

学位申請論文

西田 崇

①

主論文題名

軟骨由来の成長因子Hcs24/CTGFの特異的受容体を介する
軟骨細胞増殖・分化促進作用

学位申請者

岡山大学大学院歯学研究科歯科保存学第二講座

西田 崇

Stimulation of proliferation and differentiation of chondrocytes by
cartilage-derived growth factor Hcs24/CTGF *via* its specific receptors

Takashi Nishida

指導教授

岡山大学歯学部口腔生化学講座

滝川正春教授

主任教授

岡山大学歯学部歯科保存学第二講座

村山洋二教授

目次

- I. 緒言
- II. 材料と方法
 - 1. 試薬
 - 2. 細胞と培養
 - 3. HCS-2/8細胞からのconnective tissue growth factor (CTGF)の精製
 - 4. DNA合成能の測定
 - 5. 細胞数の測定
 - 6. プロテオグリカン合成能の測定
 - 7. アルカリホスファターゼ(ALPase)活性の測定
 - 8. ウェスタンブロット
 - 9. RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)
 - 10. rCTGFのヨード標識
 - 11. 結合試験
 - 12. 架橋実験
 - 13. 免疫沈降
 - 14. リン酸化実験
 - 15. 統計学的解析
- III. 結果
 - 1. CTGFの精製とDNA合成促進作用
 - 2. 軟骨細胞のDNA合成に及ぼす組換えCTGFタンパク質の影響
 - 3. 軟骨細胞のプロテオグリカン合成およびALPase活性に及ぼすrCTGFタンパク質の影響
 - 4. HCS-2/8細胞におけるPDGF受容体遺伝子およびタンパク質の発現
 - 5. HCS-2/8細胞に対する¹²⁵I-rCTGFの結合
 - 6. HCS-2/8細胞における¹²⁵I-rCTGF・受容体複合体の同定
 - 7. HCS-2/8細胞のCTGF受容体のリン酸化実験
 - 8. rabbit growth cartilage (RGC) 細胞の分化に伴うCTGF受容体レベルの変動
- IV. 考察
- V. 結論
- VI. 謝辞
- VII. 文献
- VIII. 表の説明
- IX. 図の説明

1. 緒 言

骨は、膜性骨化と内軟骨性骨化の2つの様式により形成されるが、四肢の長管骨の形成や骨折の修復過程等にみられるように、身体の大半の骨は内軟骨性骨化により形成される。この内軟骨性骨化において、静止軟骨細胞から分化した成長軟骨細胞は増殖し、成熟して、II型コラーゲンやプロテオグリカンなどの軟骨特異的基質を大量に産生する^{1, 2)}。次いで、この成熟した成長軟骨細胞が肥大化して最終分化すると共に周囲の基質は石灰化して、この石灰化した軟骨細胞層に骨側から血管が侵入し最終的に軟骨は骨に置換する^{1, 2)}。したがって、内軟骨性骨化を理解する上で軟骨細胞の増殖と分化の制御機構を理解することは不可欠であり、多くの研究が行われてきた。その結果、軟骨細胞の増殖と分化機能の発現には多くの因子が関与していることが明らかとなった。このような因子には、成長ホルモン、副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone ; PTH)、カルシトニン、活性型ビタミンD₃などの血液循環を介するホルモン類やレチノイン酸、アスコルビン酸などのビタミン類の他に軟骨細胞自身が産生する成長因子類が知られている。軟骨細胞自身が産生する成長因子には、インスリン様成長因子(insulin-like growth factors ; IGFs)や塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor ; bFGF)あるいは、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; TGF- β) などが知られているが^{2, 3)}、これらの成長因子はすべて内軟骨性骨化を部分的に促進するのみで、軟骨細胞の増殖から分化、成熟、さらには骨への転化まで内軟骨性骨化全般にわたって幅広く働く因子は見い出されていなかった。Nakanishiら^{4, 5)}は、このような内軟骨性骨化全般にわたって、必須の因子を単離する目的で、軟骨細胞系の細胞と骨芽細胞系の細胞との間でdifferential display-PCR法を行い、肥大軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子*hcs24*を単離し、この遺伝子が結合組織成長因子(connective tissue growth factor ; CTGF)をコードしていることを明らかにした。

CTGFは1991年にBradhamら⁶⁾により初めて報告されたシステイン残基に富んだヘパリン結合性のタンパク質である。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞のcDNAライブラリーから、抗血小板由来増殖因子(Platelet-derived growth factor ; PDGF)

抗体でスクリーニングすることにより、CTGFはクローニングされた⁶⁾。CTGFは349個のアミノ酸からなり、4つのドメイン構造を有している。すなわち、IGF結合タンパク質様構造、von Willebrand 因子 タイプ C リピート配列、トロンボスポンジン タイプ I リピート配列そしてC末端部分である⁷⁾。この配列のうち、39個がシステイン残基である⁷⁾。CTGFは、CCN(*ctgf*, *cef-10/cyr61*, *nov*)ファミリーというヒトからショウジョウバエにわたって広く存在するimmediate early gene の遺伝子ファミリーに属しており、*ctgf*と他のメンバーとのアミノ酸配列の相同性は約60%、システイン残基の位置はすべて保存されている⁷⁾。CTGFは、NRKやNIH3T3などの線維芽細胞に対して走化作用、増殖促進作用を示すこと^{6, 8)}、線維芽細胞における*ctgf*の発現がTGF- β で誘導されること⁸⁾、創傷治癒過程にはTGF- β 遺伝子の発現に遅れて*ctgf*の発現が見られることから⁹⁾、組織修復過程でTGF- β の作用を仲介する可能性⁹⁾や、さらに、線維化との関連も示唆されている⁹⁻¹⁴⁾。志茂¹⁵⁾は、Hcs24/CTGFが内軟骨性骨化の最終段階での骨側から軟骨側への血管を誘導する因子として機能している可能性を示唆した。

受容体に関しては、Bradhamら⁶⁾は血管内皮細胞から部分精製したCTGFをNIH3T3細胞の細胞表面に結合させ、この細胞表面のCTGFの結合がPDGFを添加することにより競合的に阻害されることを抗PDGF抗体を用いたWestern blot法で示した。また、Kikuchiら¹⁶⁾は線維化した線維芽細胞でCTGFとPDGF α 型受容体のmRNAが共に発現上昇していることからCTGFとPDGF α 型受容体が相互作用している可能性を示唆した。しかし、これらの報告は共にCTGFがPDGF受容体に結合する可能性を間接的に示しているにすぎず、直接的にCTGFがPDGF受容体に結合するのか、あるいはCTGFが特異的な受容体に結合するのかを明らかにした報告は未だにない。

近年、軟骨細胞の各分化段階で、各種成長因子受容体の発現が変動することが明らかになってきた。すなわち、PTHとIGFsの受容体数は成熟期で最も多く肥大型に入ると減少し^{3, 17-19)}、bFGF受容体レベルは増殖期で最も高く、成熟期にやや低下して肥大化するとほとんど消失することが報告されている^{3, 20)}。これらの結果は、軟骨細胞の分化が特定の成長因子の受容体の変動を介して調節されていることを示唆するものであり、軟骨細胞の分化に伴って、CTGF受容体がどのように変動するの

かを解析することはCTGFの軟骨細胞に対する作用を理解する上で重要である。

そこで、本研究では、1989年にTaki gawaら²¹⁻²⁴⁾によってヒト分化型軟骨肉腫より樹立され、軟骨細胞の分化機能を良好に維持し、なおかつ、CTGFを高発現しているクローン化軟骨細胞様培養細胞株HCS-2/8細胞とウサギ肋軟骨から分離した成長軟骨細胞(rabbit growth cartilage cells ; RGC 細胞)を用いて、軟骨細胞に対するCTGFの直接的な作用について解析すると共に、CTGFが受容体に結合する際にPDGF受容体に結合するのか、あるいは特異的な受容体に結合するのかを組換えCTGFタンパク質を用いて、より直接的かつ詳細に解析した。また、軟骨細胞の分化に伴って、CTGF受容体レベルがどのように変動するのかについても解析した。本研究の結果、CTGFはPDGF受容体に結合するのではなく、CTGFに特異的な受容体に結合し、軟骨細胞の増殖および分化を調節することで内軟骨性骨化全体を促進する重要な成長因子であることが明らかとなった。また、CTGF受容体レベルは軟骨細胞が分化するに伴って変動することが明らかとなった。

II. 材料と方法

1. 試薬

組換えCTGFタンパク質(rCTGF)および抗CTGF抗血清は志茂¹⁵⁾の方法に準じて作製した。ヒト血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor ; PDGF)-BBホモダイマーはGenzyme社(Cambridge, MA, USA)から、bFGFは R&D systems社(Minneapolis, MN, USA)から、抗PDGF受容体β型抗血清はUpstate Biotechnonology社(Lake Placid, NY, USA)から購入した。組換えヒトインターロイキン-1β(IL-1β)は大塚薬品工業(徳島)より供与された。ウシ胎仔血清(FBS)はCancea社(Rexdale, Ont., Canada)から、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)は日水製薬(東京)から、アルファ変法イーグル培地(αMEM)はICN Biomedicals社(Costa Mesa, CA, USA)から購入した。EDTA、コラゲナーゼおよび塩化セチルピリジニウム(CPC)は和光純薬(大阪)から、トリプシンはDifco Laboratories社(Detroit, MI, USA)およびナカライテスク(京都)から購入した。コラーゲン(cell

matrix type I-P)は新田ゼラチン社(大阪)から、塩酸カナマイシンは明治製菓(東京)から、トリパンブルーはMerck社 (Darmstadt, Germany)から購入し、MAb Trap GII, PD-10カラム, CNBr-セファロース4BはPharmacia Biotech社 (Uppsala, Sweden)から、ウシ血清アルブミン(BSA), nitro blue tetrazolium chloride (NBT), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), コンドロイチン硫酸はSigma社 (St. Louis, MO, USA)から購入した。 $[^3\text{H}]$ チミジン, $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸はAmersham社(Aylesbury, UK)から、 Na^{125}I はLife Science社 (Boston, MA, USA)から、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸は日本アイソトープ協会(東京)から購入した。固形シンチレーション(MultiLexTMA)はWallac社(Oy Turku, Finland)から、アクチナーゼEは科研製薬(東京)から、パラニトロフェニルリン酸2ナトリウム(pNPP)およびパラニトロフェノール (pNP)は石津製薬(大阪)から購入した。BCAタンパク定量キットおよびIodogen, disuccinimidyl suberate(DSS)はPIERCE社(Rockford, IL, USA)から、Pico Green dsDNA定量キットはMolecular Probes社(Eugene, OR, USA)から、GeneAmp RNA PCRキットはPerkin-Elmer社(Branford, NJ, USA)から購入した。polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜, アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体はBio-Rad 社(Hercules, CA, USA)から、TRIzol 試薬およびリン酸不含DMEMはGibco社(Grand Island, NY, USA)から、DNase IはPromega社(Madison, WI, USA)から購入した。

2. 細胞と培養

ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞株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²⁵⁾の方法に従い分離した。すなわち、肋軟骨・骨移行部から成長軟骨を採取し、細切後、0.1%EDTA、次に0.1%トリプシン、さらに0.15%コラゲナーゼで処理後、孔径120 μm のナイロンフィルター(NBC工業、東京)で濾過して、軟骨細胞を分離した。分離した軟骨細胞は50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のcell matrix type I-Pでコートしたプレートまたはディッシュに播種し、10%FBSおよび50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の塩酸カナマイシンを含む α MEM中で培養した。

3. HCS-2/8細胞からのCTGFタンパク質の精製

底面積 225 cm²の細胞培養用フラスコ(Costar社, Cambridge, MA, USA)、7個にHCS-2/8細胞を4 x10⁴/cm²の密度で播種し、10% FBS含有DMEM培地で培養した。コンフルエントに達した時点で細胞層をphosphate buffered saline (PBS)で1回洗浄した後、細胞を10mlのPBSで回収、ホモジナイズ後、1,000x gで10分間遠心して残渣を除去し、その上清を10,000x gで15分間遠心した。次いで、その上清を100,000x gで90分間超遠心し、その上清を試料とした。ウサギに免疫して得た抗CTGF抗血清¹⁵⁾は、MAb Trap GIIでIgG画分まで精製し、CNBr-セファロース4Bにカップリングして、アフィニティーカラムを作製した。上記試料を4℃で一晩、アフィニティーカラムに吸着させ、PBSで洗浄後、0.1Mクエン酸緩衝液(pH2.5)で溶出し、溶出試料をSDS-PAGE後、銀染色し、その純度を確認した。精製したCTGFタンパク質の定量は、BSAを標準物質として、バンドの濃さをビデオデンストメーター(Foto/AnalystII, Fotodyne社, Hartland, WI, USA)を用いて測定することにより行った。

4. DNA合成能の測定

増殖期にあるHCS-2/8細胞およびウサギ肋軟骨成長軟骨(RGC)細胞をCTGFで24時間刺激し、その後、培地に[³H]チミジン(370kBq/ml)を添加して4時間ラベルした。ラベルした細胞を0.25%トリプシンで処理し、セルハーベスター(ハーベスター96, モリテックス社, 東京)でガラスフィルター(Wallac社)上に細胞を回収した。細胞を回収したガラスフィルターに固形シンチレーション(MultiLexTM A)を作用させガラスフィルター上の放射活性をマイクロプレート用シンチレーションカウンター(1450 Micro Beta PLUS, Wallac社)で測定した。

5. 細胞数の測定

細胞数の算定は細胞を0.25%トリプシン、0.02%EDTAを含むPBSにて剥離分散し、0.3%トリパンブルーを用いて、排除テストを行い、Bürker-Türk血球計算板にて算定した。

6. プロテオグリカン合成能の測定

プロテオグリカン合成はプロテオグリカン合成の最終段階である硫酸エステル化を指標として測定した^{25, 26)}。すなわち、成熟期に達したHCS-2/8細胞およびRGC細胞の培地を0.5%FBS含有DMEM培地に変え、24時間培養後、この培養系にrCTGFを10-100ng/mlの濃度になるよう添加し、5時間培養した。その後、培地に³⁵S]硫酸(370kBq/ml)を添加し、さらに、17時間培養後、培養上清および細胞層を回収した。細胞層側はまず1mg/mlのアクチナーゼEと5mM CaCl₂を含む0.2Mトリス-HCl(pH7.8)を0.5ml加えて、55℃、16時間消化した。次いで培養上清画分およびアクチナーゼEで消化した細胞層画分に2mM MgSO₄を含む0.2Mトリス-HCl(pH7.8)を1ml, 1mg/mlのコンドロイチン硫酸を0.1ml, 20mM NaClを含む1%CPCを1ml加え、37℃、3時間インキュベートした。両画分の沈殿したプロテオグリカンをガラスフィルター(直径25mm, 孔径0.45μm, アドバンテック東洋, 東京)上に回収し、放射活性を液体シンチレーションカウンター(Win Spectral™ 1414, Wallac社)で測定した。

