OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts
Author(s)	中﨑, 学人
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49836
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【22】

氏名	中崎学人（なかさきまなんど）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 ２２４６２ 号
学位授与年月日	平成20年９月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts （骨芽細胞が分泌するIGF-Iは骨芽細胞に対する遊走活性因子として働く）
論文審査委員	（主査） 教授 吉川 秀樹 （副査） 教授 仲野 徹　教授 大薗 恵一

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

骨格形成や骨折治癒の際，新たな骨形成部位には骨芽細胞やその前駆細胞が動員され，骨形成が進行することが知られており，これまでにPDGFなどの成長因子が骨芽細胞に対して走化性因子として働く事が報告されている．我々は骨折治療および骨再生医療などへの臨床応用を目指し，必要とされる部位への骨芽細胞の運動を促進する因子について検討した．

〔 方法ならびに成績 〕

走化性因子に対する細胞遊走能を定量する系（Boyden Chamber法）を用いて未分化骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞を効率よく移動させる物質のスクリーニングを行い，MC3T3-E1細胞の無血清培養上清がMC3T3-E1自身に対して強い走化性因子として作用する事を見出した．この培養上清を材料として，種々のアフィニティーカラム，ハイドロキシアパタイトカラム，ゲル濾過カラムを用いた液体クロマトグラフィーの手法により目的タンパク質の分離精製を行った．さらに質量分析機を用いて骨芽細胞自身が産生する遊走活性因子としてIGF-Iを同定した．IGF-IはMC3T3-E1細胞に対して，濃度依存性に運動する細胞数を増加させ，IGF-Iの濃度を様々に変化させた実験系（checkerboard assay）では，濃度勾配に従った運動（chemotaxis）を惹起した．IGF-Iはマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞の初代継代細胞に対しても同様の遊走活性を示した．IGF-Iに対する中和抗体存在下では，単層培養した骨芽細胞に作成したwoundの縮小を阻害し，wound辺縁の細胞の運動方向に沿った極性化が遅延していた．IGF-Iの添加では逆にwound縮小の促進が観察された．また IGF-Iは骨芽細胞のフィブロネクチン上における接着，伸展を促進した．イムノブロット法により，骨芽細胞におけるIGF-I刺激によるAkt，ERKのリン酸化および，Racの活性化を確認した．IGF-Iによる細胞運動や単層骨芽細胞におけるwoundの縮小はMEK阻害剤ではなくPI3K阻害剤により阻害され，PI3K経路活性化の重要性が示唆された．そこでIGF-I刺激の下流で活性化したPI3Kにより産生されるホスファチジルイノシトール3リン酸（PI(3,4,5)P3）の時間空間的なダイナミクスの観察を行った． PI(3,4,5)P3の局在を可視化するプローブとしてAkt-PH-GFPを全身性に発現したトランスジェニックマウスから採取した骨芽細胞にIGF-Iを作用させ共焦点顕微鏡で観察したところ，ラフリングした細胞膜周辺への速やかなプローブの集積が観察された．

〔 総 括 〕

IGF-Iは，これまでの報告が示したような骨芽細胞の増殖，分化のみならず，細胞運動，接着，極性化にも影響を与える事が示された．さらに中和抗体を用いた実験から，IGF-Iは骨芽細胞が産生するタンパク質の中でも主要な細胞遊走活性因子として作用する事が示唆された．本研究はIGF-Iが骨再生医療のツールとして利用できる可能性を示唆するものである．

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨芽細胞に対する遊走活性をもつ因子として、クロマトグラフィーの手法を用いて、骨芽細胞の分泌タンパク質中より、IGF-Iを分離同定し、その機能解析を行ったものである。その解析によりIGF-Iは骨芽細胞の細胞運動だけでなく、細胞運動における極性化や、細胞の接着伸展にも促進的に作用することを見出している。また生化学的な解析として、IGF-Iが骨芽細胞内で惹起するシグナル伝達経路についても検討を行い、PI3Kの経路が重要であることを確認している。これらの結果は、IGF-Iが骨形成の初期における骨芽細胞の動員に主要な役割を担っていることを示唆するものである。本論文は、さらにIGF-Iが骨形成を促進的にコントロールするツールとして臨床応用されうることを明らかにしており、優れた学術意義を有するものである。よって学位授与に値するものと考えられる。