

氏名	ほりぐちまこと 堀 口 誠
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2514 号
学位授与の日付	平成 14 年 5 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	Tumour necrosis factor- α up-regulates the expression of BMP-4 mRNA but inhibits chondrogenesis in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5 (腫瘍壊死因子 α はマウス EC 細胞株 ATDC5 の骨形成因子 4 遺伝子の発現を増幅するが軟骨形成は抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教授 野田 亮 教授 開 祐 示 教授 中村 孝志

論 文 内 容 の 要 旨

TNF- α は、関節炎において、滑膜および関節軟骨から分泌される代表的な炎症性サイトカインの一つである。関節炎においては、TNF- α は関節軟骨に対して直接、間接的に作用し、軟骨基質の破壊をもたらす。特に、慢性関節リウマチにおいては関節軟骨破壊後の修復機転も抑制されており、TNF- α が未分化間葉系細胞の増殖分化に始まる関節軟骨の修復機転を何らかの機序で抑制しているものと考えられる。

骨形成因子である BMP-4 は未分化の間葉系細胞に発現しており、骨格形成においては軟骨形成を調節し、関節軟骨の修復過程にも重要な役割を果たしていると考えられている。

軟骨分化を分子生物学的手法を用いて解析する適切な実験系が存在しなかったため、TNF- α と軟骨の発生、分化に関する研究の報告は見られない。本研究では、クローン化マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用い、TNF- α の影響を軟骨形成と BMP-4 の遺伝子発現を中心に解析を行った。

未分化 ATDC5 細胞に TNF- α を 10ng/ml 添加することにより位相差顕微鏡では細胞凝集と軟骨結節形成の抑制が認められ、アルシアンブルーによる軟骨特異的プロテオグリカン蓄積量の検討では、88.5% の抑制が認められた。そこで、 $[^3\text{H}]$ チミジンの DNA への取り込みを測定することにより、TNF- α の細胞増殖活性への効果を調べた。10ng/ml の TNF- α を添加することにより 55% の増加が認められた。これらの結果は、TNF- α は軟骨形成を抑制するが、軟骨前駆細胞の供給を増加させることを示唆した。

ATDC5 細胞には内因性の BMP-4 mRNA の発現が認められている。そして、BMP-4 が軟骨形成を刺激し、内因性の BMP-4/BMPR-IA シグナリングが細胞分化に大きな役割を果たしていることが分かっている。そこで、TNF- α の BMP-4 mRNA の発現に対する影響をノーザンプロットによって解析を行った。未分化 ATDC5 細胞に TNF- α を添加した結果、BMP-4 mRNA の発現は時間、用量依存性に増幅した。BMP-4 が ATDC5 細胞の初期分化を促進することを確認する為に、未分化 ATDC5 細胞に BMP-4 を添加し、軟骨形成のマーカー遺伝子であるタイプ II コラーゲンの mRNA の発現を調べた。その結果、遺伝子発現は用量依存性に増幅された。しかし、1000ng/ml BMP-4 と同時に TNF- α を添加すると、この刺激作用は用量依存性に抑制された。逆に、10ng/ml の TNF- α を添加することによるタイプ II コラーゲン mRNA の発現の抑制作用は、BMP-4 の添加によっても逆転することはできなかった。また、TNF- α の添加は BMPR-IA の mRNA には影響を与えなかった。

以上のことから、TNF- α は ATDC5 細胞の軟骨形成を抑制する。そしてそれは、BMP-4 遺伝子の発現抑制によってではない。むしろ、BMP-4 遺伝子の発現は増幅することを示した。そして、その抑制作用は BMP-4 シグナリングの細胞分化刺激作用にも対抗することを示唆した。今後、TNF- α 添加による BMP-4 遺伝子の発現増幅の機序とその意味を解明し、内軟骨性骨化を制御する局所因子のネットワークの解明に至ることになれば、現在再生不可能である関節軟骨の修復も可能

になるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

TNF- α は慢性関節リウマチ等の関節炎において、関節軟骨の変性、破壊に関与しているが、その修復機転、すなわち、軟骨形成に対する影響については良く知られていない。

本研究は、クローン化マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用い、TNF- α の影響を、細胞分化と BMP-4 の遺伝子発現を中心に解析したものである。

未分化 ATDC5 細胞に TNF- α を 10ng/ml 添加すると、軟骨分化が抑制され、DNA 合成が促進される事が見出された。

ATDC5 細胞では、内因性の BMP-4/type IA-BMP receptor signaling が軟骨分化に大きな役割を果たすことが知られている。そこで、未分化 ATDC5 細胞に TNF- α を添加し、ノーザンブロット分析を行ったところ、BMP-4 mRNA の発現には、むしろ時間および用量依存性の増加が認められた。しかし、TNF- α は BMP-4 添加による軟骨分化誘導作用を用量依存性に抑制し、また、TNF- α 添加による軟骨分化抑制作用を BMP-4 によって打ち消すこともできなかった。

以上の研究は、炎症性サイトカインの軟骨修復に対する影響の解明に貢献するとことが多い。

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14年3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。