7. アルカリホスファターゼ (ALPase)活性の測定

ALPase活性はBesseyら²⁷⁾の方法に準じて行った。すなわち、細胞層をPBSにて3回洗浄した後、0.2%トライトンX-100を含む0.9% NaClで細胞を可溶化し、水中で十分にホモジナイズ後、12,000x gで15分間遠心し、上清を試料とした。これを0.5mM pNPPおよび0.5mM MgCl₂を含む0.5M トリス-HCl (pH9.0) 中で37℃、30分間インキュベートした。30分後に、1.0 N NaOHを全体の1/4量添加し、反応を停止させ、分光光度計(DU-640, Beckman社, Fullerton, CA, USA)にて410nmの吸光度を測定した。標準曲線の作成にはpNPを使用した。ALPase活性は30分間に1μgタンパク質量あるいはDNA量あたりに水解される基質pNPPの量で表わした。タンパク定量はBCAタンパク定量キットを用いて、BSAを標準物質として測定した。DNA定量はPico Green dsDNA定量キットを用いて行った。

8. ウェスタンブロット

HCS-2/8細胞を3.5cm ディッシュに 3×10^5 /ディッシュの密度で播種し、コンフルエントに達するまで培養した。培地を0.5%FBS含有DMEM培地に変え、24時間培養後、CTGFあるいはPDGFで細胞を5分間刺激した。次いで、細胞を1%トライトンX-100を含む緩衝液で溶解後、8% sodium dodecyl sulfate (SDS)ポリアクリルアミドゲルにて30mAで電気泳動(SDS-PAGE)し、セミドライ型ブロッティング装置(Multiphor II; Pharmacia Biotech社)を用いて、 $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$ の条件で1時間、PVDF膜に転写した。転写後、5%スキムミルクを含むTBS溶液[20mM トリス-HCl (pH7.5), 0.5 M NaCl]で 37°C 、30分間のブロッキングを行った後、抗PDGF受容体 β 型抗血清をTBST溶液[TBS, 0.15%トライトンX-100]で1,000倍希釈したもので 4°C 、一晩反応させた。次いで、TBST溶液で5分ずつ3回洗浄した後、5%スキムミルクを含むTBST溶液で2,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgGヤギ抗体と 37°C 、90分間反応させた。その後、 37°C にてTBST溶液で5分ずつ5回、TBS溶液で5分ずつ3回洗浄後、APB溶液[0.1M トリス-HCl (pH9.5), 0.1M NaCl, 5mM MgCl_2]中で 37°C 、5分間インキュベートし、NBTとBCIPで発色させた。

9. RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)

Total RNAの抽出は、ChomczynskiとSacchi²⁸⁾の酸性フェノール法に準じて、TRIzol試薬を使用して行った。抽出したtotal RNAは $20\mu\text{g}$ あたりに0.8 UのDNase Iを用いて 37°C 、30分間処理した。RNAの定量は分光光度計(DU-640)で260nmの吸光度を測定することにより行った。RT-PCRは、GeneAmp RNA PCRキットを用いて行い、逆転写および増幅反応には、サーマルサイクラー(PC-700, アステック, 福岡)を用いた。精製したRNAの $1\mu\text{g}$ を使用し、oligo d(T)₁₆プライマー、AMV逆転写酵素を用い、 42°C で30分逆転写反応を行い、cDNAを得た。次いで、Taq Gold DNA ポリメラーゼ存在下で表1に示した各種特異プライマーを用いてPCRを行った。2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、PCR産物が飽和状態に至らない条件下で目的の増幅産物量を比較した。増幅産物の定量にはビデオデンストメーター (Foto/Analyst II)を用い、18SリボゾームRNAの増幅

産物量に対するCTGFのmRNAの増幅産物量の相対比をもって、CTGF遺伝子の発現量を評価した。

10. rCTGFのヨード標識

Iodogen(PIERCE社)を用いて、同社の取扱説明書に従い、 Na^{125}I でrCTGFをヨード標識した。 ^{125}I 標識rCTGFと未反応 ^{125}I はPD-10カラムで分離した。 ^{125}I 標識したrCTGF(^{125}I -rCTGF)の特異的放射比活性は1.51MBq/ μg であった。

11. 結合試験

結合試験は以前報告された方法^{17, 29)}に準じて行った。HCS-2/8細胞を24穴プレートに 1×10^5 /ウェルの密度で播種し、コンフルエントに達するまで培養した。PBSで洗浄後、結合緩衝液 A [DMEM, 15mM ヘペス(pH7.2), 0.1% BSA] を加え、特記しないかぎり、4℃で15分間インキュベートした。その後、 ^{125}I -rCTGFと非標識の競合物質を加え、4℃で2時間インキュベートした。インキュベート後、0.1%BSA含有PBSで5回洗浄し、1.0N NaOHで細胞を溶解し、放射活性を γ -カウンター(ARC-300, アロカ社, 東京)で測定した。非特異的結合の測定は ^{125}I -rCTGFと ^{125}I -rCTGFのおよそ300倍の非標識rCTGF(0.34 μM)の存在下での細胞に結合した放射活性を測定することにより行った。特異的結合は細胞に結合した全放射活性から非特異的に結合した放射活性を差し引いた値とした。

12. 架橋実験

HCS-2/8細胞に対する架橋実験はKinoshitaら²⁹⁾の方法に準じて行った。すなわち、HCS-2/8細胞を3.5cm ディッシュに 3×10^5 /ディッシュの密度で播種し、コンフルエントに達するまで培養した。コンフルエントに達したHCS-2/8細胞に ^{125}I -rCTGFと非標識の競合物質を加え、4℃で3時間インキュベートした。その後、結合緩衝液 B [50mM ヘペス(pH7.5), 128mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgSO_4 , 1.2 mM CaCl_2]で洗浄し、0.15mM DSSを加え、4℃で30分間インキュベートした。反応を結合緩衝液 C [10mM トリス-HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 0.25M sucrose, 0.3mM PMSF]で停止させ、細胞溶解緩衝液[10mM トリス-HCl(pH7.0), 1mM EDTA,

125mM NaCl, 1% トライトンX-100, 10 μ g/ml アプロチニン, 5 μ g/ml ロイペプシン, 1mM PMSF]で細胞を可溶化し、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーでCTGF・受容体複合体を検出した。

13. 免疫沈降

架橋実験と同じ条件下でCTGF・受容体複合体を形成させた反応液に抗CTGF抗血清、抗PDGF受容体 β 型抗血清あるいは免疫前血清を添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。その後、プロテインG セファロースを加え、4 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。セファロースビーズを結合緩衝液Bで3回洗浄し、細胞溶解緩衝液で1回洗浄した。セファロースビーズに結合したタンパク質をSDS sample buffer [14mM トリス (pH6.8), 10% グリセロール, 3% SDS, 180mM 2-メルカプトエタノール]で溶解し、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーで検出した。

14. リン酸化実験

3.5cmディッシュにHCS-2/8細胞を 3×10^5 /ディッシュの密度で播種し、コンフルエントに達するまで培養した。その後、リン酸不含DMEMで洗浄後、[32 P]正リン酸を最終濃度37MBq/mlの濃度になるよう添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後、最終濃度、50ng/mlのrCTGFで5分および60分と刺激し、DSSで架橋後、細胞を可溶化し、抗CTGF抗血清で免疫沈降を行った。SDS sample bufferを添加し、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーで検出した。

15. 統計学的解析

結果における有意差の判定は、それぞれの結果から平均値と標準偏差を算出し、 t 検定を用いて行った。

III. 結果

1. CTGFタンパク質の精製とDNA合成促進作用

HCS-2/8細胞の抽出液(56mgタンパク質)を抗CTGF抗体アフィニティークロマトグラフィー後、溶出試料をSDS-PAGEし、銀染色すると、分子量38kDaにバンドが認められた(図1A)。濃度をかえたBSAを標準物質として精製CTGFタンパク質の量を推定すると、およそ3 μ gであった。この精製CTGFタンパク質を最終濃度75 ng/mlになるように対数増殖期のHCS-2/8細胞に添加し、28時間後に $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを指標にしたDNA合成を測定すると、著明な増加が見られた(図1B)。

2. 軟骨細胞のDNA合成に及ぼす組換えCTGFタンパク質の影響

精製CTGFタンパク質はHCS-2/8細胞のDNA合成を著明に促進したが(図1B)、その量は極く微量であるため、以下の実験は、志茂¹⁵⁾の方法に準じて作製した組換えCTGFタンパク質(rCTGF)を用いて行った。

図2Aに示すように、対数増殖期のHCS-2/8細胞にrCTGFを最終濃度10,30,50,75,100 ng/mlになるよう添加して、28時間後にDNA合成を $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを指標として測定したところ、濃度依存的な亢進がみられ、50 ng/mlで対照と比較しておよそ1.8倍になった(図2A)。さらに、rCTGFを50 ng/mlの濃度になるようHCS-2/8細胞培養系に添加し、経時的に細胞数を測定すると、図2Bに示すように、3日目ですでに増殖促進がみられ、6日間の処置で対照と比較して約1.3倍になった。同様に、ウサギ肋軟骨成長軟骨細胞(RGC細胞)を用いてDNA合成を測定すると、rCTGFを30および50 ng/mlで添加すると濃度に依存したDNA合成促進効果が認められ、この培養系にIgG画分まで精製した抗CTGF抗体を50 μ g/ml添加すると、その促進作用は完全に阻害された。しかし、対照としての免疫前抗体(IgG画分)を50 μ g/ml添加してもrCTGFのDNA合成促進作用は阻害されなかった(図2C)。

3. 軟骨細胞のプロテオグリカン合成およびALPase活性に及ぼすrCTGFタンパク質の影響

次に軟骨細胞の成熟に対するrCTGFの影響を調べるため、軟骨細胞培養系にrCTGFを添加して軟骨細胞の成熟のマーカーとして知られるプロテオグリカン合成能²⁾を測定した。rCTGFを最終濃度10, 30, 50, 75, 100ng/mlでコンフルエントに達した前成熟期のHCS-2/8細胞培養系に添加すると、プロテオグリカン合成能は濃度依存的に上昇し、50ng/mlで対照の120%の最大値に達した(図3A)。また、同様に、コンフルエントに達した前成熟期のRGC細胞を用いてプロテオグリカン合成を測定すると、HCS-2/8細胞の結果と同様に濃度依存的にプロテオグリカン合成は増加し、50ng/mlで対照の140%の最大値に達した(図3B)。

ALPase活性は肥大軟骨細胞のマーカーとして用いられている²⁾ことから、次にrCTGFが肥大化に如何なる影響を与えるかをALPase活性を指標として調べた。細胞が重層し始めた成熟中期のRGC細胞にrCTGFを10, 30, 50, 75, 100ng/ml添加し、ALPase活性を測定したところ、rCTGFの濃度に依存してALPase活性の上昇を認め、75ng/mlで対照の120%の最大値に達した(図4)。

4. HCS-2/8細胞におけるPDGF受容体遺伝子およびタンパク質の発現

マウス線維芽細胞であるNIH3T3細胞において、PDGFがCTGFの細胞への結合を競合的に阻害するという報告⁶⁾があり、CTGFはPDGF受容体に結合する可能性がある。木村³⁰⁾は、HCS-2/8細胞において、PDGF受容体遺伝子が発現していることを報告しているが、実際に、本研究においてもRT-PCRの結果、HCS-2/8細胞においてPDGF α および β 型受容体mRNAに相当する263bpおよび554bpの増幅産物が認められた(図5A)。また、組換えPDGF-BBタンパク質(50ng/ml)およびHCS-2/8細胞から精製したCTGF(75ng/ml)でHCS-2/8細胞を刺激し、細胞層を1%トロン X-100で可溶化した試料を抗PDGF受容体 β 型抗血清でWestern blotを行うと、組換えPDGF-BBタンパク質で刺激を加えたHCS-2/8細胞では、PDGF受容体 β 型タンパク質の増加が確認された。すなわち、HCS-2/8細胞はPDGF受容体遺伝子を発現していることが、mRNAレベルだけでなく、タンパク質レベルでも確認できた。なお、精製したCTGFで刺激してもPDGF受容体 β 型タンパク質は増加しなかった(図5B)。

5. HCS-2/8細胞に対する ^{125}I -rCTGFの結合

上記の結果は、CTGFのHCS-2/8細胞に対する作用はPDGF受容体を介するものでなく、独自の受容体を介するものであることを示唆している。そこで、次に ^{125}I -rCTGFのHCS-2/8細胞に対する結合試験を行った。図6Aは、37℃と4℃における時間依存的なHCS-2/8細胞に対する ^{125}I -rCTGFの結合を示している。4℃で ^{125}I -rCTGFをHCS-2/8細胞に結合させると、2時間で特異的結合率は平衡状態に達し、4時間で最大値に達した。また、37℃で結合させると、30分で最大値に達し、その後、結合率の減少が認められた。最大結合率は、両条件で共にHCS-2/8細胞培養系に加えた総放射活性の約8%であった(図6A)。そこで、以下の実験は4℃で行った。

図6Bは、濃度依存的なHCS-2/8細胞に対する ^{125}I -rCTGFの結合を示したものである。細胞に対する特異的結合は、およそ $1.05 \times 10^{-8} \text{M}$ の濃度で飽和状態に達した。さらに、非標識rCTGFの添加により、HCS-2/8細胞に対する ^{125}I -rCTGFの結合は濃度依存的に減少し、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の非標識rCTGF添加で非標識リガンドを添加していない ^{125}I -rCTGF添加のみの群と比較して65%の阻害効果を認めた(図7A)。これに対して、非標識のPDGF-BBおよびbFGF添加ではHCS-2/8細胞に対する ^{125}I -rCTGFの結合阻害は認められなかった(図7A)。この結果をもとにスキャッチャード解析を行うと、傾きの異なる2本の直線が得られ、親和性の異なる2つの受容体の存在が示唆された(図7B)。計算の結果、高親和性の受容体のKd値は18.6nMであり、低親和性受容体のKd値は259nMとなった(表2)。また、それぞれの受容体数は高親和性受容体が細胞あたり 6.21×10^5 個、低親和性受容体が 6.18×10^6 個と計算された(表2)。

6. HCS-2/8細胞における ^{125}I -rCTGF・受容体複合体の同定

CTGF受容体の生物学的特徴を調べるために、HCS-2/8細胞に ^{125}I -rCTGFをDSSで共有結合させ、 ^{125}I -rCTGF・受容体複合体をSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィーで検出した。その結果、280kDa、38kDaそして18kDaの3種類のバンドが認められた。280kDaのバンドは、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の非標識rCTGF添加により完全に消失したが、同じ濃度のPDGF-BBやbFGFでは消失しなかった(図8)。38kDaおよび18kDaのバンドはおそらくCTGFとその分解産物と推定された。

