

氏名	なか 仲 　　また 俣 　　たけ 岳 　　はる 晴
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2869 号
学位授与の日付	平成 17 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	In vitro demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53 <sup>-/-</sup> mice (p53 <sup>-/-</sup> マウス由来軟骨細胞株を用いた成長軟骨における細胞間相互作用の再現) (主査)
論文調査委員	教授 瀬原 淳子 教授 開 祐司 教授 塩田 浩平

### 論 文 内 容 の 要 旨

軟骨膜を含む成長軟骨組織は形態及び機能の面から異なる細胞により構成されている。しかし齧歯類であっても軟骨細胞の増殖能は限定されていることより、これまで個々の細胞の機能を *in vitro* で解析することは困難であった。そこで癌抑制遺伝子である p53 遺伝子のノックアウトマウス由来の細胞が分化形質を維持したまま不死化しやすいことを利用して、成長軟骨組織より異なる機能をもつ細胞株を樹立し、それらの間の相互作用を解析することを試みた。

まず p53<sup>-/-</sup> マウス新生仔の肋骨から成長軟骨部を採取し、酵素処理にて細胞を分散し、単層培養を行い、安定した増殖を示す 3 種類の細胞株 (MMR14, MMR17, MMR32) を樹立した。これらのうち MMR14 は遠沈管を用いた三次元培養により Alcian blue 陽性の基質を有する細胞塊を形成した。まず軟骨に関連した基質蛋白及びシグナル関連因子の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。MMR14 と MMR17 は 2 型コラーゲンに加えて 10 型コラーゲン、オステオカルシン、アルカリフォスファターゼ等の石灰化関連遺伝子を発現していた。シグナル関連因子に関しては MMR14 おいて PTHrP 受容体及び Ihh の発現が認められた。一方、MMR32 では石灰化関連遺伝子の発現は低く、デコリン、BMP3 及び PTHrP など、これまで軟骨膜において発現が認められている遺伝子を強く発現していた。PTHrP 及び PTHrP 受容体の発現に関しては、SYBR Green 法による定量的 RT-PCR により前者が MMR32 で、後者が MMR14 に特異的に高発現していることを確認し、更に PTHrP に関しては ELISA 法により MMR32 が培養上清中に分泌していることを確認した。これらの遺伝子発現のプロファイルから MMR14 及び 17 は肥大軟骨細胞層に、MMR32 は軟骨膜組織に由来する細胞である可能性が示唆された。次に単層培養による石灰化結節形成能を解析したところ、MMR14 においてのみ、von Kossa 及び Alizarin red 染色陽性の結節が多数形成された。そこで石灰化結節を指標としてこれらの細胞間の相互作用を culture insert を用いた共培養法により解析したところ、MMR14 の石灰化結節形成能は、MMR17 との共培養では影響を受けなかったが、MMR32 との共培養で著しく抑制された。遺伝子発現の結果から MMR14 の石灰化に関して MMR32 由来の PTHrP が関与している可能性を考慮し、まず MMR14 単独培養に PTHrP を投与したところ、濃度依存性に細胞内 cAMP が増加し、同時に石灰化が抑制された。そこで、MMR32 からの PTHrP シグナルを阻害するために、アンタゴニストとして作用する PTHrP(7-34) あるいは中和抗体を MMR14 と MMR32 の共培養系に添加した。しかし MMR32 による石灰化抑制は解除されず、MMR32 から分泌される PTHrP 以外の石灰化抑制因子の存在を示唆する結果が得られた。

成長軟骨における分化、増殖には細胞間の相互作用が必要であるが、*in vitro* でその機構を解析した実験はない。今回我々が樹立した細胞株の遺伝子発現プロファイルは 130 代以上の継代後も維持されており、共培養を行うことで、成長軟骨における細胞間相互作用を解析するための有用なモデルとなると考えられる。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

軟骨細胞は増殖能が限られているため、成長軟骨組織の個々の細胞の機能を *in vitro* で解析することはこれまで困難とさ

れてきた。

本研究では、癌抑制遺伝子 p53 欠損マウス由来の細胞が分化形質を維持したまま不死化しやすいことを利用し、同マウス新生仔肋骨の成長軟骨から異なる形質をもつ3種類の細胞株 (MMR14, MMR17, MMR32) を樹立した。

RT-PCR 法によりこれらの細胞株の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、それぞれ特徴的な発現パターンを示し、MMR14 及び17は肥大軟骨細胞層に、MMR32 は軟骨膜組織に由来する細胞である可能性が示唆された。

単層培養では MMR14 でのみ石灰化結節が多数形成された。この結節形成は、culture insert を用いた MMR32 との共培養で著しく抑制され、PTHrP の投与によっても濃度依存性に抑制された。PTHrP は MMR32 で、PTHrP 受容体は MMR14 で特異的に発現していることから、MMR32 由来の PTHrP が MMR14 の石灰化を抑制するという機序が考えられたが、両者の共培養系に PTHrP のアンタゴニストあるいは中和抗体を添加しても石灰化抑制は解除されず、MMR32 から分泌される PTHrP 以外の石灰化抑制因子の存在が示唆された。

これらの細胞株の形質は長期継代後も維持されており、成長軟骨における細胞間相互作用を解析するための有用なモデルとなると考えられた。

以上の研究は、内軟骨性骨化機構とそれに関連した各種疾患の病態解明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17年2月18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。