



Title	Age-Dependent Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and its Receptors and Age-Related Stimulatory Effect of TGF- $\beta$ 1 on Proteoglycan Synthesis in Rat Intervertebral Discs
Author(s)	奥田, 眞也
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42633">https://hdl.handle.net/11094/42633</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="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	おく だ しん や 奥 田 真 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Age-Dependent Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and its Receptors and Age-Related Stimulatory Effect of TGF- $\beta$ 1 on Proteoglycan Synthesis in Rat Intervertebral Discs (ラット椎間板における TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 1 レセプターの加齢に伴う遺伝子発現の変化と TGF- $\beta$ 1 によるプロテオグリカン合成の加齢に伴う変化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 川 秀 樹  (副査) 教 授 越 智 隆 弘    教 授 遠 山 正 彌

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

椎間板は中央に髄核が位置し、その周囲を線維輪が層状に取り囲む形で構成されるが、加齢による椎間板の変性は椎間板におけるプロテオグリカン合成の低下と密接に関わっている。プロテオグリカンは主に髄核で合成され脊椎における圧応答を担っている。プロテオグリカン合成の調節因子の1つに Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) があるが、椎間板細胞においても TGF- $\beta$  1 の刺激によりプロテオグリカン合成を促進させることが報告されている。しかし実際に TGF- $\beta$  1 及びそのレセプター (T $\beta$ Rs) の遺伝子発現を椎間板組織で確認した報告は無く、また加齢との関係も明らかではない。今回我々は椎間板組織での TGF- $\beta$  1 の遺伝子発現と加齢に伴う発現パターンの変化、さらに TGF- $\beta$  1 のプロテオグリカン合成への影響を確認する目的で本研究を行った。

### 【方法】

8週齢、40週齢、および120週齢のラット尾椎を用いて、それぞれの髄核、線維輪より直接 RNA を抽出し TGF- $\beta$  1 及びそのレセプターの遺伝子レベルでの発現を RT-PCR 法にて確認した。また各週齢の頸椎組織標本を用いて TGF- $\beta$  1 の免疫組織化学染色を施行しタンパクレベルでの発現を確認した。さらに各週齢の髄核及び線維輪の細胞を単層培養して、培養上清中への TGF- $\beta$  1 の分泌能を培養1日目から5日目まで蛋白レベルで測定した。次に各週齢の培養細胞に TGF- $\beta$  1 を 0.1ng/ml~100ng/ml の量で刺激してプロテオグリカン合成を測定した。また各週齢の培養細胞に対する TGF- $\beta$  1 刺激の有無でのプロテオグリカン合成を Toluidine blue 染色で確認した。

### 【成績】

- 1) RT-PCR 法による遺伝子レベルでの検討では、髄核においては8週齢の細胞で TGF- $\beta$  1 とレセプターの強い発現を認めたが、加齢に伴い TGF- $\beta$  1 と1型レセプター (T $\beta$ R-I) の発現が低下していた。2型レセプター (T $\beta$ R-II) の発現には差はなかった。また線維輪においては TGF- $\beta$  1 及び T $\beta$ Rs の発現を僅かに認める程度で、加齢に伴う変化はなかった。
- 2) 頸椎組織標本を用いた TGF- $\beta$  1 の免疫組織化学染色によるタンパクレベルでの検討でも、RT-PCR の結果と同様に髄核組織において TGF- $\beta$  1 の発現は加齢とともに低下していた。
- 3) 培養細胞における TGF- $\beta$  1 の培養上清中への分泌量は、各週齢の細胞で時間依存性に上昇しており、椎間板細胞自身による TGF- $\beta$  1 の分泌が確認された。しかしながら TGF- $\beta$  1 の分泌能は加齢とともに低下してい

た。

- 4) 椎間板細胞の TGF- $\beta$  1 刺激によるプロテオグリカン合成は各週齢の細胞で TGF- $\beta$  1 の量依存性に促進されていたが、プロテオグリカン合成の TGF- $\beta$  1 に対する応答性は加齢とともに低下していた。
- 5) Toluidine blue 染色では、TGF- $\beta$  1 で刺激した細胞群で異染性染色を認め、盛んなプロテオグリカン合成を示唆する所見が確認された。

#### 【総括】

ラット椎間板における TGF- $\beta$  1 および TGF- $\beta$  1 レセプターの加齢に伴う遺伝子発現の変化と TGF- $\beta$  1 によるプロテオグリカン合成の加齢に伴う変化について検討した。得られた成績は次のようにまとめられる。

- 1) 椎間板の細胞において TGF- $\beta$  1 および TGF- $\beta$  1 レセプターの発現を確認した。しかしながら髄核では加齢に伴い TGF- $\beta$  1 と T $\beta$ R-I の発現が低下していた。
- 2) 椎間板の TGF- $\beta$  1 刺激に対するプロテオグリカン合成の応答性は加齢に伴い低下していた。
- 3) これらの実験結果より TGF- $\beta$  1 は椎間板細胞でのプロテオグリカン代謝における autocrine/paracrine regulator であると考えられた。また加齢に伴う椎間板のプロテオグリカン合成の低下は、髄核での加齢に伴う TGF- $\beta$  1 および TGF- $\beta$  1 レセプターの発現の低下によって生じるものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

加齢による椎間板の変性はプロテオグリカン合成の低下と密接に関わっている。椎間板は中央に髄核が位置し、その周囲を線維輪が層状に取り囲む形で構成されるが、プロテオグリカンは主に髄核で合成され脊椎における圧応答を担っている。今回我々は、軟骨におけるプロテオグリカン合成調節因子の1つである Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) およびそのレセプターの椎間板での加齢に伴う発現の変化を遺伝子レベルおよびタンパクレベルで調査した。また TGF- $\beta$  1 の刺激による椎間板でのプロテオグリカン合成の加齢に伴う変化についても調査した。

結果、椎間板では髄核組織において遺伝子レベル及びタンパクレベルで TGF- $\beta$  1 とその 1 型レセプターは加齢に伴い発現が低下していた。さらに髄核の細胞の TGF- $\beta$  1 刺激によるプロテオグリカン合成は、TGF- $\beta$  1 の刺激量依存性に亢進していたが、その応答性は加齢とともに低下していた。これは 1 型レセプターの発現低下によるものと考えられた。

今回の研究は、TGF- $\beta$  1 は椎間板細胞でのプロテオグリカン代謝における autocrine/paracrine regulator であり、また加齢に伴う椎間板のプロテオグリカン合成の低下のメカニズムの1つとして、髄核での加齢に伴う TGF- $\beta$  1 および TGF- $\beta$  1 レセプターの発現の低下を示唆したはじめての報告である。これは大阪大学博士（医学）の学位授与に値すると考える。