図9は、抗CTGF抗血清、抗PDGF受容体 β 型抗血清および免疫前血清を用いてリガンド・受容体複合体を免疫沈降した時の結果を示す。HCS-2/8細胞に結合した ^{125}I -rCTGFをDSSで架橋した後、抗CTGF抗血清あるいは抗PDGF受容体 β 型抗血清、免疫前血清で免疫沈降を行った。その結果、抗CTGF抗血清で免疫沈降した時のみに図8の結果で得られた280kDaと同じ位置にバンドが認められた。また、38kDaおよび18kDaのタンパク質も抗CTGF抗血清で免疫沈降され、抗PDGF受容体抗血清あるいは免疫前血清では、これらのバンドは認められなかった(図9)。

7. HCS-2/8細胞のCTGF受容体のリン酸化実験

コンフルエントに達したHCS-2/8細胞を37MBq/mlの ^{32}P 正リン酸でラベルし、rCTGF(50ng/ml)で5分、60分と刺激した。DSSで架橋後、抗CTGF抗血清で免疫沈降し、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGEの結果、架橋実験で得られた280kDaと同じ位置にバンドが認められた(図10A)。このバンドの黒化度をバイオイメージングアナライザー(BAS2000, 富士写真フイルム, 東京)で測定すると、rCTGFで刺激後5分で、無刺激の対照と比較して、2倍のリン酸化の促進が認められ、刺激後60分では、その促進効果は消失した(図10B)。

8. RGC細胞の分化に伴うCTGF受容体レベルの変動

RGC細胞をコラーゲンコートした48穴プレートに1穴あたり 1.5×10^4 個の割合で播種し、3日後に培養上清を変え、同時に軟骨細胞の分化を制御する因子であるPTHあるいはIL-1 β をそれぞれ0.1 μM 、100ng/mlの濃度になるよう添加し、さらに2日間培養した。この状態の細胞を100%エタノールで固定し、アルシャンブルーで染色し、ウェル全体を肉眼的に観察すると同時に細胞形態を顕微鏡で観察した。PBS添加した対照では、細胞周囲にアルシャンブルーの染色像が認められたが、PTH添加では全体的にアルシャンブルーに濃染された。一方、IL-1 β 添加では細胞形態が線維芽細胞様に細長くなり、アルシャンブルーの染色性が著しく低下した(図11AとB)。このような状態の細胞への ^{125}I -rCTGFの結合量を調べると、PTH添加では減少し、逆に、IL-1 β 添加では上昇した(図11C)。

次に、同様にRGC細胞をコラーゲンコートした24穴プレートに1穴あたり 3×10^4

個の割合で播種し、5週間培養した。軟骨細胞の最終分化マーカーであるALPase活性は、培養3週以降に上昇し、これと平行してCTGF mRNAの発現量も培養日数と共に上昇した。このような条件下で¹²⁵I-rCTGFの細胞への結合量を測定すると、培養日数と共に減少し、培養28日目で特異的結合はほとんど認められなくなった(図12)。

IV. 考察

本研究では、まず、CTGFを高発現しているHCS-2/8細胞の細胞層画分からCTGFタンパク質を精製した(図1A)。精製を行う前にHCS-2/8細胞におけるCTGFタンパク質の局在を細胞層側と培養上清側に分けて、抗CTGF抗血清を用いたWestern blot法で調べた。その結果、培養上清側には、ほとんどバンドは検出されず、細胞層側にバンドが認められた(データ省略)。シグナルペプチドを有するCTGFは細胞外に分泌されると考えられるが⁶⁾、CTGFはヘパリン結合能を有するため、その後、細胞外基質、あるいは細胞表面に結合し、培養上清中にはほとんど遊離しないと推定された。そこで、CTGFタンパク質が多量に存在すると考えられた細胞層画分を材料に精製を始めた。225cm²のフラスコ7個から回収できた細胞層画分の総タンパク質量は56mgであり、抗CTGF抗体アフィニティークロマトグラフィーを行い、3μgの精製CTGFタンパク質を得ることができた(図1A)。次に、完全精製を行うために細胞層画分をイオン交換クロマトグラフィーを行った後、再度、抗CTGF抗体アフィニティークロマトグラフィーを行ったが、精製タンパク質量が少なく、完全精製にまで至らなかった。その後、志茂¹⁵⁾が、組換えCTGFタンパク質(rCTGF)の作製に成功し、その活性をHCS-2/8細胞のDNA合成を指標に調べると、HCS-2/8細胞から精製したCTGFより活性は若干弱いものの(図1B)、rCTGFでも活性が認められた(図2A)。

rCTGFをSDS-PAGEすると、分子量36-38kDaと18kDaにバンドが認められたが(データ省略)、分子量36-38kDaのバンドはCTGFに糖鎖結合部位が二ヶ所ある⁶⁾ため糖鎖の結合量の違いによるものと考えられる。低分子量のバンドはCTGFタンパク質の分解産物か、あるいは、CTGFタンパク質の活性型として報告された³¹⁾

³³⁾ 10kDa, 16kDaそして20kDaの低分子量CTGFを示しているのかもしれない。いずれにしてもCTGFタンパク質あるいは、その関連タンパク質であると考えられた。

rCTGFを増殖期のHCS-2/8細胞の培養系に添加し、^[3H]チミジンの取り込みを指標としたDNA合成を測定すると、濃度依存的にDNA合成を促進した(図2A)。また、同様にRGC細胞でDNA合成を測定すると、やはり、DNA合成の促進作用が認められ、この培養系に抗CTGF抗体を添加すると、DNA合成の促進作用は阻害された(図2C)。さらに、実際に細胞数を測定すると、rCTGFを添加した群は、対照としたPBS添加群と比較して細胞数の増加が認められた(図2B)。これらの結果は、CTGFが軟骨細胞の増殖に関与していることを示唆している。Nakanishiら⁴⁾は、軟骨細胞においてCTGFがTGF- β で誘導を受けることを報告した。TGF- β は、軟骨細胞において増殖促進効果があることが知られているが^{34,35)}、HCS-2/8細胞の培養系においてもTGF- β を添加すると、DNA合成の促進作用は確認でき、この系に抗CTGF抗体を添加すると、そのDNA合成促進作用は完全に阻害された(データ省略)。これらの所見はTGF- β の増殖促進作用にはTGF- β 刺激により産生されたCTGFが関係している可能性を示唆している。

軟骨細胞が成熟すると、II型コラーゲンおよびIV型コラーゲンと共に軟骨型プロテオグリカン(アグリカン)を主成分とする軟骨基質を大量に産生・分泌するようになる^{2,3)}。それゆえに、プロテオグリカン合成能は、成熟軟骨細胞の最も重要な分化マーカーの1つであると考えられている^{2,3)}。今回、rCTGFをコンフルエントに達した直後の成熟しつつある軟骨細胞に添加し、そのプロテオグリカン合成能を測定した。その結果、rCTGFは、濃度依存的に軟骨細胞のプロテオグリカン合成能を上昇させ、50ng/mlで有意に高い値を示した(図3AとB)。そのレベルはHCS-2/8細胞においては対照の120%であり(図3A)、RGC細胞においては、およそ140%であった(図3B)が、これらの上昇率は、軟骨細胞のプロテオグリカン合成を制御する重要な成長因子として知られているIGFの効果にほぼ匹敵した³⁶⁾。したがって、CTGFも軟骨細胞のプロテオグリカン合成を制御する重要な成長因子であると考えられる。また、最近、IGF結合タンパク質様のドメインを有するCTGFがIGFsと結合し、IGF結合タンパク質様の機能を持つことが報告された^{37,38)}。このことから、CTGFがIGFsの作用を修飾する可能性も考えられる。

肥大軟骨細胞の分化マーカーとして、X型コラーゲンの発現やアルカリホスファターゼ(ALPase)活性の上昇が挙げられる^{2, 18)}。ALPaseは、成長板では増殖層から肥大軟骨細胞層にかけて活性が高くなり、石灰化軟骨で最も高くなる^{2, 18)}。主に細胞膜上に局在し、石灰化に関係していると考えられている¹⁾。培養系で成長軟骨細胞を最終分化させた時も活性が著明に上昇するが¹⁸⁾、今回、rCTGFがALPase活性を上昇させたこと(図4)は、CTGFが軟骨細胞の増殖や成熟のみならず、肥大化も促進することを示唆している。

Bradhamら⁶⁾やKikuchiら¹⁶⁾は線維芽細胞においてCTGFはPDGF受容体に結合する可能性を示唆している。すなわち、Bradhamら⁶⁾は細胞表面に結合したCTGFがPDGF添加によって競合的に阻害されることをCTGFと交差反応する抗PDGF抗体を用いたWestern blot法で示しているが、検出方法として抗CTGF抗体ではなく抗PDGF抗体を用いていること、実験に用いたCTGFタンパク質が粗精標品であることなど問題点が多く、直接的な証明とは言えない。また、Kikuchiら¹⁶⁾は線維化した線維芽細胞でCTGFとPDGF受容体遺伝子が共発現していることを示しているにすぎず、この報告も直接的にCTGFがPDGF受容体に結合することを示しているとは言い難い。本研究でも、HCS-2/8細胞にPDGF受容体の α 型および β 型のmRNAが存在することを確認したが(図5A)、HCS-2/8細胞から精製したCTGFタンパク質でHCS-2/8細胞を刺激してもPDGFで刺激した時のようにPDGF受容体 β 型タンパク質の発現の増加は認められなかった(図5B)。この結果は、HCS-2/8細胞において、CTGFはPDGF受容体に結合するのではなく、独自の受容体に結合する可能性を示唆しており、実際、¹²⁵I-rCTGFを用いた結合試験により、HCS-2/8細胞においてCTGFに特異的な親和性の異なる2つの受容体が存在することが明らかとなった(図7A)。また、架橋実験では、280kDaのCTGF・受容体複合体のバンドが認められることから、推定されるCTGF受容体の分子量はおよそ240kDaであると考えられる。これはPDGF受容体の分子量が、180kDaと170kDaであることから考えると³⁹⁾、いずれのタイプの受容体とも一致せず、CTGFに特異的な受容体の存在が示唆される。なお、この点は、抗CTGF抗血清あるいは抗PDGF受容体 β 型抗血清を用いた免疫沈降の結果(図9)からも確認された。非標識のrCTGF添加により、この280kDaのバンドは濃度依存的に消失したが、PDGF-BBやbFGFを同じ濃度添加してもバンドの

消失は認められなかったことからCTGFはPDGF受容体に結合するのではなく、CTGFに特異的な受容体に結合すると考えられる(図 8)。Steffenら³²⁾も、マウス線維芽細胞を用いて、CTGFがPDGF受容体に結合しないことを報告しており、この報告からもCTGFに特異的な受容体が存在すると考えられる。なお、38 kDaおよび18 kDaのバンドはCTGFそのものとその分解産物か、あるいは低分子量の活性型CTGFであると考えられる³¹⁻³³⁾。ちなみに、この18 kDaの低分子量のバンドは前述したように、抗CTGF抗血清を用いたWestern blot法でも確認されている。

ところで、結合試験では2種類の親和性の異なる受容体の存在が示唆されたが、架橋実験では、CTGF・受容体複合体のバンドが1つしか認められなかった。したがって、架橋実験では¹²⁵I-rCTGFと高親和性および低親和性受容体の3つの複合体が検出されたか、あるいは、親和性が低い受容体はDSSで効率よく架橋されないため、高親和性受容体と¹²⁵I-rCTGFの2つの複合体が検出されたかのどちらかだと考えられる。過去に、上皮由来成長因子(epidermal growth factor ; EGF)²⁹⁾やIGFs³⁶⁾、PDGF³⁹⁾のような他の成長因子でも同様な架橋実験が行われているが、架橋実験の段階では1つのバンドとしてしか検出されていない場合が多く、クローニングされて始めて、受容体は2量体を形成する⁴⁰⁾ことが判明した例が多い。このことから考えると、CTGF受容体の性状と構造を理解するためにはCTGF受容体のクローニングが必要不可欠であると思われる。今回の結果はCTGFに特異的な受容体が存在することを初めて明らかにしたもので、CTGF受容体の構造を解明するには至っていない。しかし、リン酸化実験の結果(図10)は、架橋実験で検出したタンパク質が単にCTGFの多量体を検出したものではなく、CTGF受容体がリン酸化を受ける受容体であることを強く示唆するものであり、本研究により、CTGF受容体の性状の一端が明らかになったと言えよう。

CTGFがヘパリン結合性のタンパク質であること⁶⁾を考えると、2種類の親和性の異なる受容体の内、低親和性受容体はグリコサミノグリカン鎖の1つであるヘパラン硫酸である可能性が考えられる。そこで、¹²⁵I-rCTGFとヘパラン硫酸あるいはコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸を共存添加し、HCS-2/8細胞に対する結合試験を行ったところ、コンドロイチン硫酸添加では阻害効果が認められず、ヘパラン硫酸添加で最も強く細胞への結合は阻害された(データ省略)。この結果はCTGFがヘパ

ラン硫酸に結合することを示しており、CTGFの機能をヘパラン硫酸が調節している可能性がある。FGF⁴¹⁾や肝細胞成長因子⁴²⁾は、チロシンキナーゼ活性をもつ受容体に結合すると同時に細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンにも結合することが知られている。近年、FGFにおいては、このヘパラン硫酸プロテオグリカンが受容体の結合に対して補助的な役割を果たしていることが判明してきた⁴¹⁾。また、FGFは、1つの細胞のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合し、もう1つの細胞の受容体に結合することで、細胞と細胞とを接着させているという報告もある⁴³⁾。Shimoらは、CTGFにも細胞接着効果があることを見い出したが(投稿準備中)、このFGFのモデルがCTGFにもあてはまるかもしれない。軟骨組織には大量の細胞外基質が存在しており、CTGFもこの基質中のヘパラン硫酸に結合し、基質中に蓄えられることによって、軟骨細胞の分化を制御している可能性が考えられる。

近年、成長因子やホルモンの受容体数が分化の程度の異なる軟骨細胞で異なることが明らかとなり、受容体レベルを解析することが、軟骨細胞の分化の制御機構を解明する近道であると考えられようになってきた²⁾。今回、CTGFが軟骨細胞の増殖や分化を促進する多機能因子であることを明らかにしたが、CTGFの軟骨細胞の各分化段階における機能はCTGFの受容体レベルの変動に関係があると考えられる。図11(A, B, C)に示した様に、コンフルエントに達した直後のRGC細胞培養系に軟骨細胞の分化促進因子であるPTH^{2,17,18)}を添加して、アルシャンブルーの染色性が亢進した状態にすると、¹²⁵I-rCTGFの結合量は減少し、一方、分化抑制因子であるIL-1 β ²⁸⁾を添加し、細胞形態が線維芽細胞様に細長くなり、アルシャンブルーの染色性も著しく低下した状態にすると、¹²⁵I-rCTGFの結合量は増加した。この結果は¹²⁵I-rCTGFの細胞への結合量が前成熟期の軟骨細胞で多く、成熟した軟骨細胞では低いことを示唆している。

