



Title	Effect of transforming growth factor- on insulin-like growth factor-autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes
Author(s)	塚崎, 智雄
Citation	(1996-03-31)
Issue Date	1996-03-31
URL	http://hdl.handle.net/10069/29281
Right	

This document is downloaded at: 2019-06-25T10:15:27Z

塚崎 智 雄 (大分県) 昭和36年5月29日生

授与年月日 平成8年3月31日

主 論 文 Effect of transforming growth factor- β on insulin-like growth factor-I autocrine/ paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes.

ラット培養関節軟骨細胞における transforming growth factor- β の insulin-like growth factor-I オートクライン/パラクライン系に及ぼす影響

Tomoo Tsukazaki, Toshiro Usa, Tomoko Matsumoto, Hiroshi Enomoto, Akira Ohtsuru, Hiroyuki Namba, Katsuro Iwasaki, Shunichi Yamashita *Exp Cell Res* vol. 215, No. 1, 9-16, 1994

長崎大学医学部原研発症予防部門

(主任：山下俊一教授)

論文内容の要旨

緒 言

軟骨組織は豊富な細胞外基質から構成されており、関節軟骨の増殖、分化は軟骨細胞自体から産生される増殖因子やサイトカインで調整されている。その中で TGF- β は前駆型としてあるいは結合蛋白との複合体として細胞外基質に多量に蓄積されているが、炎症などで細胞外基質が破壊されると活性型になり、軟骨の修復を促進すると考えられている。一方 IGF-I も軟骨細胞における重要な局所成長因子であり、これも各種結合蛋白の調整を受け、その生物学的活性が修飾される。しかし、これら因子の関節軟骨細胞における増殖、分化に関する相互作用及びその作用機序については不明であった。本研究ではラット関節軟骨の培養系で両者の作用の違いと相互作用の有無を検討した後、作用機序の解明の一環として TGF- β 1 の IGF-I オートクライン/パラクライン系に及ぼす影響を明らかにした

材料および方法

- 1) 細胞培養：5週齢のラット関節軟骨から軟骨細胞を分離し、5% CO₂下、10% FBS 含有 DMEM 培地で培養後、一度継代し、以下の実験に使用した。
- 2) DNA 合成能：単層培養した軟骨細胞に TGF- β 1 (0.1~10ng/ml), IGF-I (1-50ng/ml) を単独もしくは同時に添加し、24時間後の BrdU 取り込み量で評価した。
- 3) アグリカン mRNA の発現調節：軟骨細胞の分化の指標であるアグリカンの発現量をノーザンプロット法で評価した。
- 4) TGF- β 1 による IGF-I の産生調整：以上の実験より TGF- β 1 と IGF-I に細胞増殖、分化誘導能

に相乗作用が観察されたので、その作用を解明すべく、TGF- β 1 の IGF-I のオートクライン/パラクライン系に及ぼす影響を調べた。まず TGF- β 1 添加後の培養液中の IGF-I 濃度を RIA で、mRNA 量をノーザンプロット法で検討した。

- 5) IGF-I 結合蛋白のウェスタンリガンドプロット：培養液を SDS-PAGE で展開し、メンブランに転写後、¹²⁵I-IGF-I をリガンドに用い、検出した。
- 6) IGF-I のレセプター結合試験：TGF- β 1 刺激12時間後の IGF-I レセプターの結合能の変化を¹²⁵I-IGF-I をトレーサーに用い、検討した。
- 7) IGF-I レセプターの自己リン酸化：³⁵S-メチオニンでラベルした軟骨細胞に各因子を添加し、5分後に抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE で展開することで IGF-I レセプターの自己リン酸化を調べた。

結 果

- 1) TGF- β 1 (0.1~10ng/ml) では濃度依存性に、IGF-I (1~50ng/ml) では25ng/ml の濃度をピークに DNA 合成能を促進した。TGF- β 1 (1 ng/ml), IGF-I (25ng/ml) 単独でコントロールのそれぞれ 6.5, 2.1倍増加させ、両者の同時添加では10.4倍と軽度の相乗効果を示した。
- 2) アグリカンの発現量も IGF-I で25ng/ml の濃度をピークに、TGF- β 1 では濃度依存性に増加した。そして IGF-I と TGF- β 1 の同時刺激では発現量に相乗効果がみられた。
- 3) TGF- β 1 (0.1~10ng/ml) は IGF-I 産生を蛋白、mRNA レベルで濃度依存性に抑制した。
- 4) ウェスタンリガンドプロットで TGF- β 1 は32Kd の IGF 結合蛋白量には影響を与えなかったが、41 Kd の結合蛋白を濃度依存性に減少させた。
- 5) TGF- β 1 (1 ng/ml) による前処置は IGF-I レセプターのアフィニティーを変化させることなく、レセプター数を約40%上昇させた。
- 6) 免疫沈降実験では IGF-I 刺激で IGF-I レセプター、IRS-I の自己リン酸化は増強されたが、TGF- β 1 との同時添加ではむしろ減少した。

