

氏名	かわいじゅん 川合 準
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2385号
学位授与の日付	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
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Effects of transforming growth factor- $\beta$ signaling on chondrogenesis in mouse chondrogenic EC cells, ATDC5 (マウス軟骨前駆EC細胞株ATDC5の軟骨初期分化におけるトランスフォーミング増殖因子 $\beta$ シグナルの作用)
論文調査委員	(主査) 教授 開裕司 教授 西川伸一 教授 中村孝志

### 論 文 内 容 の 要 旨

肢芽の骨格形態は軟骨形成のパターンとして表現され、軟骨内骨化によって最終的に骨に置換されるが、軟骨形成開始時期において間充織凝集が重要な役割を果たしていると考えられている。これまで軟骨初期分化の解析は主にニワトリ肢芽由来間充織細胞により行われてきたが、高密度培養を必要とするため間充織凝集のメカニズムの解析には必ずしも適切とはいえなかった。これに対しマウス軟骨前駆EC細胞株ATDC5は、高率に軟骨分化が誘導されるだけでなく、未分化線維芽細胞様細胞から細胞凝集形成を経て軟骨結節形成に至るまでの軟骨内骨化におけるすべての分化段階を再現することができるため、間充織凝集の解析に非常に有用なモデルであるといえる。

トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )は種々の細胞の増殖、分化において重要な生理活性を有する多機能タンパクである。これまでの報告によると、TGF- $\beta$ は*in vivo*でマウス胚軟骨原基の間充織凝集領域に一過性に発現しており、*in vitro*でニワトリあるいはマウス肢芽由来間充織細胞に添加することにより軟骨分化を促進する。そこでTGF- $\beta$ シグナルの間充織凝集過程における機能につき、ATDC5細胞を用いて位相差顕微鏡、アルシアンブルー染色、ノーザンプロットにて検討した。

ATDC5細胞を5%ウシ胎仔血清存在下に培養し、インスリンを添加して軟骨分化を誘導した。TGF- $\beta_1$ 遺伝子が経時的に発現亢進するのに対し、TGF- $\beta_2$ 遺伝子は細胞凝集期に一致して一過性の発現亢進がみられた。

まず内因性TGF- $\beta_2$ シグナルを抑制するため、未分化ATDC5細胞に抗TGF- $\beta_2$ 中和抗体(2, 5 $\mu$ g/ml)を隔日添加したところ、軟骨特異的プロテオグリカン産生が容量依存性に抑制された。次に内因性TGF- $\beta$ シグナルを抑制するため、未分化ATDC5細胞にTGF- $\beta$ タイプIIレセプターのドミナントネガティブミュータントをリポフェクション法にて遺伝子導入したところ、細胞凝集が著明に抑制された。これらよりTGF- $\beta_2$ シグナルがATDC5細胞の軟骨初期分化における細胞凝集形成に重要な因子であることが示唆された。

また軟骨分化過程において、細胞-細胞間相互作用あるいは細胞-マトリックス間相互作用が重要であると考えられているが、これらに関わる因子として細胞接着因子であるN-カドヘリン、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンに注目した。ATDC5細胞分化過程における経時的遺伝子発現において、N-カドヘリン遺伝子は細胞凝集期前の未分化な時期に最も強い発現がみられ、以後経時的に低下していた。これに対してフィブロネクチン遺伝子は細胞凝集期に一致して一過性の発現亢進がみられた。

未分化ATDC5細胞にTGF- $\beta_2$ (0.2, 2, 5ng/ml)(12, 24, 48h)を添加したところ、N-カドヘリン遺伝子は時間容量依存性に発現が低下し、フィブロネクチン遺伝子は時間容量依存性に発現が亢進した。以上よりTGF- $\beta_2$ シグナルは、ATDC5細胞の軟骨初期分化において、N-カドヘリン依存細胞-細胞間相互作用からフィブロネクチン依存細胞-マトリックス間相互作用への転換により細胞凝集形成を誘導し、分化を促進する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

軟骨初期分化では間充織凝集が重要な過程であると考えられている。マウス軟骨前駆 EC 細胞株 ATDC5 は、軟骨内骨化におけるすべての分化段階を再現することができるため、間充織凝集の解析に非常に有用なモデルである。ATDC5 細胞ではトランスフォーミング増殖因子  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) 遺伝子が細胞凝集期に一致して一過性に発現亢進している。そこでその機能につき、位相差顕微鏡、アルシアンブルー染色、ノーザンブロットにて検討した。

内因性 TGF- $\beta_2$  シグナルを抗 TGF- $\beta_2$  中和抗体、TGF- $\beta$  タイプ II レセプターのドミナントネガティブミュータント遺伝子導入により抑制したところ、軟骨分化および細胞凝集が著明に抑制され、TGF- $\beta_2$  シグナルが細胞凝集形成に重要な因子であることが示唆された。

また、ATDC5 細胞では N-カドヘリン遺伝子が細胞凝集期前に、フィブロネクチン遺伝子が細胞凝集期に一致して最も強く発現している。TGF- $\beta_2$  の添加により、N-カドヘリン遺伝子は時間容量依存性に発現が低下、フィブロネクチン遺伝子は時間容量依存性に発現が亢進した。

以上より TGF- $\beta_2$  シグナルは、ATDC5 細胞の軟骨初期分化において、N-カドヘリン依存細胞 - 細胞間相互作用からフィブロネクチン依存細胞 - マトリックス間相互作用への転換により細胞凝集形成を誘導し、分化を促進すると考える。

以上の研究は軟骨初期分化におけるシグナル分子機能の解明に貢献し、軟骨分化の制御に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。