RGC細胞をコラーゲンコートしたディッシュ上で5週間培養し、細胞に結合した¹²⁵I-rCTGFの特異的放射活性を測定すると、培養7日目では細胞に結合した¹²⁵I-rCTGFの特異的放射活性の割合は6%程度認められたが、培養14日目で急激に放射活性は減少し、培養28日目ではほとんど認められなくなった(図12)。培養7日目から14日目までは軟骨細胞が成熟する期間であり、培養14日目から28日目の軟骨細胞は成熟後期から肥大型に相当すると考えられる^{18, 19)}。したがって、肥大軟骨細胞

から産生されたCTGF⁴⁾が前成熟期から成熟期の軟骨細胞にパラクリン的に作用し、プロテオグリカン合成を促進すると同時に、成熟後期から肥大型にある軟骨細胞に対してもパラクリンないしオートクリン的に作用し、ALPase活性を上昇させると考えられる。なお、肥大型軟骨細胞においては、軟骨細胞から産生されるCTGFの産生量が増加しているため、CTGF受容体が自己産生性のCTGFにより占有され、その結果、¹²⁵I-rCTGFの結合量が低下している可能性も考えられるが、この点に関してはさらに検討する必要があるだろう。なお、本研究では、CTGFがディッシュ表面に容易に接着するため増殖期の軟骨細胞に対するCTGFの結合率は調べることはできなかった。そのため増殖期の軟骨細胞でCTGF受容体レベルが高いかどうかは不明であるが、CTGFの増殖促進効果がそれほど強力ではないことを考えると、増殖期ではCTGF受容体レベルはあまり高くないかもしれない。実際に軟骨の分化に伴うCTGF受容体数の変動や組織における局在を明らかにするためには受容体遺伝子のクローニングが必要不可欠であるが、いずれにしても本研究の結果は、軟骨細胞の分化に伴いCTGF受容体レベルが変動することを示唆しており、各分化段階の軟骨細胞に対するCTGFの作用を解析する上で重要な知見となると考えられる。

V. 結論

1. CTGFは増殖期の軟骨細胞に作用し、細胞増殖を促進させた。また、成熟期や肥大型の軟骨細胞に作用し、プロテオグリカン合成およびALPase活性を上昇させた。
2. CTGFが作用する際には従来考えられてきたPDGF受容体に結合するのではなく、CTGFに特異的な受容体に結合することが初めて明らかとなった。また、CTGF受容体には、親和性の異なる2つの受容体が存在し、その分子量はおよそ240kDaと推定された。
3. CTGFの軟骨細胞への結合レベルは前成熟期の軟骨細胞で高く、軟骨細胞が成熟し、最終分化するに従って低くなることが判明した。

これらの結果から、CTGFは軟骨細胞の各分化段階で作用し、内軟骨性骨化全体を促進する多機能因子であること、又、その作用は特異的な受容体を介することが明らかとなった。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えて頂き、ご指導と御校閲を賜りました岡山大学歯学部歯科保存学第二講座村山洋二教授に謹んで感謝の意を表わします。また、本研究を与えられ、直接、終始懇切なる御指導と御教示頂きました岡山大学歯学部口腔生化学講座滝川正春教授ならびに中西 徹博士に深く感謝致します。最後に、本研究を行うにあたり、多くの貴重な御援助と御助言を頂きました岡山大学歯学部口腔生化学講座の諸先生方ならびに本研究の円滑な進行に際し、特別の御配慮を頂きました岡山大学歯学部歯科保存学第二講座の教室員の皆様に心から御礼申し上げます。

VII. 文献

- 1) 小澤英浩：骨の組織発生と成長；骨の科学. (須田立雄, 小澤英浩, 高橋英明), 1版, 医歯薬出版, 東京, 65-75, 1985.
- 2) 滝川正春：軟骨細胞の分化；骨形成と骨吸収及びそれらの調節因子. 1巻, (須田立雄編), 1版, 廣川書店, 東京, 18-36, 1995.
- 3) 鈴木不二男：軟骨から骨への変換における成長因子. 蛋白質 核酸 酵素, **40** (5), 506-519, 1995.
- 4) Nakanishi, T., Kimura, Y., Tamura, T., Ichikawa, H., Yamaai, Y., Sugimoto T. and Takigawa M. : Cloning of mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF)mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 206-210, 1997.
- 5) 滝川正春、中西 徹、志茂 剛：内軟骨性骨形成に最も重要な新規成長因子CTGF. 細胞工学, **17** (3), 357-362, 1998.
- 6) Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L. and Grotendorst, G. R. : Connective tissue growth factor : a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J. Cell Biol.*, **114**, 1285-1294, 1991.
- 7) Bork, P. : The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.*, **327**, 125-130, 1993.
- 8) Kothapalli, D., Frazier, K. S., Welply, A., Segarini, P. R. and Grotendorst, G. R. : Transforming growth factor β induced anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ.*, **8**, 61-68, 1997.

- 9) Igarashi, A., Okouchi, H., Bradham, D. M. and Grotendrost, G. R. : Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol. Biol. Cell.*, **4**, 637-645, 1993.
- 10) Igarashi, A., Nashiro, K., Kikuchi, K., Sato, S., Ihn, H., Grotendorst, G. R. and Takehara, K. : Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J. invest. Dermatol.*, **105**, 280-284, 1995.
- 11) Oemar, B. S. and Luscher, T. F. : Connective tissue growth factor friend or foe? *Arterio. Throm. Vascular Biol.*, **17**, 1483-1489, 1997.
- 12) Ito, Y., Aten, J., Bende, R. J., Oemar, B. S., Rabelink, T., J., Weening, J. J. and Goldschmeding, R. : Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int.*, **53**, 853-861, 1998.
- 13) Lasky, J. A., Ortiz, L. A., Tonthat, B., Hoyle, G. W., Corti, M., Athas, G., Lungarella, G., Brody, A. and Friedman, M. : Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Physiol.*, **275**(2), 365-371, 1998.
- 14) Dammeier, J., Brauchle, M., Falk, W., Grotendrost, G. R. and Werner, S. : Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**, 909-922, 1998.
- 15) 志茂 剛 : 軟骨由来成長因子Hcs24/CTGFの血管内皮細胞におけるオートクリン、パラクリン増殖・遊走因子としての役割. 岡山歯学会雑誌, **17**, 117-133, 1998.
- 16) Kikuchi, K., Kadono, T., Ihn, H., Sato, S., Igarashi, A., Nakagawa, H., Tamaki, K. and Takehara, K. : Growth regulation in scleroderma

- fibroblasts : Increased response to transforming growth factor- β 1. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 128-132, 1995.
- 17) Takigawa M., Kinoshita, A., Enomoto, M., Asada A. and Suzuki, F. : Effects of various growth and differentiation factors on expression of parathyroid hormone receptors on rabbit costal chondrocytes in culture. *Endocrinology*, **129**, 868-876, 1991.
 - 18) Iwamoto, M., Jikko, A., Murakami, H., Shimazu, A., Nakashima, K., Iwamoto, M., Takigawa, M., Baba, H., Suzuki, F. and Kato, Y. : Changes in parathyroid hormone receptors during chondrocyte cytodifferentiation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 17245-17251, 1994.
 - 19) Yu. Y. M., Sklar, M. N., Nissley, S. P. and Reddi, A. H. : Change in the expression of insulin-like growth factor II / mannose-6-phosphate receptor during endochondral bone development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 516-524, 1993.
 - 20) Iwamoto M., Shimazu A., Nakashima K., Suzuki, F. and Kato Y. : Reduction in basic fibroblasts growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 461-467, 1991.
 - 21) Takigawa, M., Tajima, K., Pan, H. O., Enomoto, M., Kinoshita, A., Suzuki, F., Takano, Y. and Mori, Y. : Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. *Cancer Res.*, **49**, 3996-4002, 1989.
 - 22) Takigawa, M., Pan, H. O., Kinoshita, A., Tajima, K. and Takano, Y. : Establishment from a human chondrosarcoma of a new immortal cell line with high tumorigenicity *in vivo*, which is able to form proteoglycan-rich cartilage-like nodules and to respond to insulin *in vitro*. *Int. J. Cancer.*, **48**, 717-725, 1991.
 - 23) Enomoto, M. and Takigawa, M. : Regulation of tumor derived and immortalized chondrocytes. Biological Regulation of the

- Chondrocytes. *In Biological Regulation of the Chondrocytes*,
(Adolphe, M., editor). CRC Press, Boca Raton, 321-338, 1992.
- 24) Zhu, J. D., Pan, H. O., Suzuki, F. and Takigawa, M. : Proto-oncogene expression in a human chondrosarcoma cell line : HCS-2/8. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 364-371, 1994.
- 25) Takigawa, M., Ishida, H., Takano, T. and Suzuki, F. : Polyamine and differentiation : induction of ornithine decarboxylase by parathyroid hormone is a good marker of differentiated chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1481-1485, 1980.
- 26) Enomoto, M., Pan, H. O., Kinoshita, A., Yutani, Y., Suzuki, F. and Takigawa, M. : Effects of tumor necrosis factor α on proliferation and expression of differentiated phenotypes in rabbit costal chondrocytes in culture. *Calcif. Tissue Int.*, **47**, 145-151, 1990.
- 27) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : A method for rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 28) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159, 1987.
- 29) Kinoshita, A., Takigawa, M. and Suzuki, F. : Demonstration of receptors for epidermal growth factor on cultured rabbit chondrocytes and regulation of their expression by various growth and differentiation factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 14-20, 1992.
- 30) 木村祐輔 : ヒト軟骨肉腫由来クローン化軟骨細胞様細胞株における結合組織増殖因子の遺伝子発現とその機能解析. 大阪大学歯学雑誌, **41**, 29-55, 1996.
- 31) Brigstock, D. R., Steffen, C. L., Kim, G. Y., Vegunta, R. K., Diehl, J. R. and Harding, P. A. : Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. *J. Biol.*

Chem., **272**, 20275-20282, 1997.

- 32) Steffen, C. L., Ball-Mirth, D. K., Harding, P. A., Bhattacharyya, N., Pillai, S. and Bridstock, D. R. : Characterization of cell-associated and soluble forms of connective tissue growth factor (CTGF) produced by fibroblast cells *in vitro*. *Growth Factors*, **15**, 199-213, 1998.
- 33) Ball, D. K., Surveyor, G. A., Diehl, J. R., Steffen, C. L., Uzumcu, M., Mirando, M. A. and Brigstock, D. R. : Characterization of 16-to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biol Reprod.*, **59**, 828-835, 1998.
- 34) Iwasaki, M., Nakata, K., Nakahara, H., Nakase, T., Kimura, T., Caplan, A. I. and Ono, K. Transforming growth factor β 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells. *Endocrinology*, **132**, 1603-1608, 1993.
- 35) Hiraki, Y., Inoue, H., Hirai, R., Kato, Y. and Suzuki, F. : Effect of transforming growth factor β on cell proliferation and glycosaminoglycan synthesis by rabbit growth-plate chondrocytes in culture. *Biochem. Biophys. Acta.*, **969**, 91-99, 1988.
- 36) Takigawa, M., Okawa, T., Pan, H. O., Aoki, C., Takahashi, K., Dezue, J., Suzuki, F. and Kinoshita, A. : Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma-derived chondrocyte cell line, HCS-2/8. *Endocrinology*, **138**, 4390-4400, 1997.
- 37) Kim, H. S., Nagalla, S. R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, Jr., C. T., and Rosenfeld, R. G. : Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): Characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP

- superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12981-12986, 1997.
- 38) Yang, D. H., Kim, H. S., Wilson, E. M., Rosenfeld, R. G. and Oh, Y. : Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor (IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-r2 expression by TGF- β in Hs578T human breast cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 2593-2596, 1998.
- 39) Glenn, K., Bowen-Pope, D. F. and Ross, R. : Platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5172-5176, 1982.
- 40) 森 聖二郎 : 概説- 増殖因子の作用とレセプターの構造、シグナル伝達 ; 用語ライブラリー サイトカイン・増殖因子. (宮園浩平, 菅村和夫編), 1版, 羊土社, 東京, 84-87, 1995.
- 41) Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M. : Regulation of growth factor activation by proteoglycans : What is the role of the low affinity receptors? *Cell*, **83**, 357-360, 1995.
- 42) Lyon, M., Deakin, J. A., Mizuno, K., Nakamura, T. and Gallagher, J. T. : Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11216-11223, 1994.
- 43) Richard, C., Liuzzo, J. P. and Moscatelli, D. : Fibroblast growth factor-2 can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighboring cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24188-24196, 1995.

項目	表	掲載頁 (pp.)
1. 研究の目的と意義	表 1-1	10
2. 研究の背景と動機	表 2-1	15
3. 研究の範囲と対象	表 3-1	20
4. 研究の方法と手順	表 4-1	25
5. 研究の結果と考察	表 5-1	30
6. 研究の結論と今後の展望	表 6-1	35

VIII. 表の説明

表 1 使用したプライマー

種類	配列	増幅産物 (bp)
PDGF受容体 α 型	(S) 5'- AACATGATTTCCCTCCACAC-3' (AS) 5'- ATCCCATTATTTTCAGAGGGC-3'	263
PDGF受容体 β 型	(S) 5'- CCCTCAGTCTTAATCCATCC-3' (AS) 5'- CTCTTTGTCCCTTTTCCCCA-3'	554
CTGF	(S) 5'- ATATAGCTGATCAGTTTTTTCACC-3' (AS) 5'- CAACTAGAAAAGGTGCAAACATGTAAC-3'	126
18SリボゾームRNA	(S) 5'- GCGAATTCCTGCCAGTAGCATATGCTTG-3' (AS) 5'- GGAAGCTTAGAGGAGCGAGCGACCAAAGG-3'	120

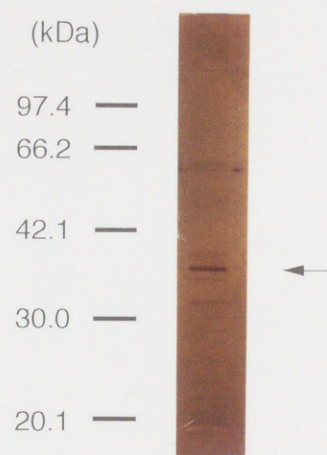
表 2

スキャッチャード解析(図 7B)から計算されたHCS-2/8細胞の
CTGF受容体数と解離定数

	細胞当たりの受容体数 ($\times 10^5$)	解離定数 (M)
高親和性受容体	6.21	1.86×10^{-8}
低親和性受容体	61.8	2.59×10^{-7}

