

Title	初期軟骨細胞における細胞外無機リン酸応答性分子機構の解析
Author(s)	木全, 正彰
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47606
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	木 全 正 彰
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21043 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	初期軟骨細胞における細胞外無機リン酸応答性分子機構の解析
論文審査委員	(主査) 客員教授 道上 敏美 (副査) 教授 古郷 幹彦 助教授 西村 理行 講師 佐伯万騎男

論文内容の要旨

[背景]

内軟骨性骨形成過程においては、軟骨細胞が増殖・分化し、II型コラーゲン、X型コラーゲン等によって代表される軟骨特異的な細胞外基質の分泌および石灰化、引き続いて起こる血管侵入と骨への置換により骨格が形成される。軟骨細胞分化の後期過程である石灰化は、リン酸とカルシウムにより構成されるハイドロキシアパタイト結晶が細胞外基質に沈着、成長することにより進行する。軟骨細胞の分化とともに細胞外無機リン酸濃度は上昇するが、分化の比較的初期の段階から細胞外無機リン酸濃度の上昇が始まる。このことから、細胞外無機リン酸が、軟骨細胞分化の後期過程である石灰化に関与するのみならず、分化初期の軟骨細胞の増殖や分化にも影響を及ぼす可能性が考えられるが、十分な解析はなされていない。

[目的・方法]

初期分化段階にある軟骨細胞の細胞外無機リン酸濃度変化に対する応答性について検討した。軟骨細胞分化の静止期、増殖期、肥大化軟骨細胞を *in vitro* にて再現できるマウス間葉系細胞株 ATDC5 を軟骨細胞分化の細胞モデルとして用いた。通常の細胞培養液中には 1 mM の無機リン酸が含まれるが、sodium phosphate の添加により、細胞外無機リン酸濃度を 10 mM まで上昇させ、細胞外無機リン酸濃度変化に応答して発現が変化する遺伝子群をマイクロアレイにより同定した。また、細胞外無機リン酸濃度変化が細胞内シグナル伝達に与える影響を検討するため、Western blot により蛋白質のリン酸化レベルの変化を検討し、2次元電気泳動を用いてリン酸化状態の変化をきたした分子を同定する事により、初期分化段階にある ATDC5 細胞の細胞外無機リン酸応答性分子機構の解析を試みた。

[結果・考察]

分化初期段階の ATDC5 細胞を 1 mM あるいは 10 mM の細胞外リン酸存在下で 24 時間インキュベートし、mRNA を抽出、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、10 mM の高濃度細胞外無機リン酸刺激により遺伝子発現が増加した遺伝子が 15 個、減少した遺伝子が 98 個同定された。10 mM 細胞外無機リン酸存在下で遺伝子発現が増加したものの中には、Cyclin D1 が含まれていた。また、発現が減少したものの中には、Alkaline phosphatase (ALP) が含まれていた。

さらに、分化初期段階の ATDC5 細胞における細胞外無機リン酸応答性細胞内シグナルの解明を試みた。細胞外無機リン酸濃度を 1 mM から 10 mM に上昇させ、経時的に細胞抽出液を回収し、Western blot によりチロシン、スレ

オニンのリン酸化状態を解析したところ、高濃度（10 mM）細胞外無機リン酸刺激約 30 分後からチロシンのリン酸化の増強をみとめる蛋白質が存在した。2次元電気泳動を用いたリン酸化蛋白質の解析から、リン酸化が増強した主要な蛋白質は ERK1/2 であることが判明した。この ERK1/2 のリン酸化は、細胞外無機リン酸濃度変化に応答して容量依存的に変化した。また、ERK の上流にある MEK の阻害剤である PD98059 の添加により、細胞外無機リン酸刺激による ERK のリン酸化は抑制された。さらに、10 mM 細胞外無機リン酸存在下で認められた Cyclin D1、ALP の遺伝子発現変化は PD98059 の添加により阻害された。以上より、細胞外無機リン酸刺激による遺伝子発現変化は、MEK-ERK 経路を介していることが示された。

さらに、細胞外無機リン酸刺激により誘導される ERK1/2 のリン酸化、遺伝子発現変化におけるⅢ型 Na/Pi 共輸送担体の関与についても検討した。ATDC5 細胞分化過程におけるⅢ型 Na/Pi 共輸送担体 Glvr-1、Ram-1 の発現を解析したところ、いずれも分化の初期から発現がみとめられた。そこで、Ⅲ型 Na/Pi 共輸送担体に対する阻害剤である phosphonoformic acid (PFA) の存在下で 10 mM 細胞外無機リン酸刺激を行ったところ、細胞外無機リン酸によって誘導される ERK1/2 のリン酸化は PFA の濃度に依存して抑制された。またリン酸刺激による Cyclin D1 および ALP の発現変化は、PFA 添加により濃度依存的に阻害された。以上より、Ⅲ型 Na/Pi 共輸送担体が初期分化段階にある軟骨細胞の細胞外無機リン酸応答機構において重要な役割を担うことが示唆された。

[結論]

初期分化段階にある軟骨細胞が、Ⅲ型 Na/Pi 共輸送担体、MEK-ERK 経路を介して細胞外無機リン酸濃度変化に応答性を示す事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

分化初期軟骨細胞における細胞外無機リン酸の作用については殆ど検討されていない。

当該研究では、分化初期軟骨細胞の細胞外無機リン酸濃度変化に対する応答性を検討した。

その結果、細胞外無機リン酸濃度変化が複数の遺伝子発現の変化をもたらし、また、その情報伝達にナトリウム依存性リン酸共輸送担体および MEK-ERK 経路が関与することを示唆する知見を得た。

当該研究は軟骨細胞における細胞外無機リン酸応答性分子機構の解明に重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位に値するものと認める。