

氏	中 尾 匡 志
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 3 0 9 9 号
学位授与の日付	平 成 1 8 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科生体制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Collaborative action of M-CSF and CTGF/CCN2 in articular chondrocytes : Possible regenerative roles in articular cartilage metabolism. (軟骨細胞におけるマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)と結合組織成長因子(CTGF/CCN2)の協調的作用—関節軟骨代謝における組織再生的役割の可能性—)導性Vascular endothelial growth factor 165の発現を増強する)
論文審査委員	教授 山本 照子 教授 窪木 拓男 教授 滝川 正春

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

マクロファージコロニー刺激因子 macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)は線維芽細胞、上皮細胞、骨芽細胞など多彩な細胞により産生されることが知られている。その名のとおり単球/マクロファージ前駆細胞の分化増殖を促進するサイトカインとして単離されたが、骨格系での機能については破骨細胞形成に重要であることが知られているものの、軟骨におけるその分布、役割に関する知見は少ない。過去の報告から、炎症時に関節軟骨細胞においてM-CSF遺伝子が発現することはすでに知られているが、軟骨組織におけるM-CSFの機能的側面は今のところまったく未解明である。そこで、本研究ではヒトの軟骨細胞様細胞株とラット初代膝関節軟骨細胞を用い軟骨細胞におけるM-CSFの産生とその作用を *in vivo* および *in vitro* で検討した。

### [方法]

① 細胞の培養： ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株 (HCS-2/8)、非軟骨細胞株の HSC-3 (ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株) HeLa(ヒト子宮頸部癌由来細胞株) および SaOS2 (ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株) は 10% ウシ胎児血清 (FBS) 添加の D-MEM を用い、また、初代ラット膝関節軟骨はウイスターラットの膝関節より分離し、10%FBS 添加の  $\alpha$ -MEM を用い、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。② RNA の回収と定量： 培養細胞を M-CSF で刺激の後、ISOGEN を用いて RNA を抽出し、逆転写後、*m-csf* および *ctgf/ccn2* の発現量をリアルタイム PCR 法にて定量、比較した。③ ELISA 法による CTGF/CCN2 の定量：コンフルエントに達した HCS-2/8 細胞を 24 時間無血清培地で維持後、M-CSF で刺激し、さらに 12 時間後に細胞側のタンパク質を回収、株式会社ニチレイと共同開発中の ELISA キットにより CTGF/CCN2 を測定した。

④ プロテオグリカンの合成能の評価:コンフルエントに達した HCS-2/8 細胞を 24 時間無血清培地にて維持した後、M-CSF を種々の濃度で添加し、5-22 時間後のセチルピリジニウムクロライド不溶性画分への [<sup>35</sup>S]硫酸の取り込み量を測定し、プロテオグリカン合成能の指標とした。⑤ OA(変形性関節症)モデルラットの作製: モノヨード酢酸 60mg/ml を右膝関節腔に約 6mg の適用量で注入し、同じ個体の左膝関節腔に対照として PBS を注入した。14 日後、OA モデルラットの膝関節パラフィン切片を作成した。⑥ 免疫染色: 膝関節パラフィン切片を通法にしたがって脱パラフィン後、血清アルブミンでブロッキングし、抗 M-CSF 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) にて免疫染色を行った。  
[結果]

① HCS-2/8 細胞は軟骨細胞以外の他のヒト細胞株と比較し、*m-csf* および *ctgf/ccn* を高発現していた。② HCS-2/8 細胞を M-CSF で刺激すると *ctgf/ccn2* 遺伝子の発現が亢進した。また、CTGF/CCN2 タンパク質の産生が増加した。同様の現象はラット初代膝関節軟骨培養細胞でも観察された。③ HSC-3 細胞、HeLa、SaOS2 の軟骨細胞以外の細胞においても、軟骨細胞と同様に M-CSF は *ctgf/ccn2* 遺伝子の発現を上昇させた。④ M-CSF は *ctgf/ccn2* 遺伝子ばかりでなく、*m-csf* 遺伝子の発現も濃度依存的に誘導した。⑤ M-CSF 添加により HCS-2/8 細胞のプロテオグリカン合成能が亢進した。その効果は *ctgf/ccn2* を誘導する濃度よりも低濃度から濃度依存的に見られた。⑥ OA モデル組織ではクラスタリングを起こした軟骨細胞部分に M-CSF の局在が見られた。

#### [考察]

本研究で軟骨細胞において M-CSF が CTGF/CCN2 を誘導することが明らかになった。また、M-CSF が軟骨細胞の形質発現を賦活することも明らかとなった。さらに、OA における M-CSF 産生細胞の分布は CTGF/CCN2 産生部位と一致した。これらのことから、M-CSF は関節軟骨の再生分子として、いくつかの異なる機序で作用すると考えられる。すなわち、1 つは低濃度でのプロテオグリカン合成の上昇に代表される関節軟骨細胞に対しての直接経路であり、別の経路として CTGF/CCN2 を介して引き起こされる間接的経路である。CTGF/CCN2 が軟骨の成長、分化において重要な役割を果たすことを考慮すれば、M-CSF が軟骨細胞の *ctgf/ccn2* の発現を誘導することにより分化を促進している可能性は十分に考えられる。以上、M-CSF が CTGF と協調して関節軟骨の成長、分化及び修復に関与している可能性が明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)が炎症時に関節軟骨に発現することは知られていたものの、軟骨組織における機能的側面については今日まで明らかにされていなかった。一方、結合組織成長因子/CCNファミリーメンバー2(CTGF/CCN2)は軟骨の成長、分化、さらには修復を促進する作用を有することが知られている。本研究はヒトの軟骨細胞様細胞株とラット初代膝関節軟骨細胞を用い軟骨細胞におけるM-CSFとCTGF/CCN2との協調的産生と生物学的作用を*in vivo* および*in vitro*で検討したものである。

その結果、軟骨細胞においてM-CSFがCTGF/CCN2を誘導することが明らかになった。また、M-CSFが軟骨細胞の形質発現を賦活することも明らかとなった。さらに、実験的な変形性関節症(OA)におけるM-CSF産生部位は軟骨細胞がクラスタリングをおこしている部位でCTGF/CCN2の産生部位と一致することも判明した。これらのことから、M-CSFは関節軟骨の再生分子として、いくつかの異なる機序で作用すると考えられる。すなわち、1つは低濃度でのプロテオグリカン合成の上昇に代表される関節軟骨細胞に対しての直接経路であり、別の経路としてCTGF/CCN2を介して引き起こされる間接的経路である。CTGF/CCN2の軟骨分化促進作用を考慮すれば、M-CSFが軟骨細胞の*ctgf/ccn2*の発現を誘導することにより分化を促進している可能性は十分に考えられる。

よって、本研究はM-CSFがCTGF/CCN2と協調して関節軟骨の修復に関与している可能性を示した点で極めて斬新な研究であり、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。