↑
Top

A



B

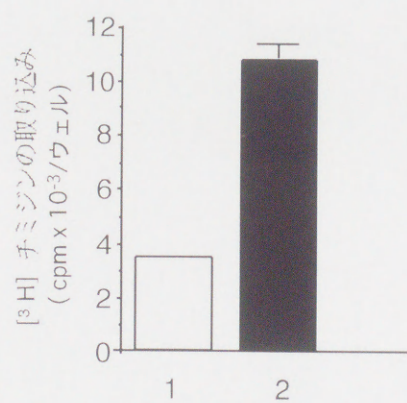
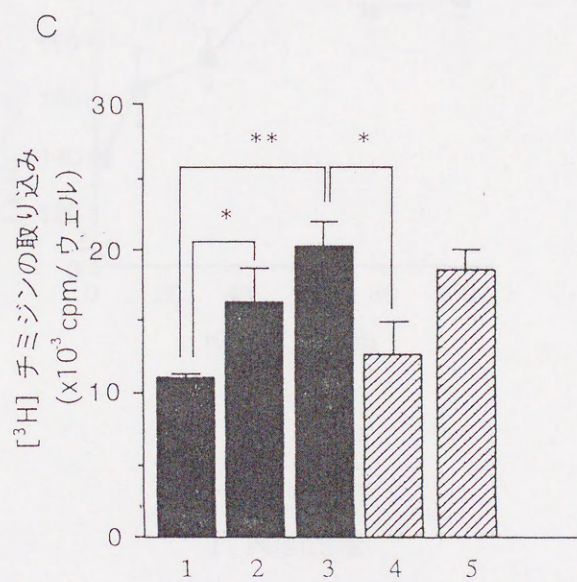
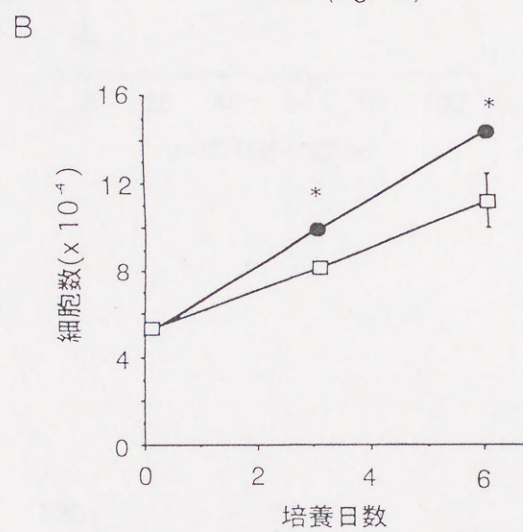
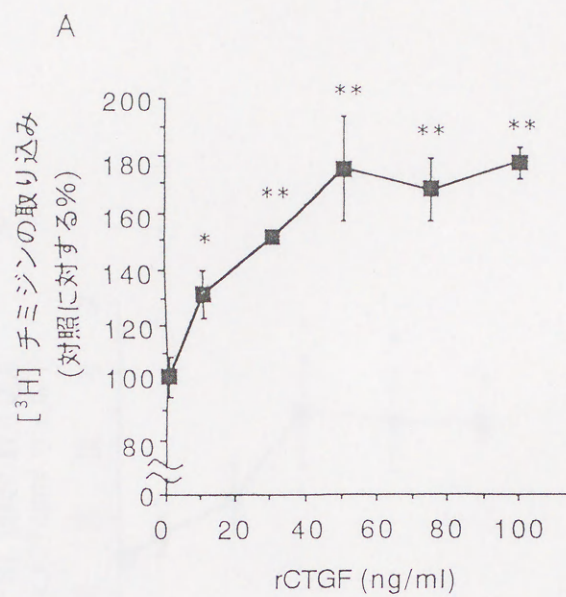
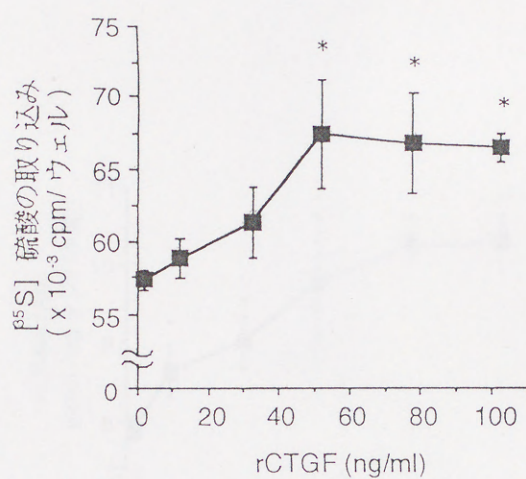


図 1

T. Nishida



A



B

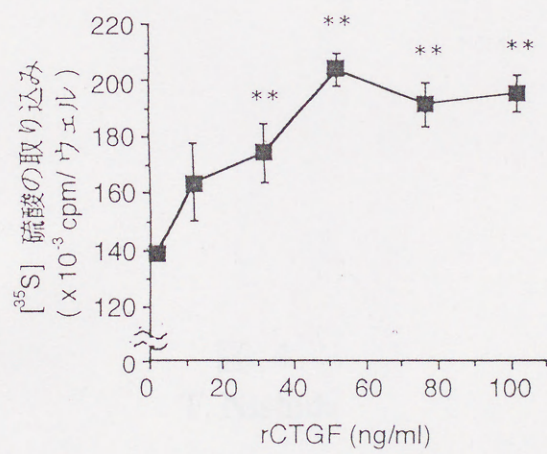


図 3
T. Nishida

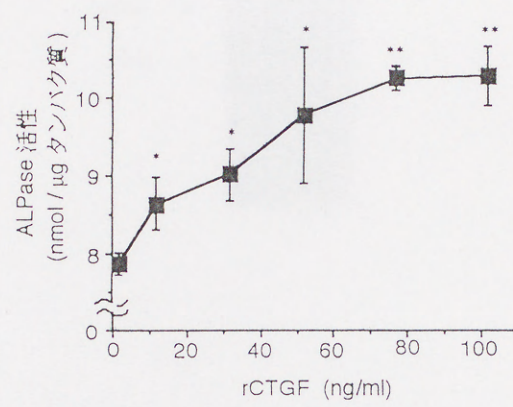


図 4
T. Nishida

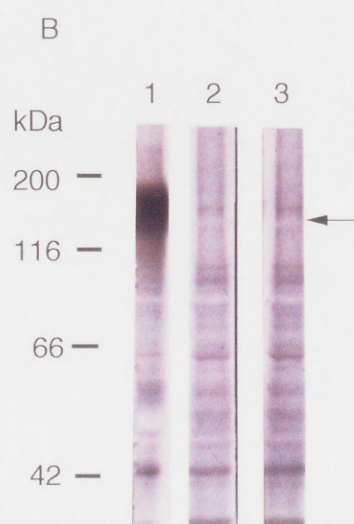
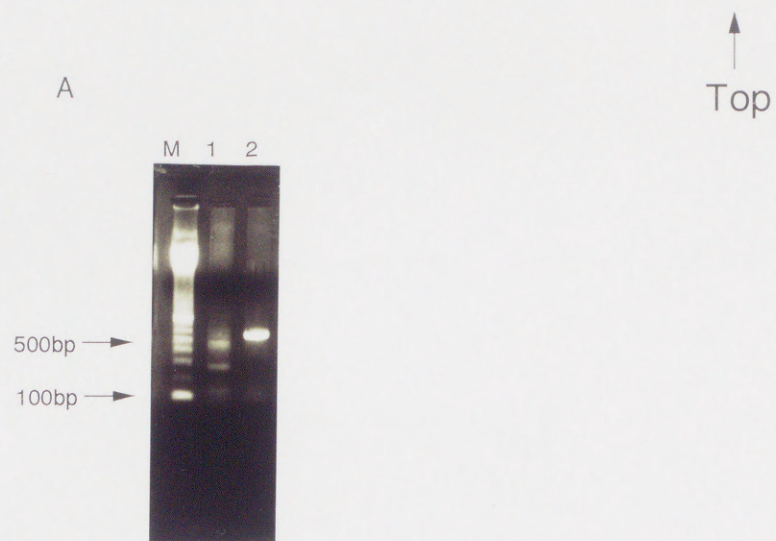
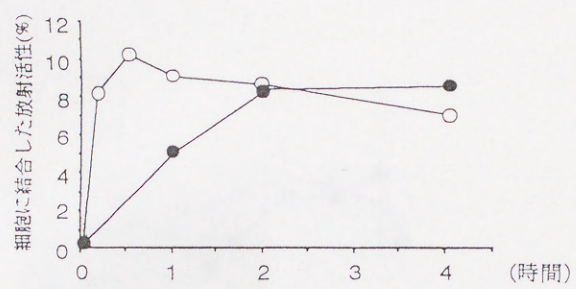


図 5
T. Nishida

↑
Top

A



B

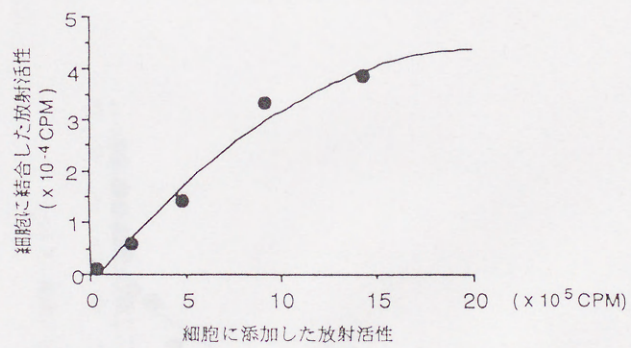
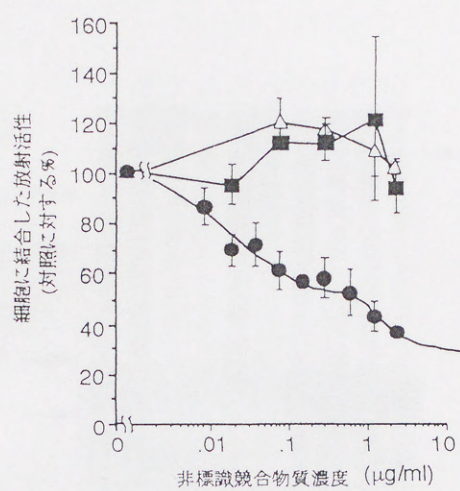


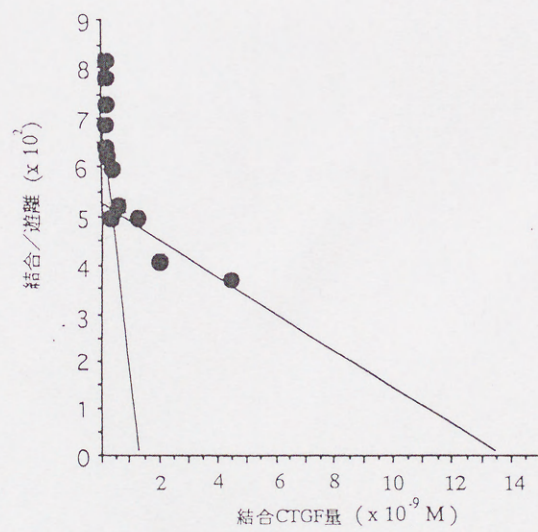
図 6

T. Nishida

A



B



↑
Top

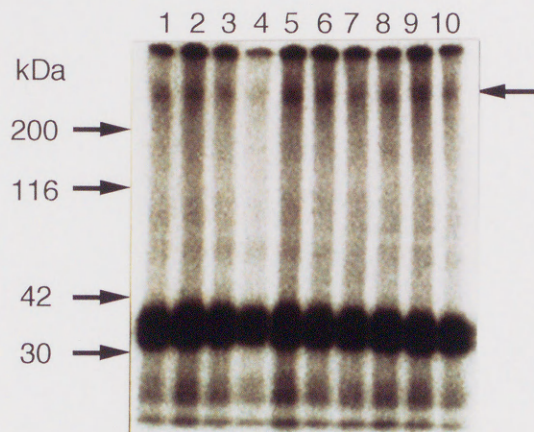


図 8
T. Nishida

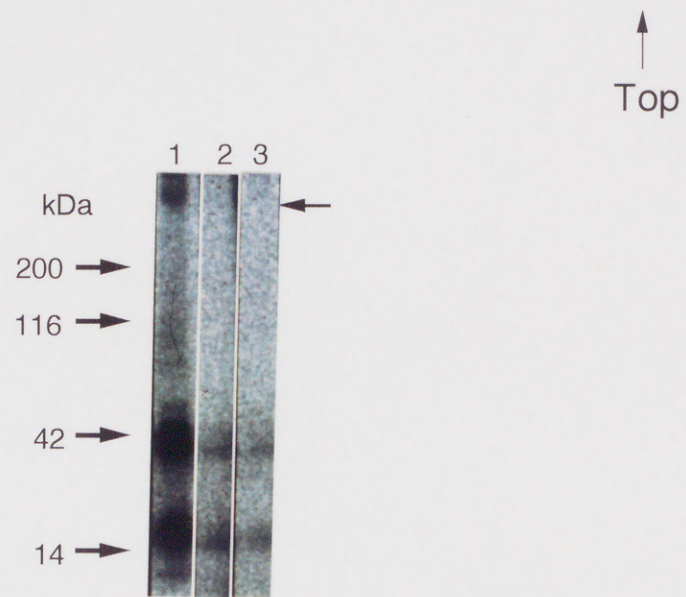
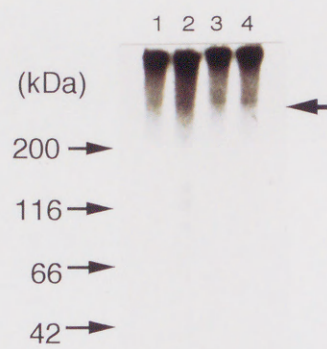


図 9

T. Nishida

↑
Top

A



B

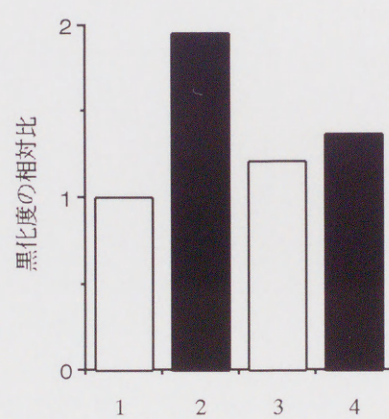
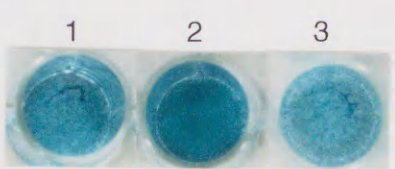


