

氏名	吉 道 玄
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2314 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through p38 mitogen activated protein kinase(p38 MAPK),and proliferation through p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase(ERK) (CTGF/Hcs24 は p38 mitogen activated protein kinase(p38 MAPK)を介して軟骨細胞分化を誘導し, p44/42 MAPK/extracellular- signal regulated kinase(ERK)を介して軟骨細胞増殖を誘導する。)
論文審査委員	教授 福井 一博 教授 滝川 正春 教授 杉本 朋貞

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

結合組織成長因子connective tissue growth factor (CTGF)は線維芽細胞に対する増殖、遊走促進作用を有する成長因子としてヒト臍帯静脈血管内皮細胞からクローニングされた成長因子である。一方、Nakanishiらはヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株HCS-2/8より軟骨細胞特異的に発現している遺伝子の一つとしてクローニングした*hcs24*遺伝子がCTGFをコードしていることを見出した。このCTGF/Hcs24は*in vivo*において肥大軟骨細胞特異的に発現しており、軟骨細胞に対して増殖、分化から成熟まですべての過程を促進し、さらに血管新生を促進する多機能成長因子と考えている。このCTGF/Hcs24の多機能性を理解するためにはCTGF/Hcs24のシグナル伝達機構を明らかにすることが重要であるが、これに関しては今日まで殆ど報告がない。そこで本研究ではCTGF/Hcs24の軟骨細胞増殖、分化促進作用と、代表的なシグナル伝達経路であるMitogen Activated Protein (MAP) キナーゼ経路との関わりをMAPK 阻害剤を用いることで検討した。

【材料と方法】

- I. 細胞培養：HCS-2/8細胞は10%FBSを含むDMEM中で37℃、5% CO₂気相下にて培養した。ウサギ肋軟骨初代培養細胞（RGC細胞）は生後4週齢の雄性ニュージーランドホワイト種ウサギ（体重300-500g）の肋軟骨より、Takigawaらの方法に従い分離した。分離した軟骨細胞は10%FBS及び50 μg/mlの塩酸カナマイシンを含むαMEM中で培養した。
- II. ルシフェラーゼアッセイ：HCS-2/8細胞に、ets-like gene (Eik)-1あるいはnuclear activating transcription factor (Atf)-2発現ベクターとホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーターベクターをcotransfectionし、組換えCTGF/Hcs24 (rCTGF/Hcs24) を添加してそのリン酸化活性を測定した。導入効率の補正にはTKプロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだpRL-TKを導入することで内部標準とした。
- III. ウェスタンブロッティング：HCS-2/8細胞をコンフルエントまで培養し、rCTGF/Hcs24を添加して経時的に細胞を回収し、抗ERK、抗active-ERK、抗p38 MAPK、抗active-p38

MAPK抗体によりウエスタンブロットをおこなった。

IV. DNA合成、プロテオグリカン合成：DNA合成は、 ^3H チミジンの取り込みを指標とし、プロテオグリカン合成は ^{35}S 硫酸のCPC沈澱画分への取込みを指標としてCTGF/Hcs24の作用とMAPK阻害剤の影響を検討した。

【結果】

I. HCS-2/8細胞を用いルシフェラーゼアッセイによりリン酸化活性を測定したところ、rCTGF/Hcs24添加後、EIk-1のリン酸化活性は約5倍上昇し、Atf-2のリン酸化活性は約2倍上昇することが明らかとなった。又、EIk-1のリン酸化活性はMEK1/2阻害剤、Atf-2のリン酸化活性はp38 MAPK阻害剤により濃度依存的に阻害された。

II. HCS-2/8細胞にrCTGF/Hcs24添加後ウエスタンブロッティングによりリン酸化ERK量を測定したところ、10分から30分で明らかな増加が見られた。同様に10分及び15分後にリン酸化p38 MAPKが増加した。又、リン酸化ERKの増加はMEK1/2阻害剤により阻害されるが、p38 MAPK阻害剤では影響がなく、同様にリン酸化p38 MAPKの増加はp38 MAPK阻害剤で阻害され、MEK1/2阻害剤では影響がなかった。

III. HCS-2/8細胞において、rCTGF/Hcs24により増加したDNA合成はMEK1/2阻害剤により濃度依存的に著しく阻害され、MEK1/2阻害剤単独でも阻害され、p38 MAPK阻害剤でも部分的に阻害された。RGCにおいては、MEK1/2阻害剤によりCTGF/Hcs24により増加したDNA合成は阻害され、MEK1/2阻害剤単独では阻害されなかった。p38 MAPK阻害剤では阻害されなかった。

IV. MEK1/2阻害剤はHCS-2/8細胞、RGC細胞のどちらにおいても、rCTGF/Hcs24によって増加したプロテオグリカン合成には影響がなく、HCS-2/8細胞においてp38MAPK阻害剤により濃度依存的に阻害され、RGC細胞においてもrCTGF/Hcs24によるプロテオグリカン合成の上昇が阻害された。

【結論】

以上の結果より、rCTGF/Hcs24は軟骨細胞においてERK-EIk-1経路及びp38 MAPK-Atf-2経路の2つの主要なMAPK経路を活性化すること、又軟骨細胞増殖促進作用は主にERKの経路を介し、軟骨細胞分化促進作用はp38 MAPK経路を介していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

結合組織成長因子(connective tissue growth factor: CTGF/Hcs24)は、生理的には肥大軟骨細胞により特異的に産生される成長因子で、線維芽細胞の増殖と遊走、軟骨細胞や骨芽細胞の増殖と分化を促進し、血管新生促進作用を有するなどその機能は多彩である。しかし、この多彩な作用を仲介する細胞内シグナル伝達機構に関してはほとんど研究がなされていない。そこで、本研究では軟骨細胞を用いて、CTGF/Hcs24の増殖および分化促進作用と、代表的なシグナル伝達経路であるmitogen activated protein (MAP)キナーゼカスケードとの関連について検討した。

その結果、CTGF/Hcs24は軟骨細胞のERK、p38 MAPKの両方のリン酸化を増加させること、MEK1/2阻害剤はCTGF/Hcs24によるERKのリン酸化を阻害するがp38 MAPKのリン酸化は阻害しないこと、一方、p38 MAPK阻害剤はCTGF/Hcs24によるp38 MAPKのリン酸化を阻害するがERKのリン酸化は阻害しないことがわかった。さらにCTGF/Hcs24の軟骨細胞におけるDNA合成促進作用はMEK1/2阻害剤により著しく阻害され、プロテオグリカン合成促進作用はp38 MAPK阻害剤により阻害されることがわかった。

従って、CTGF/Hcs24の細胞内シグナル伝達にはERK-EIk-1経路及びp38 MAPK-Atf-2経路のMAPK経路が関与すること、その軟骨細胞増殖促進作用は主にERKの経路を介し、軟骨細胞分化促進作用はp38 MAPK経路を介していることが示唆された。

本研究はCTGF/Hcs24の細胞内シグナル伝達機構の研究に端緒を開いた点、又、その多機能作用はそれぞれ別経路により仲介されていることを示唆した点で極めて斬新な研究であり、本申請論文は学位論文としての価値を有すると認めた。