考 察

一般に TGF- β 1 は強力な分化誘導因子であるが、細胞増殖に対して上皮系細胞では抑制的に作用する。これに対し、間葉系細胞では分化誘導とともに細胞増殖にも促進的に作用するとされている。今回我々が用いたラット関節軟骨の単層培養系では他の細胞種に較べ、TGF- β 1 が軟骨分化だけでなく細胞増殖も著明に促進した。更に TGF- β 1 と IGF-I との組み合わせで相乗的に作用することが明らかになった。

TGF- β 1 と IGF-I の相互作用を解明するにあたり、我々は比較的作用機序の解明されている IGF-I のオートクライン/パラクライン機構に対する TGF- β 1 の作用に注目した。その結果 TGF- β 1 は IGF-I 系を複雑なメカニズムで制御していることが推測された。すなわち TGF- β 1 は長期間の刺激で IGF-I 産生を抑制し、IGF-I レセプター数を増加させ、そして 41Kd の IGF 結合蛋白の産生を抑制した。一方短期間の刺激では IGF-I のシグナル伝達経路の初期に起こるレセプターの自己リン酸化を抑制した。TGF- β 1 による IGF-I の産生抑制とレセプター数の増加はネガティブフィードバック機構で説明し得るが、41Kd IGF 結合蛋白に関しては軟骨細胞における生理作用が不明であるため推測の域を出ないが、同蛋白の分子量が一般に IGF-I の作用を増強するといわれる 3 型結合蛋白 (IGFBP3) に相当する事から、TGF- β 1 は IGF-I 系に対しやはり抑制的に作用しているのかも知れない。TGF- β 1 の IGF-I レセプターのリン酸化抑制のメカニズムに関しては不明であるが、TGF- β 1 はある種のフォスファターゼを活性化すると報告もあり、今後 PI3-K, PLC も含めたさらなる解析が必要と考えられる。

以上の結果より関節軟骨における TGF- β の増殖因子としての重要性が示唆された。軟骨の修復機序の解明は変形性関節症の病態解明につながり、TGF- β の臨床応用の道を開くものである。この為には TGF- β と IGF-I の相互作用の分子機構だけでなく、TGF- β そのものの作用機構の解明が待たれる。近年、TGF- β がレセプターの一環がクローニングされ、その情報伝達経路も徐々にではあるが、明らかにされつつある。ラット関節軟骨を用いて TGF- β の多様な生理作用を解析することは細胞分化や増殖の普遍的な重要性の発見にもつながるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

塚崎智雄は昭和61年3月島根医科大学医学部を卒業し、同年5月、医師国家試験に合格した。同年6月より島根医科大学附属病院整形外科、長崎大学医学部附属病院整形外科で研修後、諫早整肢療育園、大分県立病院、国立療養所所川棚病院、壱岐公立病院に勤務し、平成4年4月に長崎大学大学院医学研究科に入学した。以来、原爆後障害医療研究施設、発症予防部門で山下俊一教授の指導の下に、関節軟骨に及ぼす各種サイトカイン、増殖因子の研究を行い、平成7年主論文 Effect of transforming growth dactor- β on Insulin-like growth factor- I autocrine/ paracrine axis in cultured rat articular chondrocystes を完成し、参考論文9篇を附して長崎大学大学院医学研究科委員会に学位を申請した。長崎大学医学部研究科委員会はこれ

を平成7年11月1日の定例委員会に付議し、論文内容の要旨を検討審議した結果、受理しても差し支えないものと認めたので、下記の通り審査委員会を選定した。主査を中心として慎重審査の上、平成7年12月6日の定例委員会でその結果を報告した。

主論文は軟骨細胞におけるトランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor- β 以下 TGF- β) とインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor 以下 IGF-I) の作用を検討したものである。ラット関節軟骨の単層培養系に TGF- β 1 と IGF-I を添加すると、DNA 合成能、細胞分化とも促進されるが、その作用は TGF- β 1 の方が IGF-I より強力であり、また同時に添加すると相乗作用を示すことを明らかにした。そしてこのメカニズムを明らかにする目的で TGF- β 1 の IGF-I のオートクライン、パラクライン系に及ぼす影響を検討している。TGF- β 1 は IGF-I 添加による IGF-I レセプター及びインスリンレセプター基質 (IRS-I) の自己リン酸化を抑制した。一方、IGF-I のレセプター数は TGF- β 1 で増加することを明らかにした。以上の結果より、TGF- β 1 と IGF-I は軟骨細胞の細胞増殖や分化に促進的に作用するものの、IGF-I のオートクライン、パラクライン機構に TGF- β 1 は抑制的に作用しているものと推定された。IGF-I レセプター数の増加はネガティブフィードバック機構によるものと推測している。

研究委員会は審査委員の報告に基づき、これを討論に付して審議した結果、本論文は TGF- β 1 と IGF-I の軟骨細胞における相互作用を明らかにし、今後軟骨代謝学、臨床整形外科学分野に与える影響は大きく、意義のある研究であったと判断する。医学研究科委員会は審査委員の報告に基づいて、これを討論に付して審査した結果、学位に値するものとして合格とした。

審査担当者	主査	教授	近藤	宇史
	副査	教授	長瀬	重信
	副査	教授	藤井	徹