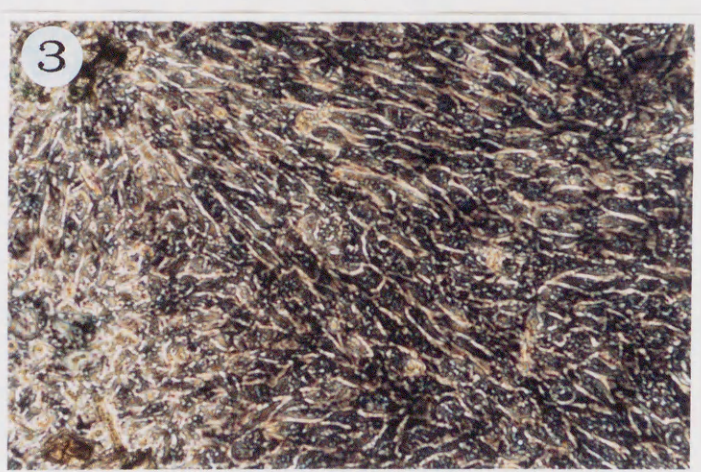
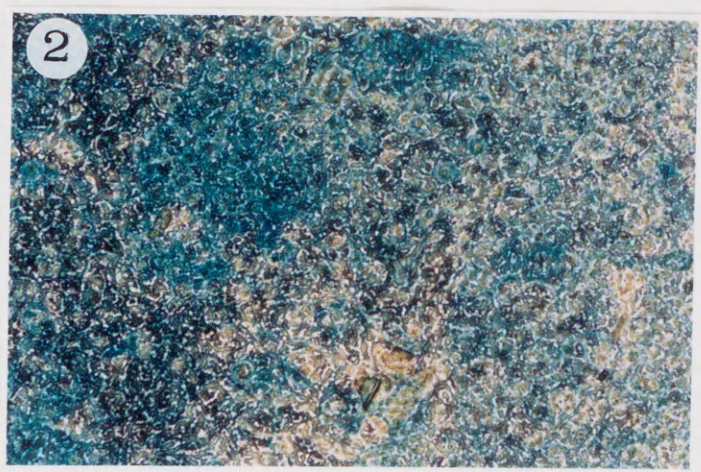
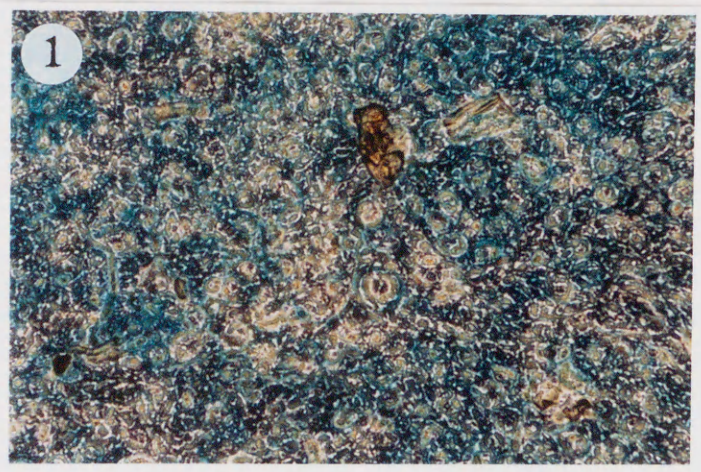
図 10
T. Nishida

↑
Top

A



B



C

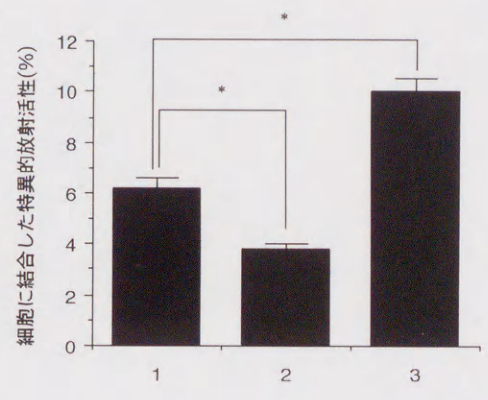


図 11

T. Nishida

↑
Top

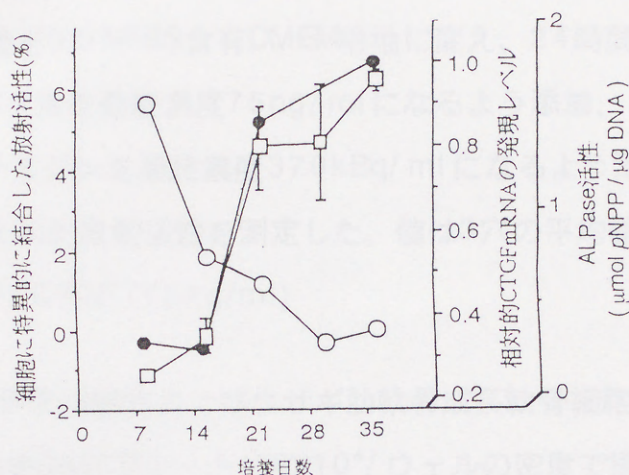


図 12

T. Nishida

IX. 図の説明

図1 HCS-2/8細胞から精製したCTGFのSDS-PAGE像(A)とHCS-2/8細胞のDNA合成に及ぼす精製CTGFタンパク質の影響

(A) HCS-2/8細胞から調製したCTGFタンパク質をSDS-PAGEし、銀染色を行った。36-38kDa付近にCTGFのバンドが認められる(矢印)。(B) HCS-2/8細胞を96穴プレートに 2×10^4 /ウェルの密度で播種し、サブコンフルエントに達するまで培養した。次いで培地を0.5%FBS含有DMEM培地に変え、24時間培養後、この培養系に精製CTGFタンパク質を最終濃度75ng/mlになるよう添加、さらに24時間培養した。その後、 $[^3\text{H}]$ チミジンを最終濃度370kBq/mlになるよう添加し、4時間ラベル後、細胞に取り込まれた放射活性を測定した。値は3穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

(1) 対照(PBS)、(2) CTGF (75ng/ml)

図2 rCTGFのHCS-2/8細胞およびウサギ肋軟骨成長軟骨細胞の増殖に及ぼす影響

(A) HCS-2/8細胞を96穴プレートに 2×10^4 /ウェルの密度で播種し、サブコンフルエントに達するまで培養した。培地を0.5%FBS含有DMEM培地に変え、24時間培養後、この培養系にrCTGFを図に示す濃度になるよう添加、さらに24時間培養した。その後、 $[^3\text{H}]$ チミジンを最終濃度370kBq/mlになるよう添加し、4時間ラベル後、セルハーベスターで細胞をガラスフィルター上に回収し、その放射活性を測定した。各濃度による値は3穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。対照としたPBS添加群の放射活性は 1.8×10^3 cpm/ウェルであり、縦軸はその値を100%とした時の相対値を示す。

(対照との有意差: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

(B) HCS-2/8細胞を24穴プレートに 5×10^4 /ウェルの密度で播種すると同時にrCTGFタンパク質を50ng/mlの濃度で添加した。3日目に培地交換し、同時にrCTGFを添加した。値は3穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。(●)は組換えCTGFタンパク質添加群を示し、(□)は対照としたPBS添加群を示す。

(対照との有意差: * $P < 0.05$)

(C) ウサギ肋軟骨成長軟骨細胞(RGC細胞)を96穴プレートに 1×10^4 /ウェルの密度で播種し、サブコンフルエントに達するまで培養した。培地を0.5%FBS含有 α MEM培地に変え、24時間培養後、rCTGF(30および50ng/ml)および抗CTGF抗体(IgG

画分)あるいは免疫前抗体(IgG画分)(50 μ g/ml)を添加、さらに24時間培養した。その後、 $[^3\text{H}]$ チミジンを最終濃度370kBq/mlになるよう添加し、4時間ラベル後、セルハーベスターで細胞をガラスフィルター上に回収し、その放射活性を測定した。値は3穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

(1) 対照(PBS), (2) rCTGF, 30ng/ml, (3) rCTGF, 50ng/ml, (4) rCTGF, 50ng/mlおよび抗CTGF抗体, 50 μ g/ml, (5) rCTGF, 50ng/mlおよび免疫前抗体, 50 μ g/ml

(対照との有意差: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) 本実験はそれぞれ独立して3回行い、同様の結果を得た。

図3 rCTGFがHCS-2/8細胞およびRGC細胞のプロテオグリカン合成に及ぼす影響
HCS-2/8細胞(A)あるいはRGC細胞(B)を48穴プレートに 4×10^4 /ウェルあるいは 2×10^4 /ウェルの密度で播種し、コンフルエントに達するまで培養した。培地を0.5%FBS含有DMEM培地に変え、24時間培養後、この培養系にrCTGFを図に示す濃度になるよう添加し、さらに5時間培養した。 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸を最終濃度370kBq/mlになるよう添加、17時間ラベル後、CPC沈澱画分の放射活性を測定し合計した。値は3穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。本実験はそれぞれ独立して2回行い、同様の結果を得た。(対照との有意差: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

図4 rCTGFがRGC細胞のALPase活性に及ぼす影響

RGC細胞を48穴プレートに 2×10^4 /ウェルの密度で播種し、細胞が重層するまで培養した。その後、培地を0.5%FBS含有DMEM培地に変え、同時にrCTGFを図に示す濃度添加し、72時間培養した。細胞を“材料と方法”に示すように回収し、ALPase活性を測定した。また、同じ試料を用いてタンパク定量を行った。値は3穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示し、縦軸は1 μ gタンパク質あたりのpNPPの分解量を示す。本実験はそれぞれ独立して2回行い、同様の結果を得た。

(対照との有意差: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

図5 HCS-2/8細胞におけるPDGF受容体遺伝子およびPDGF受容体 β 型タンパク質の発現

(A) HCS-2/8細胞からtotal RNAを抽出し、RT-PCR法によりPDGF受容体遺伝子の発現を調べた。

M: 100 base pair ラダーマーカー, レーン1: PDGF受容体 α 型, レーン2: PDGF受容体 β 型 使用した特異的プライマーの塩基配列と予想される増幅産物の大きさは表1に示す。

(B) HCS-2/8細胞をコンフルエントまで培養後、培地を0.5%FBS含有DMEM培地に変え、24時間培養した。この培養系に、精製CTGFタンパク質(75ng/ml)および組換えPDGF-BBタンパク質(50ng/ml)を添加し、5分間刺激した。その後、細胞を可溶化し、抗PDGF受容体 β 型抗血清を用いたWestern blotを“材料と方法”に示すように行った。

レーン1: 組換えPDGF-BBタンパク質刺激した群, レーン2: 精製CTGFタンパク質刺激した群, レーン3: 対照(PBS添加群)

矢印はPDGF受容体 β 型タンパク質を示す。

図6 HCS-2/8細胞に対する ^{125}I -rCTGFの結合

(A) HCS-2/8細胞を24穴プレートに播種し、コンフルエントに達するまで培養した。結合緩衝液Aを加え、4°Cで15分間インキュベート後、 ^{125}I -rCTGFを 2×10^4 cpmになるよう添加し、4°Cあるいは37°Cで図に示す時間インキュベートした。

0.1% BSA-PBSで5回洗浄後、1.0N NaOHで細胞を可溶化し、その可溶化液を γ -カウンターで測定した。縦軸はHCS-2/8細胞培養系に添加した総放射活性に対する細胞に結合した放射活性の割合を示す。値は2穴の平均値を示す。

(B) HCS-2/8細胞を48穴プレートに播種し、コンフルエントに達するまで培養した。結合緩衝液Aを加え、4°Cで15分間インキュベートした。その後、図の横軸に示す放射活性の ^{125}I -rCTGFを添加し、4°Cで2時間インキュベートした。

0.1%BSA-PBSで5回洗浄後、1.0N NaOHで細胞を可溶化し、その可溶化液を γ -カウンターで測定した。縦軸は“材料と方法”に示すように細胞に結合した特異的放射活性を示す。値は2穴の平均値を示す。本実験は独立して2回行い、同様の結果を得た。

図 7 (A) ^{125}I -rCTGFのHCS-2/8細胞の結合に対する非標識rCTGF, PDGF-BB, あるいはbFGFの影響

HCS-2/8細胞を24穴プレートに播種し、コンフルエントに達するまで培養した。結合緩衝液 Aを加え、4℃で15分間インキュベート後、 ^{125}I -rCTGFを 2×10^4 cpm および図(A)の横軸に示す濃度の競合物質、すなわち非標識rCTGF(●), PDGF-BB (■)あるいはbFGF(▲)を共存添加し、4℃で2時間インキュベートした。0.1%BSA-PBSで5回洗浄後、1.0N NaOHで細胞を可溶化し、その可溶化液をγ-カウンターで測定した。競合物質を加えない時の細胞に結合した放射活性はおよそ8%であり、縦軸はその値を100%とした時の相対値を示す。値は2穴の平均値±標準偏差を示す。(B) 図7Aの競合物質として非標識rCTGFを用いた時の結合試験の結果をもとにスキッチャード解析を行った結果を示す。値は2穴の平均値を示す。本実験は独立して2回行い、同様の結果を得た。

図 8 HCS-2/8細胞のCTGF受容体と ^{125}I -rCTGFとの複合体の架橋実験

HCS-2/8細胞を3.5cmディッシュに播種し、コンフルエントに達するまで培養した。結合緩衝液Aを加え、4℃で30分間インキュベート後、 ^{125}I -rCTGFを 8×10^5 cpmおよび非標識rCTGF, PDGF-BBあるいはbFGFを共存添加し、4℃で3時間インキュベートした。“材料と方法”に示すよう ^{125}I -rCTGF・受容体複合体をDSSで架橋し、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーを行った。

レーン1:競合物質なし, レーン2-4:非標識rCTGF (それぞれ10ng/ml, 100 ng/ml, 1μg/ml), レーン5-7:非標識PDGF-BB (それぞれ10ng/ml, 100ng/ml, 1μg/ml), レーン8-10:非標識bFGF (それぞれ10ng/ml, 100ng/ml, 1μg/ml) 矢印はCTGF・受容体複合体を示す。本実験は独立して2回行い、同様の結果を得た。

図 9 HCS-2/8細胞のCTGF受容体と ^{125}I -rCTGFとの複合体の免疫沈降

図8の実験条件下で、 ^{125}I -rCTGF・受容体複合体を形成し、抗CTGF抗血清、抗PDGF受容体β型抗血清あるいは免疫前血清で免疫沈降し、SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーを行った。各レーンは以下の抗体で免疫沈降を行った結果を示す。

レーン1:抗CTGF抗血清, レーン2:抗PDGF受容体β型抗血清, レーン3:免疫前血清 矢印は抗CTGF抗体で免疫沈降されたCTGF・受容体複合体を示す。本実験は独

立して2回行い、同様の結果を得た。

図 10 HCS-2/8細胞のCTGF受容体のリン酸化実験

(A) HCS-2/8細胞を3.5cmディッシュに播種し、コンフルエントに達するまで培養した。リン酸不含DMEM培地で洗浄後、 $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸を最終濃度37MBq/mlになるよう添加し、37℃で1時間インキュベートした。PBSで洗浄後、rCTGF(50ng/ml)で5分および60分刺激した。“材料と方法”に示すようにDSSで架橋後、抗CTGF抗血清で免疫沈降し、SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィーを行った。

レーン1：対照(PBS添加後5分)，レーン2：rCTGF刺激後5分，レーン3：対照(PBS添加後60分)，レーン4：rCTGF刺激後60分

矢印はリン酸化されたCTGF・受容体複合体を示す。

(B) 矢印のバンドの黒化度をBAS2000で解析した結果を示す。縦軸は(1)の値を1とした時の相対値で示す。グラフ横軸の(1)-(4)はそれぞれAのレーン1-4に相当する。本実験は独立して2回行い、同様の結果を得た。

