

氏名	中山 康 弘
学位の種類	歯学博士
学位授与番号	博 甲 第 813 号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 28 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第 5 条第 1 項該当）
学位論文題目	Functional modes of retinoic acid in mouse osteoblastic clone MC3T3-E1, proved as a target cell for retinoic acid
論文審査委員	教授 谷口茂彦    教授 西嶋克巳    教授 永井教之

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

[緒言] レチノイドは哺乳動物の骨の発達に不可欠である。in vitroにおいて、レチノイドはラット胎児長管骨の骨吸収を促進し、ニワトリおよびマウスの頭蓋骨のコラーゲン合成を抑制することが知られている。これらの事実は明らかに骨がレチノイドの標的器官であることを示唆している。そこで骨におけるレチノイドの標的細胞の同定および作用機構の解明が次の重要な課題となる。ところで最近、発達途上にあるマウス指骨のin situ ハイブリダイゼーション法を用いた組織化学的検索により、石灰化前線の骨芽細胞と推定される領域にレチノイン酸レセプター（RAR）の mRNA が強く発現している事実が報告され、骨芽細胞がレチノイン酸（RA）の標的細胞である可能性が示唆された。

本研究では、1981年に小玉が樹立したマウス頭蓋骨由来骨芽細胞株MC3T3-E1細胞におけるRARの mRNA の発現をノーザンブロット分析により検出し、この骨芽細胞がRAの標的細胞であることを実証した。また、in vitroにおける骨形成に先行して高レベルのアルカリホスファターゼ（ALP）を発現するこのMC3T3-E1細胞において、その増殖およびALP発現におよぼすRAの効果を調べた。その結果、増殖に対しては抑制的な、ALPに対しては促進的なRAの作用が示され、RAの骨形成の制御因子としての機能様式が明らかにされた。さらに、上皮成長因子（epidermal growth factor; EGF）のこの細胞に対するDNA合成促進作用に及ぼすRAの効果は、増殖段階に依存的であるという興味ある結果を得た。

#### [実験方法]

1. 細胞培養：MC3T3-E1細胞（ $4.5 \times 10^4$  / 35mm $\phi$  plastic dish）を10% FCS添加 $\alpha$ -MEM培地で適当期間培養し、ノーザンブロット分析に供した。また、同培養条件下でsubconfluent および confluent 段階に達した細胞を、各濃度のRAを添加した新しい培地（ $\alpha$ MEM / 2% FCS）に移し、適当時間incubation後、諸パラメーターの測定を行

った。

2. ノーザンブロット分析：培養期間を異にするMC3T3-E1細胞からguanidinium thiocyanate / CsCl 法により全RNAを採取した。アガロースゲル上で電気泳動した全RNAをナイロンメンブレン上に転写し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$  で標識されたプローブをハイブリダイゼーションさせ、オートラジオグラムで検出した。なお、プローブには P. Chambon 博士 (CNRS, Strasbourg, France) より恵与を受けたヒト・RAR $\alpha$ cDNA から作製したリボプローブを用いた。

3. 細胞増殖およびALP活性：細胞数はCoulter counterで、ALP活性は破壊処理した細胞を p-nitrophenyl phosphateを基質としてpH 9.8で測定した。

4. thymidine 取り込みおよびEGF結合試験：EGF (10ng/ml) の存在、非存在下で incubationした細胞を、 $[\text{H}^3]\text{thymidine}$  で1 hパルス後、取り込み能を測定し、細胞のDNA合成に対するRAとEGFとの共存効果を調べた。また、EGF非存在下で incubationした細胞に対する $[\text{I}^{125}]\text{EGF}$ の結合量を測定し、EGFの特異的結合のレベルに及ぼすRAの効果を調べた。

#### [実験結果]

1. RAR遺伝子の発現：検定し得た培養時期(5, 7, 21日)を通じて、MC3T3-E1細胞からRARのmRNAが検出され、RARのsubtype,  $\beta$ および $\gamma$ が発現していると推定された。

2. RAの増殖およびALP活性に及ぼす効果：RAは増殖に関しては subconfluent およびconfluent の両方の段階で抑制的に作用し、一方、ALP活性に関しては confluent段階で促進的に作用していた。

3. EGFのDNA合成促進作用および細胞に対する結合能に及ぼすRAの効果：EGF単独では、subconfluent および confluent 段階の MC3T3-E1 細胞の DNA 合成に促進的に作用した。この系にRAが共存する場合、EGFのDNA合成促進作用に対してRAは、対数増殖期(subconfluent 段階)では促進的に作用し、対数増殖期を過ぎ骨形成に先行してALP活性が発現開始される confluent 段階では逆に抑制的に作用した。また、subconfluent 段階のMC3T3-E1細胞に対するEGFの特異的結合のレベルは、RAの濃度に依存的に増加した。このEGF結合レベルの増加は、subconfluent 段階におけるEGFによるDNA合成促進作用に対するRAの増強効果と正の相関が見られた。

#### [考察・結論]

MC3T3-E1細胞でRAR遺伝子が発現している事実をここに初めて示し、この骨芽細胞がRAの標的細胞であることを直接的に証明した。さらに、この細胞に対するRAの機能は増殖段階に依存的な様式をとるという興味深い事実が明らかとなった。subconfluent 段階ではEGF依存的な増殖に対して支持的に作用し、confluent段階では逆に抑制的に作用し、骨形成という機能の発現に支持的であった。このような分化時期に応じて作動する制御様式の、RAの化骨分化過程における生理機能を解明するうえでの重要性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

morphogen (形原) として注目されるレチノイン酸のレセプターの遺伝子が、マウス成長骨の骨内膜で特異的に発現されている事実の in situ hybridization による確認が、本学よりの研究論文によりすでに報告されている。本研究は、これを受けてマウス頭蓋骨由来の骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞で、レチノイン酸レセプターの遺伝子が発現している事実を培養細胞のレベルで示し、この骨芽細胞がレチノイン酸の標的細胞であることを証明したものである。また、アパタイト沈着期に至る以前のこの培養細胞系の増殖相におけるレチノイン酸の効果の研究からは、その効果が増殖段階に依存する様式をとること、また単相増殖後のアルカリホスファターゼの促進の事実などに見られるように骨形成に伴う分化機能の発現に支持的であると総括された。本研究はこのように重要な新知見を得たものであり、価値ある業績と認める。

よって、本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。