbの作用を検討するために、継時的に軟骨細胞のDNA量、軟骨細胞の基質であるグリコサミノグリカン（GAG）量および肥大化マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALPase）活性を測定した。さらに、軟骨細胞を9日間培養したのち、軟骨細胞をアリザリンレッド染色して軟骨基質石灰化に及ぼすFrzbの作用を検討した。Frzbは軟骨細胞増殖に対して影響しなかったが、軟骨基質産生を有意に増加させた。一方、ALPaseの発現を20-30%程度に抑制し、軟骨細胞石灰化をほぼ完全に抑制した。

【考察】

本研究によって、Frzbが成長軟骨組織で発現し、軟骨細胞はFrzbに応答することが判明した。Frzbは、成長軟骨組織において静止軟骨細胞層から前肥大軟骨細胞層まで発現が認められた。また、軟骨細胞に対して、Frzbは軟骨細胞の基質産生を促進する一方で、最終分化を抑制していた。

同様の作用を有する因子として、これまでHepatocyte growth factor, basic-Fibroblast growth factorなどが知られているが、Frzbも成長軟骨細胞の最終分化を抑制すると同時に、十分な増殖あるいは成熟を促がし、持続的な骨格の伸長を可能にすると考えられる。

現在、FrzbはWnt-1およびWnt-8に対して結合し、それらのWnt受容体への結合を阻害することによって、その活性を中和することが知られている。今回、軟骨細胞培養系で得られたFrzbの作用は、Wnt-1およびWnt-8の作用をブロックすることによって間接的に発揮された可能性がある。さらに、Frzbが他のWnt分子と結合したり、Frzbが可溶性因子として軟骨細胞に直接作用する可能性もあり、今後軟骨組織に発現するWntおよびFrizzledを詳細に調べる必要がある。

【結論】

Frzbは、成長軟骨組織において静止軟骨細胞層から前肥大軟骨細胞層まで発現が認められた。また、Frzbは軟骨細胞培養系において軟骨基質産生を促進し、ALPaseの発現および軟骨細胞石灰化を抑制することが明らかとなった。

このことから、Frzbは内軟骨性骨化において軟骨細胞の成熟を促進し、その最終分化を抑制する生理的な制御因子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、内軟骨性骨化におけるFrzbの役割を解明するために、Frzbのマウス成長軟骨組織での遺伝子発現について、さらにニワトリ胚の肢芽の未分化間葉細胞から軟骨細胞への分化、およびニワトリ胚の胸骨の軟骨細胞の分化に対するFrzbの作用について詳細に検討を行ったものである。

その結果、Frzbは成長軟骨組織で発現し、軟骨細胞の基質の合成を促進し、最終分化を抑制することが判明した。

以上より、本研究は内軟骨性骨化におけるFrzbの生理的作用を解明する上で極めて重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。