図 11 RGC細胞のプロテオグリカン産生量と ^{125}I -rCTGF結合量に対するPTHあるいはIL-1 β の影響

(A, B) RGC細胞にPBS (1)，0.1 μM のPTH (2)，あるいは100ng/mlのIL-1 β (3)で処置後、RGC細胞をコンフルエントに達するまで培養した。その後、100%エタノールで固定し、0.5%アルシャンブルー染色液で染色したシャーレを写真撮影(A)すると共に細胞形態を顕微鏡で観察(B)した。(倍率 x33倍)

(C) 各々の処置を施した細胞と ^{125}I -rCTGFとを“材料と方法”に示すようにインキュベートし、特異的に細胞に結合した放射活性を測定した。縦軸は細胞に結合した特異的放射活性を示す。値は2穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

(1) 対照(PBS)，(2) PTH添加群，(3) IL-1 β 添加群

本実験は独立して2回行い、同様の結果を得た。(対照との有意差： $* P<0.05$)

図 12 RGC細胞の分化過程における細胞への ^{125}I -rCTGFの結合量の変化

RGC細胞を24穴プレートに 3×10^4 /ウェルの密度で播種し、5週間培養した。図の横軸に示す培養日数で細胞 および total RNAを回収した。ALPase活性は“材料と

方法”に示すように測定し、1 μ gのDNA当たりのpNPPの分解量(μ mol)で示した。値は3穴の平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。CTGFmRNAの発現量はCTGF特異的プライマー(表1)を用いたRT-PCR法で定量した。 125 I-rCTGFの細胞への結合は細胞に結合した特異的放射活性により測定した。(□)はALPase活性を示す。(●)はCTGFmRNA発現量を示す。(○)はRGC細胞に結合した 125 I-rCTGFの特異的放射活性を示す。本実験は独立して2回行い、同様の結果を得た。

Demonstration of Receptors Specific for Connective Tissue Growth Factor on a Human Chondrocytic Cell Line (HCS-2/8)

Yukio Niwada, Tohru Nakanishi, Tsuyoshi Shimo,
Masahiro Asano, Takako Hattori, Takuya Tamatani,
Katsuhiko Teruka and Masaharu Takigawa

参考論文

Demonstration of Receptors Specific for Connective Tissue Growth Factor on a Human Chondrocytic Cell Line (HCS-2/8)

Takashi Nishida,¹ Tohru Nakanishi,¹ Tsuyoshi Shimo,¹ Masahiro Asano,² Takako Hattori,³ Takuya Tamatani,¹ Katsunari Tezuka,¹ and Masaharu Takigawa¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shimizu University School of Medicine, 522-8503, Iwata, Shizuoka 426-8601, Japan, and ²Department of Protein Research, Shimizu University School of Medicine, 522-8503, Iwata, Shizuoka 426-8601, Japan

Demonstration of Receptors Specific for Connective Tissue Growth Factor on a Human Chondrocytic Cell Line (HCS-2/8)

Connective tissue growth factor (CTGF) is a secreted protein that has been shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. In this study, we demonstrated the presence of receptors specific for CTGF on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). The receptors were identified by co-immunoprecipitation analysis. The results showed that CTGF binds to the receptors and activates the signaling pathway. The receptors were also shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. These findings suggest that CTGF plays a role in the regulation of cell growth and differentiation through its interaction with the receptors.

Connective tissue growth factor (CTGF) is a secreted protein that has been shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. In this study, we demonstrated the presence of receptors specific for CTGF on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8).

Takashi Nishida, Tohru Nakanishi, Tsuyoshi Shimo, Masahiro Asano, Takako Hattori, Takuya Tamatani, Katsunari Tezuka and Masaharu Takigawa

Connective tissue growth factor (CTGF) is a secreted protein that has been shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. In this study, we demonstrated the presence of receptors specific for CTGF on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). The receptors were identified by co-immunoprecipitation analysis. The results showed that CTGF binds to the receptors and activates the signaling pathway. The receptors were also shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. These findings suggest that CTGF plays a role in the regulation of cell growth and differentiation through its interaction with the receptors.

Connective tissue growth factor (CTGF) is a secreted protein that has been shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. In this study, we demonstrated the presence of receptors specific for CTGF on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). The receptors were identified by co-immunoprecipitation analysis. The results showed that CTGF binds to the receptors and activates the signaling pathway. The receptors were also shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. These findings suggest that CTGF plays a role in the regulation of cell growth and differentiation through its interaction with the receptors.

Recently, we demonstrated the presence of receptors specific for CTGF on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). The receptors were identified by co-immunoprecipitation analysis. The results showed that CTGF binds to the receptors and activates the signaling pathway. The receptors were also shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. These findings suggest that CTGF plays a role in the regulation of cell growth and differentiation through its interaction with the receptors.

Connective tissue growth factor (CTGF) is a secreted protein that has been shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. In this study, we demonstrated the presence of receptors specific for CTGF on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). The receptors were identified by co-immunoprecipitation analysis. The results showed that CTGF binds to the receptors and activates the signaling pathway. The receptors were also shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. These findings suggest that CTGF plays a role in the regulation of cell growth and differentiation through its interaction with the receptors.

Connective tissue growth factor (CTGF) is a secreted protein that has been shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. In this study, we demonstrated the presence of receptors specific for CTGF on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). The receptors were identified by co-immunoprecipitation analysis. The results showed that CTGF binds to the receptors and activates the signaling pathway. The receptors were also shown to be involved in the regulation of cell growth and differentiation. These findings suggest that CTGF plays a role in the regulation of cell growth and differentiation through its interaction with the receptors.

Demonstration of Receptors Specific for Connective Tissue Growth Factor on a Human Chondrocytic Cell Line (HCS-2/8)

Takashi Nishida,* Tohru Nakanishi,* Tsuyoshi Shimo,* Masahiro Asano,* Takako Hattori,* Takuya Tamatani,† Katsunari Tezuka,† and Masaharu Takigawa*¹

*Department of Biochemistry and Molecular Dentistry, Okayama University Dental School, Okayama 700-8525, Japan; and †Pharmaceutical Frontier Research Laboratories, Japan Tobacco, Inc., Yokohama 236-0004, Japan

Received May 17, 1998

The presence of receptors specific for connective tissue growth factor (CTGF) was demonstrated on a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8. The binding of ¹²⁵I-labeled recombinant CTGF to HCS-2/8 cells was inhibited by unlabeled CTGF but not by PDGF-BB or bFGF. Scatchard analysis revealed the presence of two classes of binding sites with K_d values of 18.6 and 259 nM on cells. A cross-linking study revealed the formation of ¹²⁵I-CTGF-receptor complex with an apparent molecular weight of 280 kDa. The ¹²⁵I-CTGF-receptor complex disappeared almost completely on the addition of unlabeled CTGF but not PDGF-BB or bFGF. In addition, the ¹²⁵I-CTGF-receptor complex was immunoprecipitated with anti-CTGF antiserum but not with anti-PDGF receptor antiserum. These findings suggest that CTGF directly binds to specific receptor molecules on HCS-2/8 cells. © 1998 Academic Press

Connective tissue growth factor (CTGF) is a cysteine-rich, heparin-binding protein isolated from conditioned medium of human umbilical vein endothelial cells as a growth factor structurally and functionally related to platelet-derived growth factor (PDGF) (1). Its gene belongs to the immediate early gene family (CCN family) which contains three distinct members (*cef10/cyr61*, *ctgf/fisp-12* and *nov*) whose encoded proteins are characterized by amino-acid sequence homology (about

60%), the presence of a secreting signal, and complete conservation of 38 cysteine residues (2). It is mitogenic for fibroblasts *in vitro* (1) and its gene expression was induced by transforming growth factor (TGF)- β in human fibroblasts (3). Because of these characteristics, CTGF is implicated in human atherosclerosis and fibrotic disorders such as systemic scleroderma (4, 5). In addition, TGF- β and CTGF mRNA are coordinately overexpressed during wound repair in an *in vivo* model of wound healing of rats (4, 5), indicating that CTGF may be one of the downstream effectors of TGF- β (6). However, the physiological function of CTGF both *in vitro* and *in vivo* is still unclear.

Recently, we cloned a mRNA preferentially expressed in chondrocytes from a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8 (7-11), by differential display-PCR (12). Its gene product was identical with CTGF. We found that CTGF mRNA selectively expressed in chondrocytic cells *in vitro*, and its expression was highest in hypertrophic chondrocytes of cartilage among various normal tissues (12). The expression was induced by the addition of TGF- β or bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (12). These findings suggest that CTGF plays important roles in chondrocyte differentiation.

Bradham *et al.* (1) suggested that CTGF bound to PDGF type β receptor because binding of partially purified CTGF on fibroblasts was competed by increasing concentrations of recombinant PDGF-BB. However, they did not clarify whether CTGF bound to a certain class of PDGF receptors or whether there was some cross reactivity of PDGF with CTGF receptors that are distinct from PDGF receptors. Kikuchi *et al.* (13) also suggest that CTGF and PDGF type α receptors may have some interactions but they only presented that mRNA expression of both CTGF and PDGF type α receptor upregulated in scleroderma fibroblasts.

In this study, we demonstrated for the first time the

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-86-235-6649. E-mail: takigawa@dent.okayama-u.ac.jp.

Abbreviations used: CTGF, connective tissue growth factor; rCTGF, recombinant CTGF; PDGF, platelet-derived growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; PMSF, phenylmethanesulphonyl fluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HEPES, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid].

presence of CTGF specific receptors on human chondrocytic cells, HCS-2/8, using radiolabeled recombinant CTGF (rCTGF) as a ligand.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Anti-CTGF antiserum was raised in rabbits by immunization with synthetic peptides of CTGF composed of 20 amino acids of CTGF (14). rCTGF was purified from serum-free media conditioned with HeLa cells transfected with pcDNA3.1(-) expression vector containing whole coding region of CTGF cDNA by electroporation using Gene Pulser (Bio-Rad Lab.). The media were concentrated by ammonium sulfate precipitation and then purified using heparin Sepharose affinity chromatography and anti-CTGF antibody affinity chromatography. Purity was determined by immunoblotting and silver staining of SDS-PAGE and highly purified (> 99%) fractions were used for experiments. Human PDGF-BB homodimer and basic fibroblast growth factor (bFGF) were purchased from Genzyme Diagnostics and R & D Systems, respectively. Anti-PDGF receptor antiserum was purchased from Upstate Biotechnology.

Cell cultures. A human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line (HCS-2/8) (7-11) was inoculated at a density of 1×10^5 cells/well in 16 mm diameter multiwell plates and 3×10^5 cells/dish in 35 mm-diameter dishes (Sumitomo Bakelite), and cultured in Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM) (Nissui Pharmaceutical) containing 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were cultured in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C until a confluent monolayer of cells was formed.

Iodination of rCTGF. Purified rCTGF was radiolabeled with Na¹²⁵I (Amersham International) using Iodogen (Pierce) following the manufacturer's protocol. The labeled products were purified by gel filtration (PD-10, Pharmacia Biotech) and eluted with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). The specific activity of the rCTGF was 1.51 MBq/ μ g.

Binding studies. Binding assay was performed by a modification of a method described previously (15, 16). Briefly, cell layers were washed with PBS and incubated with binding buffer A [DMEM containing 15 mM HEPES (pH 7.2) and 0.1% BSA] for 15 min at 4°C, and then incubated with ¹²⁵I-CTGF and other components for 2 h at 4°C. After the incubation, the cell layers were washed five times with chilled PBS containing 0.1% BSA and solubilized in 1.0 N NaOH. The radioactivity in the solution was measured by a Gamma counter. Nonspecific binding was determined by measuring the binding in the presence of 0.34 μ M unlabeled CTGF (about 300 fold of ¹²⁵I-CTGF). Specific binding was calculated by subtracting nonspecific binding from total binding.

Cross-linking of ¹²⁵I-CTGF to receptors. Cross-linking of ¹²⁵I-CTGF to HCS-2/8 cells was carried out following the methods of Kinoshita *et al.* (15). Briefly, after incubation with the radioligand for 3h, cell layers were washed with chilled binding buffer B [50 mM HEPES (pH 7.5) containing 128 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgSO₄ and 1.2 mM CaCl₂] and incubated with 0.15 mM disuccinimidyl suberate (DSS) in binding buffer B at 4°C. The reaction was terminated by addition of quenching buffer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose, 0.3 mM PMSF (pH 7.5)] at room temperature. Then, the quenching buffer was aspirated and the cells were solubilized with lysis buffer [10 mM Tris, 1 mM EDTA, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100 (pH 7.0) and protease inhibitors] for 1 h on ice. Insoluble debris was removed by centrifugation at $12,000 \times g$ for 15 min, and soluble extracts were mixed with sample buffer for SDS-PAGE [14 mM Tris (pH 6.8), 10% glycerol, 3% SDS, 180 mM 2-mercaptoethanol] (17).

Immunoprecipitation of ¹²⁵I-CTGF-receptor complex. ¹²⁵I-CTGF-receptor complex was immunoprecipitated (18) for overnight at 4°C with anti-CTGF antiserum or anti-PDGF receptor antiserum, then adsorbed using protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech). Beads

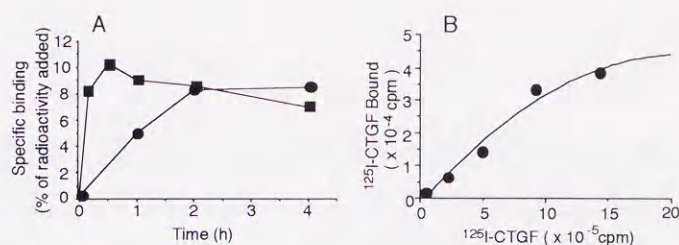


FIG. 1. (A) Time-course of ¹²⁵I-CTGF binding to HCS-2/8 cells. The cells were incubated with the ¹²⁵I-CTGF (5×10^4 cpm) at 4°C (●) or 37°C (■). Radioactivity bound to the cells was counted at the times indicated. The ordinate shows total binding. Each data point shows the mean of duplicate dishes. (B) Effect of the concentration of ¹²⁵I-CTGF on binding to HCS-2/8 cells. Radiolabeled CTGF was added to culture dishes at the counts indicated and the specific binding was calculated after a 2 h incubation at 4°C, as described in Materials and Methods. The ordinate shows specific binding. Each point is the mean of duplicate dishes.

were washed three times in binding buffer B and once in lysis buffer, and bound proteins were solubilized with sample buffer for SDS-PAGE. Solubilized proteins were separated on SDS-PAGE (17) and autoradiographed.

