

氏 名	み うら まさ こ 三 浦 晶 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2464 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Thyroid Hormones Promote Chondrocyte Differentiation in Mouse ATDC5 Cells and Stimulate Endochondral Ossification in Fetal Mouse Tibias Through Iodothyronine Deiodinases in the Growth Plate. (甲状腺ホルモンは成長板に存在する甲状腺ホルモン脱ヨード酵素を介してマウス ATDC5 細胞の軟骨細胞分化および胎仔マウス脛骨の内軟骨性骨化を促進する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 開 祐 司 教 授 中 村 孝 志 教 授 中 尾 一 和

論 文 内 容 の 要 旨

先天性甲状腺ホルモン欠乏症であるクレチン症は、内軟骨性骨化の障害により著明な低身長を来すが、内軟骨性骨化における甲状腺ホルモンの役割及び成長板局所での甲状腺ホルモン活性化機構については不明である。

内軟骨性骨化の過程では、前駆軟骨細胞が分裂を繰り返した後、凝集し軟骨細胞に分化する(軟骨初期分化)。軟骨細胞は細胞外基質を産生しながら増殖し、分化成熟する。さらに、軟骨細胞が肥大化し、細胞外基質が石灰化し(軟骨後期分化)、最終的に骨組織に置換される。ATDC5 細胞は軟骨初期分化から後期分化に至る過程を *in vitro* で再現出来る前駆軟骨細胞株である。本研究では ATDC5 細胞の分化に及ぼす甲状腺ホルモンの作用について検討した。ATDC5 細胞に 10^{-8}M 、 10^{-6}M トリヨードサイロニン (T3) を11日間及び21日間添加し、成長板軟骨の分化マーカーの発現をノザンプロットにより解析した。T3 添加11日目では成長板の静止層・増殖層マーカーであるⅡ型コラーゲン、前肥大化層マーカーである PTH/PTHrP 受容体の発現は抑制されたが、肥大化層マーカーである X 型コラーゲン、石灰化層マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン (OPN) の発現は増強していた。21日目ではさらに X 型コラーゲンも抑制されたが、ALP、OPN は11日目同様増強していた。形態的には、5 週間の T3 添加により石灰化の促進がアリザリンレッド染色にて確認された。一方、 10^{-10}M - 10^{-8}M T3 を48時間添加したところ、いずれの分化マーカーの発現も増強した。さらに 10^{-8}M - 10^{-5}M サイロキシニン (T4) を48時間添加したところ、後期分化マーカー (X 型コラーゲン、ALP、OPN) が増強した。細胞増殖マーカーである H4 ヒストンの発現には T3、T4 とも明らかな変化を与えなかった。以上より、T3 は軟骨初期分化から後期分化に至るまで、T4 は後期分化において、ATDC5 細胞の分化を促進すると考えられた。

次にマウス胎仔脛骨を6日間培養し、成長板伸長に及ぼす甲状腺ホルモンの作用を検討した。 10^{-10}M 、 10^{-9}M T3、 10^{-9}M T4 添加群で成長板の伸長が促進され、肥大化層の増大と二次骨化中心の発達が認められた。さらに T4 → T3 活性化酵素阻害剤イオパノ酸の添加により、T4 による伸長促進はほぼ完全に抑制された。

T4 は T3 へ変換されて初めて活性を持つことから、軟骨後期分化における T4 から T3 への活性化機構の存在が示唆された。そこで、マウス脛骨、ATDC5 細胞における甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の3つのアイソザイム (D1, D2, D3) の発現を RT-PCR 法により検討した。マウス脛骨では D1, D2 の発現を認めた。ATDC5 細胞では D1 は培養期間を通じて発現していたのに対し、D2 は培養3週間で発現し始め、6週間まで発現が増強した。D3 の発現はいずれにおいても認められなかった。さらに ^{125}I 標識 reverse T3 からの I^- の遊離を指標として D1, D2 活性を測定した。マウス胎仔脛骨において 5'-脱ヨード酵素 (5'-D) 活性を認めたが、6日間の培養期間中後期になるに従い酵素活性が上昇する傾向が見られた。ATDC5 細胞では培養期間を通じて 5'-D 活性が確認された。D1 の阻害剤であるプロピルチオウラシルにより 5'-D 活性が影響されなかったことから、この酵素活性は主に D2 によるものと考えられた。甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$, $\beta 1$ はマウス脛

骨, ATDC5 細胞ともに発現しており, ATDC5 細胞の分化段階による変化を認めなかった。

以上より甲状腺ホルモンは軟骨分化を促進することにより成長板を伸長することが示された。また, D2 を介した成長板局所での甲状腺ホルモンの活性化が軟骨後期分化に関与していることが示唆された。本研究は, クレチン症で内軟骨性骨化が障害される機序を理解する上で有用と考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究では, 内軟骨性骨化における甲状腺ホルモンの作用機構について検討した。

トリヨードサイロニン (T3) は, 前駆軟骨細胞株 ATDC5 において初期分化マーカー (Ⅱ型コラーゲン, PTH/PTHrP 受容体), 後期分化マーカー (X 型コラーゲン, アルカリフォスファターゼ, オステオポンチン) いずれの発現も増強し, 石灰化を促進した。一方プロホルモンであるサイロキシニン (T4) は, 後期分化マーカーの発現のみ増強した。

マウス胎仔脛骨の器官培養では, T3, T4 はともに各々の至適濃度において成長板の伸長促進, 肥大化細胞層の増大, 二次骨化中心の発達を示した。T4 による伸長促進は, 脱ヨード酵素阻害剤イオパノ酸により抑制された。

ATDC5, マウス脛骨の両者で, T4 を T3 へと活性化する脱ヨード酵素 D1, D2 アイソザイムの発現を認めた。局所での活性化に重要な D2 は, ATDC5 では培養 3 週以降にのみ発現を認めた。D2 活性についても ATDC5, マウス胎仔脛骨の両者で認められ, 胎仔脛骨では培養期間の後期になる程酵素活性が上昇した。

以上より, 甲状腺ホルモンは D2 による局所での活性化を介して軟骨細胞分化を促進し, 成長板伸長を促すことが示された。さらに内軟骨性骨化の後期における甲状腺ホルモンの活性化の重要性が示唆された。

以上の研究は, 内軟骨性骨化における甲状腺ホルモンの作用機構の解明に貢献し, 先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症) で低身長を来す機序を理解する上で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14年2月7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。