



| | |
|--------------|--|
| Title | C1qTNFファミリー分泌蛋白Cartducinの軟骨前駆細胞に対する増殖促進作用 |
| Author(s) | 秋山, 広徳 |
| Citation | 大阪大学, 2008, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49230 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 秋山広徳 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第21944号 |
| 学位授与年月日 | 平成20年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻 |
| 学位論文名 | C1qTNFファミリー分泌蛋白Cartducinの軟骨前駆細胞に対する増殖促進作用 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 古川 惣平 (副査) 教授 豊澤 悟 准教授 新谷 誠康 講師 前田 隆史 |

論文内容の要旨

【研究目的】

骨格発生の様式の一つである軟骨内骨化は、種々の転写因子や成長因子・ホルモンにより調節されている。Cartducinは、軟骨分化に伴い発現が誘導される分泌蛋白であり、脂肪組織由来の分泌蛋白アディポネクチンなどと共に、C1qTNFファミリーに属している。Cartducinの生理機能に関してはいくつかの報告がみられるが、骨格発生における生理的な役割は不明である。本研究では、Cartducinが骨格発生に関わる新しい分泌因子である可能性を明らかにするために、マウス胚発生過程におけるcartducin遺伝子の発現ならびに軟骨前駆細胞培養系におけるCartducinの生理作用を検討した。

【方法・結果】

マウス胚発生過程におけるcartducin遺伝子の発現時期をマウス胎仔(7.5日齢から10.5日齢)よりRNAを抽出しRT-PCR法により調べた。また、発現部位を10.5日齢のマウス胎仔を試料としたホールマウントin situハイブリダイゼーション法により調べた。その結果、cartducin遺伝子の発現は9.5日齢から10.5日齢の間の硬節において認められた。

次に、Cartducinの生理作用を検討するため、まず、組換えCartducinの作製ならびに分析を行った。シグナル配列を除くCartducinをコードするcDNAを組んだ大腸菌発現用ベクターを用いて、N末端にHis6タグを付加した組換え蛋白を大腸菌で発現させ、精製した。組換えCartducinを還元あるいは熱変性を行いゲルエクソートSDS-PAGEに展開したところ、単量体、二量体、三量体が確認された。

軟骨前駆細胞に対するCartducinの影響を調べるため、マウス軟骨前駆細胞株N1511を用いた培養系に組換えCartducinを添加し、DNA合成の測定、細胞数の計測および硫酸化グリコサミノグリカン量の測定を行ったところ、DNA合成の促進ならびに細胞数の増加がCartducinの濃度依存的に認められた。その効果は、10μg/mlのCartducinを添加した場合、コントロールと比較し、DNA合成が約3倍、細胞数が約1.9倍であった。一方、硫酸化グリコサミノグリカン量への影響は認められなかった。

Cartducinの刺激に応答して活性化される細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、分裂促進因子活性化タン

パク質 (MAP) キナーゼ (以下 MAPK) およびフォスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3 キナーゼ)/Akt (以下 PI3K/Akt) 経路についてウエスタンプロット法により検討した。その結果、MAPK 経路では細胞外シグナル制御キナーゼ (以下 ERK) 1/2 が Cartducin の刺激によりリン酸化された。リン酸化型 ERK1/2 は、 $10 \mu \text{g/ml}$ の Cartducin を添加した場合時間依存的に増加し 15 分後にピークとなった。また、刺激後 30 分における Cartducin の濃度依存的な増加も認められた。しかし、c-Jun N 末端キナーゼ (以下 JNK) 1/2 および p38 MAPK はリン酸化されなかった。また、PI3K/Akt 経路では Akt がリン酸化された。リン酸化型 Akt は 15-30 分後にピークとなり、また、Cartducin の濃度依存的な増加も認められた。

さらに、シグナル伝達経路阻害剤の影響を検討するため、各シグナル伝達経路阻害剤で予め処理した N1511 細胞を Cartducin で刺激し、その後 DNA 合成を測定した。その結果、MAPK 経路では ERK1/2 の上流のキナーゼである MAPK/ERK キナーゼ (以下 MEK) 1/2 阻害剤である U0126 ($10 \mu \text{M}$) を添加することにより、Cartducin の N1511 細胞に対する増殖促進作用はブロックされた。一方、JNK1/2 ならびに p38 MAPK 阻害剤を添加しても Cartducin の刺激によって N1511 細胞の DNA 合成は促進された。PI3K/Akt 経路では PI3K 阻害剤である LY294002 ($25 \mu \text{M}$) を添加することにより、Cartducin の N1511 細胞に対する増殖促進作用はブロックされた。

【考察・結論】

本研究の結果、Cartducin は軟骨前駆細胞において発現し、その増殖を ERK1/2 ならびに PI3K/Akt の両シグナル伝達経路を介して促進することが明らかとなった。Cartducin により細胞内シグナル伝達経路が活性化されることや、アディポネクチンなどが特異的受容体をもつことから、軟骨前駆細胞の細胞膜に Cartducin の特異的受容体が存在する可能性が考えられるが、現時点での詳細は不明である。

以上より、Cartducin は骨格発生において成長因子として重要な役割を果たしていることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、C1qTNF ファミリー分泌蛋白 Cartducin の骨格発生における生理作用を検討したものである。その結果、Cartducin は軟骨前駆細胞において発現し、ERK1/2 ならびに PI3K/Akt の両シグナル伝達経路を介して軟骨前駆細胞の増殖を促進することが明らかとなった。また成長因子である Cartducin が骨格発生において重要な役割を果たしていることが示された。

本研究は、骨格発生を制御する分子メカニズムについて新たな知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値すると認める。