RESULTS

Binding of ¹²⁵I-CTGF to HCS-2/8 cells. The time-course of binding of ¹²⁵I-CTGF to HCS-2/8 cells at 37°C and 4°C is shown in Fig. 1A. On continued incubation of the labeled ligand with HCS-2/8 cells at 4°C, the total binding of ¹²⁵I-CTGF to HCS-2/8 cells increased to a plateau 2 h after the addition. The binding reached maximal level after incubation for 30 min at 37°C or 4 h at 4°C. Maximal binding was 8% on average of total radioactivity of ¹²⁵I-CTGF added. The effect of increasing concentrations of CTGF on the binding of ¹²⁵I-CTGF to HCS-2/8 cells is shown in Fig. 1B. Specific binding reaction was saturated at the concentration of approximately 1.05×10^{-8} M of ¹²⁵I-CTGF.

Competitive inhibition of ¹²⁵I-CTGF binding by unlabeled CTGF, PDGF-BB or bFGF. Figure 2 shows results of competitive binding assay in the steady state of binding. Addition of unlabeled CTGF decreased the binding of ¹²⁵I-CTGF to HCS-2/8 cells dose-dependently; the inhibition was observable at a concentration of 10 ng/ml and the binding was inhibited to 35% of the control level at a concentration of 2 μ g/ml (Fig. 2A). On the other hand, neither recombinant PDGF-BB nor bFGF inhibited the binding of ¹²⁵I-CTGF to HCS-2/8 cells (Fig. 2A). Scatchard analysis of the data indicated the presence of two classes of binding sites of CTGF on HCS-2/8 cells (Fig. 2B). The apparent dissociation constants (K_d) of the high and low affinity binding sites were 18.6 nM and 259 nM, respectively, and the numbers of these high and low affinity binding sites (B_{max}) were about 6.21×10^5 sites/cell and 6.18×10^6 sites/cell, respectively (Table 1).

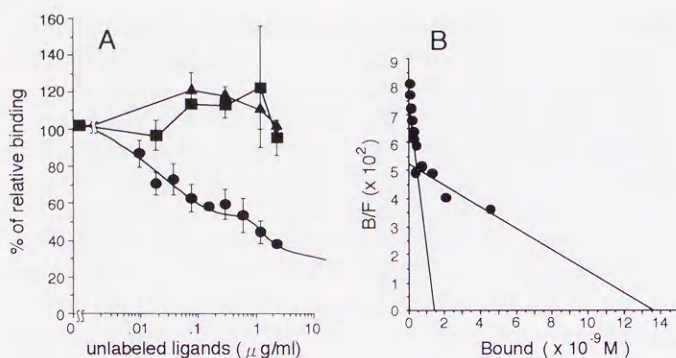


FIG. 2. (A) Competitive inhibition of ^{125}I -CTGF binding to HCS-2/8 cells by unlabeled CTGF, PDGF-BB or bFGF. Cells were incubated as described in Materials and Methods with the ^{125}I -CTGF (2×10^4 cpm) in the presence of the indicated concentrations of CTGF (●), PDGF-BB (■) and bFGF (▲) for 2 h at 4°C . The ordinate shows relative binding, comparing with the binding without competitors which is indicated as 100%. Each point is the mean $\pm$ S.D. of duplicated dishes. (B) Scatchard analysis of the data of Fig. 2A.

Cross-linking of CTGF receptors on HCS-2/8 cells with ^{125}I -CTGF. For characterization of the physicochemical properties of CTGF receptors, ^{125}I -CTGF was covalently attached to HCS-2/8 cells by treatment with DSS, and the labeled CTGF-receptor complex was separated by SDS-PAGE under reducing conditions. An autoradiogram of the gel revealed three major bands, with an apparent molecular weight of 280 kDa, 38 kDa and 18 kDa. The 280 kDa bands disappeared almost completely on the addition of $1 \mu\text{g/ml}$ of unlabeled CTGF but not by on the addition of the same concentrations of unlabeled PDGF-BB or bFGF (Fig. 3). The other bands with molecular weights of 38 and 18 kDa are, presumably, CTGF itself and its degradative form, respectively (Fig. 3).

Immunoprecipitation of CTGF from ^{125}I -CTGF-receptor complex. Figure 4 shows results for immunoprecipitation of ligand-receptor complex with anti-CTGF antiserum, anti-PDGF receptor antiserum or preimmune serum. Immunoprecipitations of lysates from ^{125}I -CTGF-bound HCS-2/8 cells with anti-CTGF antiserum, but not with anti-PDGF receptor antiserum nor preimmune serum, yielded a labeled product corresponding to 280 kDa (Fig. 4). Proteins of 38 and 18 kDa were also immunoprecipitated by the anti-CTGF antiserum from ^{125}I -CTGF-bound HCS-2/8 cells, fur-

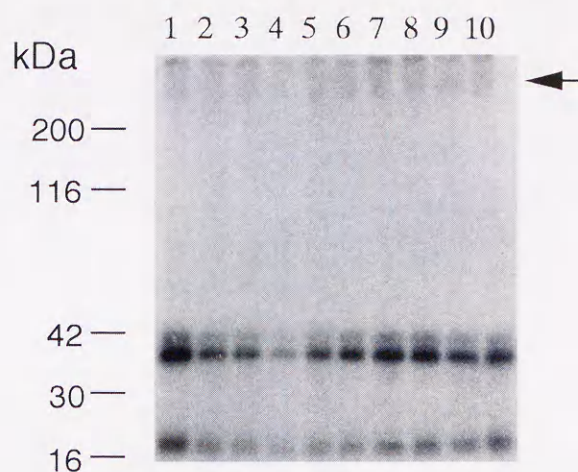


FIG. 3. Cross-linking of CTGF receptors with ^{125}I -CTGF. HCS-2/8 cells were incubated with ^{125}I -CTGF (8×10^5 cpm) in the presence of unlabeled CTGF, PDGF-BB or bFGF. After cross-linking the cells were rinsed, solubilized and then subjected to SDS-PAGE using 4-20% gradient polyacrylamide gels under reduced conditions. Control (without competitor: lane 1) and ^{125}I -CTGF in the presence of competitor: CTGF (lane 2: 1 ng/ml , lane 3: 100 ng/ml , lane 4: $1 \mu\text{g/ml}$), PDGF-BB (lane 5: 1 ng/ml , lane 6: 100 ng/ml , lane 7: $1 \mu\text{g/ml}$) and bFGF (lane 8: 1 ng/ml , lane 9: 100 ng/ml , lane 10: $1 \mu\text{g/ml}$). The arrow indicates the cross-linked complexes.

ther indicating that these bands were CTGF and its degradative form (Fig. 3).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated the presence of CTGF-specific receptors on HCS-2/8 cells. The binding of ^{125}I -CTGF was inhibited by the addition of unlabeled CTGF, but not by the addition of unlabeled PDGF-BB or bFGF (Fig. 2A). These findings indicated that labeled CTGF bound to its receptor on HCS-2/8 cells in a specific manner. Scatchard analysis demonstrated the presence of two classes of CTGF receptors on HCS-2/8 cells; their K_d values were 18.6 nM and 259 nM and their numbers per cell were 6.21×10^5 and 6.18×10^6 , respectively (Table 1). There has been a previous report that CTGF bound to PDGF receptors on fibroblasts (1). In that study, competition assays using ^{125}I -labeled CTGF were not performed, and they only demonstrated an inhibitory effect of PDGF-BB on the binding of partially purified CTGF to fibroblasts by immunoblots using anti-PDGF antibody which cross reacts with CTGF (1). In the present study, we produced and purified rCTGF from HeLa cells transfected with CTGF cDNA. A cross-linking study revealed three major bands of 280 kDa, 38 kDa, and 18 kDa which correspond to the complex of CTGF and CTGF receptor, CTGF itself and CTGF degradative form, respectively (Fig. 3). The molecular weight of the ligand-receptor complex indicated that the molecular weight of CTGF receptors on HCS-

TABLE 1

The Number and K_d Value of CTGF Receptors on HCS-2/8 Cells Calculated by Scatchard Analysis

	Sites/cell	K_d (M)
High affinity	6.21×10^5	1.86×10^{-8}
Low affinity	6.18×10^6	2.59×10^{-7}

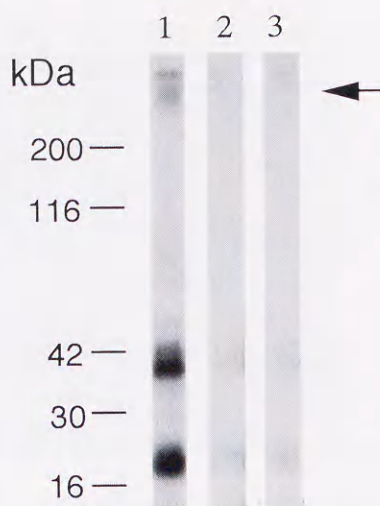


FIG. 4. Immunoprecipitation of ^{125}I -CTGF-receptor complex with either anti-CTGF antiserum or anti-PDGF receptor antiserum. HCS-2/8 cells were incubated with the ^{125}I -CTGF (8×10^5 cpm) and the ligand was cross-linked to the receptors with DSS as described in Materials and Methods. Then the ligand-receptor complex was immunoprecipitated from cell lysate and analyzed by SDS-PAGE using 4-20% gradient polyacrylamide gels under reducing conditions. Immunoprecipitates of ^{125}I -CTGF-receptor complex with either anti-CTGF antiserum (lane 1), anti-PDGF receptor antiserum (lane 2) or preimmune serum (lane 3). The arrow indicates the complexes precipitated with anti-CTGF antiserum.

2/8 cells is about 240 kDa. The molecular weight of this putative receptor of CTGF was greater than that (180 kDa) of PDGF type β receptor (19) previously reported as CTGF receptor (1, 13). Both the cross-linking study and the immunoprecipitation experiment also revealed that the 280 kDa band disappeared with unlabeled CTGF but not PDGF-BB or bFGF, suggesting that these bands are the complex of CTGF and its specific receptor, and that CTGF binds to this 240 kDa-specific receptor on HCS-2/8 cells.

In our cross-linking experiment, we iodinated 38 kDa CTGF, but a 18 kDa band was observed in addition to the 38 kDa CTGF band (Fig. 3). Recently, Brigstock *et al.* (20) purified low molecular mass forms of CTGF with heparin-binding activity in uterine secretory fluids. They reported a molecular mass of 10 kDa, 16 kDa, and 20 kDa, and that the 20 kDa and 16 kDa CTGF proteins are likely intermediates in proteolytic cleavage of 38 kDa CTGF to 10 kDa CTGF. These findings suggest that the 18 kDa molecule is a cleaved form of 38 kDa CTGF.

Many cell membrane receptors are composed of several different subunits. For example, FGF and hepatocyte growth factor binds to its signaling receptors which are endowed with tyrosine kinase activities with high affinity (21, 22). However, the same growth factors also bind with low affinity to cell surface proteoglycans that cannot transmit signals alone. The recent receptor

model of bFGF proposed by Richard *et al.* (23) is novel in that it is composed of three components; a binding molecule on one cell (heparan sulfate), a nominally soluble growth factor, and a transmembrane receptor on a second cell type. In this study, we demonstrated the presence of two classes of receptors on HCS-2/8 cells. In our preliminary experiments, CTGF promoted the proliferation of HCS-2/8 cells (unpublished). Considering the receptor model of bFGF, the low affinity receptor on HCS-2/8 cells may be proteoglycan, and CTGF, membrane-anchored on cells by this low affinity receptor, may interact with its transmembrane receptor with high affinity on the same cell or the second cell, exhibiting biological activity. Further investigations are needed to clarify the localization, structure and function of these CTGF-specific receptors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Kojiro Takahashi for useful discussions, Dr. Takuo Fujisawa for technical assistance, and Mrs. Etsuko Fujisawa for secretarial assistance. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan and grants from the Sagawa Cancer Research Foundation, the Naito Foundation, and the Nakatomi Health Science Foundation.

REFERENCES

1. Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L., and Grotendorst, G. R. (1991) *J. Cell Biol.* **114**, 1285-1294.
2. Bork, P. (1993) *FEBS Lett.* **327**, 125-130.
3. Igarashi, A., Nashiro, K., Kikuchi, K., Sato, S., Ihn, H., Grotendorst, G. R., and Takehara, K. (1995) *J. Invest. Dermatol.* **105**, 280-284.
4. Oemar, B. S., and Lüscher, T. F. (1997) *Arterio. Throm. Vascular Biol.* **17**, 1483-1489.
5. Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D. M., and Grotendorst, G. R. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 637-645.
6. Kothapalli, D., Frazier, K. S., Welply, A., Segarini, P. R., and Grotendorst, G. R. (1997) *Cell Growth Differ.* **8**, 61-68.
7. Takigawa, M., Tajima, K., Pan, H.-O., Enomoto, M., Kinoshita, A., Suzuki, F., Takano, Y., and Mori, Y. (1989) *Cancer Res.* **49**, 3996-4002.
8. Takigawa, M., Pan, H.-O., Kinoshita, A., Tajima, K., and Takano, Y. (1991) *Int. J. Cancer* **48**, 717-725.
9. Enomoto, M., and Takigawa, M. (1992) in *Biological Regulation of the Chondrocytes* (Adolphe, M., Ed.), pp. 321-338, CRC Press, Boca Raton, FL.
10. Zhu, J. D., Pan, H.-O., Suzuki, F., and Takigawa, M. (1994) *Jpn. J. Cancer Res.* **85**, 364-371.
11. Tuckwell, D. S., Ayad, S., Grant, M. E., Takigawa, M., and Humphries, M. J. (1994) *J. Cell Sci.* **107**, 993-1005.
12. Nakanishi, T., Kimura, Y., Tamura, T., Ichikawa, H., Yamaai, Y., Sugimoto, T., and Takigawa, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 206-210.
13. Kikuchi, K., Kadono, T., Ihn, H., Sato, S., Igarashi, A., Nakagawa, H., Tamaki, K., and Takehara, K. (1995) *J. Invest. Dermatol.* **105**, 128-132.
14. Shimo, T., Nakanishi, T., Kimura, Y., Nishida, T., Ishizeki, K.,

- Matsumura, M., and Takigawa, M. (1998) *J. Biochem.* **124**, in press.
15. Kinoshita, A., Takigawa, M., and Suzuki, F. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 14–20.
16. Takigawa, M., Kinoshita, A., Enomoto, M., Asada, A., and Suzuki, F. (1991) *Endocrinology* **129**, 868–876.
17. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685.
18. Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F., and Massagué, J. (1992) *Cell* **71**, 1003–1014.
19. Glenn, K., Bowen-Pope, D. F., and Ross, R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 5172–5176.
20. Brigstock, D. R., Steffen, C. L., Kim, G. Y., Vegunta, R. K., Diehl, J. R., and Harding, P. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20275–20282.
21. Schlessinger, J., Lax, I., and Lemmon, M. (1995) *Cell* **83**, 357–360.
22. Lyon, M., Deakin, J. A., Mizuno, K., Nakamura, T., and Gallagher, J. T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11216–11223.
23. Richard, C., Liuzzo, J. P., and Moscatelli, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24188–24196.

