

氏 名	伊 藤 宣
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2370 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	Coordination among growth/differentiation factors on chondrogenic differentiation in mouse EC cells, ATDC5 (マウス EC 細胞株 ATDC5 の軟骨分化における成長因子の協調作用)
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

成長軟骨は四肢の形成において中心的な役割を果たしている。TGF- β superfamily をはじめとする種々の因子は、この軟骨細胞の分化過程に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし軟骨細胞分化、特に軟骨細胞肥大化のシグナルネットワークはまだ充分解明されたとはいえない。我々は、軟骨分化の過程を再現できるマウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いて、BMP, BMP の dominant inhibitor である noggin, PTHrP の役割について遺伝子発現を中心に解析を行った。

ATDC5 細胞から抽出した RNA を用いて RT-PCR 法でマウス noggin の cDNA を cloning し、COS-7 細胞に lipofection 法で noggin 蛋白を発現させ、48 時間後に上清を回収した。ATDC5 細胞を播種して軟骨分化を誘導し、21 日間培養した後種々の因子を添加し RNA 抽出を行った。それぞれにつき、Northern blot により type X collagen などの遺伝子発現を検討した。

BMP-4, BMP-6 添加では、type X collagen 遺伝子発現の上昇がみられた。また、BMP-6 添加は BMP-4 遺伝子発現を抑制し、BMP-6 遺伝子発現を促進した。BMP-4 添加でも同様の結果であった。すなわち BMP-4 および BMP-6 は軟骨細胞肥大化に促進的で、BMP signal により BMP-4 は抑制的に、BMP-6 は促進的に遺伝子制御を受けていることが示唆される。

noggin 蛋白を発現させた conditioned medium の添加では、type X collagen の遺伝子発現が低下した。この遺伝子発現の低下は BMP-4 の添加により回復した。更に BMP-4 添加で noggin 遺伝子の発現が上昇した。すなわち noggin は軟骨細胞肥大化に抑制的で、BMP family と協調性を保ちながら肥大化を制御していることが示唆される。

一方 PTHrP 添加では type X collagen 遺伝子発現が低下した。この遺伝子発現の低下は BMP-6 添加にて回復した。PTHrP 添加は BMP-4, BMP-6 の遺伝子発現を抑制した。更にこのうち、PTHrP による BMP-4 遺伝子発現の抑制について細胞内シグナルを検討した。

分化した ATDC5 細胞に PTHrP を添加すると、cAMP 量および PKA 活性が有意に上昇した。次に ATDC5 細胞に dibutyl cAMP を添加すると、BMP-4 の遺伝子発現が低下した。それに対し PTHrP に加え PKA 阻害剤である H-89 を添加したところ、PTHrP による BMP-4 遺伝子発現の低下が H-89 の濃度依存性に回復した。そして PTHrP と転写阻害剤である actinomycin D を同時に添加すると、PTHrP による BMP-4 遺伝子発現の低下が部分的に阻害された。以上より PTHrP は ATDC5 細胞において、BMP4 の遺伝子発現を cAMP/PKA のシグナルを介して転写レベルで抑制すると考えられる。すなわち PTHrP は軟骨細胞肥大化に抑制的で、BMP と協調しながらその分化を司っていると考えられる。

以上のことから ATDC5 細胞の軟骨肥大化において、種々の因子が協調性を保ちながら分化を制御していると考ええる。そしてこれらの知見をもとに、ATDC5 細胞を用いて differential display 法、suppression subtractive hybridization 法などにより軟骨細胞分化に重要な新規遺伝子の cloning およびその機能解析へと発展させうる。

論文審査の結果の要旨

成長軟骨は四肢の形成において中心的な役割を果たしている。しかし軟骨細胞分化、特に軟骨細胞肥大化のシグナルネットワークはまだ充分解明されたとはいえない。申請者は、軟骨分化の過程を再現できるマウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いて、BMP、BMP の dominant inhibitor である noggin, PTHrP の役割について遺伝子発現を中心に解析を行った。

ATDC5 細胞を播種して軟骨分化を誘導し、種々の因子を添加し、Northern blot により type X collagen などの遺伝子発現を検討した。

BMP-4, BMP-6 添加では、type X collagen 遺伝子発現の上昇がみられ、PTHrP の添加および noggin 蛋白を発現させた conditioned medium の添加では、type X collagen の遺伝子発現が低下した。すなわち BMP-4 および BMP-6 は軟骨細胞肥大化に促進的で、PTHrP および noggin は抑制的であることが示唆される。

また、BMP-6, BMP-4 添加は BMP-4 遺伝子発現を抑制し、BMP-6 遺伝子発現を促進した。また BMP-4 添加で noggin 遺伝子の発現が上昇した。更に PTHrP 添加は BMP-4, BMP-6 の遺伝子発現を抑制した。PTHrP 添加は cAMP 量、PKA 活性を上昇させ、cAMP は BMP-4 の遺伝子発現を低下させた。

以上のことから ATDC5細胞の軟骨細胞肥大化において、種々の因子が協調性を保ちながら分化を制御していると考ええる。

以上の研究は軟骨分化のシグナルネットワークの解明に貢献し、軟骨分化の制御へ向けて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。