

論文要旨等報告書

氏	河田 かずみ
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 3365 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Possible role of LRP1, a CCN2 receptor, in chondrocytes. (軟骨細胞におけるLRP1、CCN2受容体の機能の可能性)

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 山城 隆 助教授 原 哲也

学位論文内容の要旨

【目的】

低密度リポタンパク受容体関連タンパク 1(LRP1)は高分子量の受容体であり、エンドサイトーシスとリン酸化によってシグナル伝達を調節する。LRP1 は動物の発育に不可欠な分子で、LRP1 欠損マウスは胎生中期のうちに死亡してしまう。LRP1 には様々なリガンドがあり、その中には内軟骨性骨化における重要な因子である CCN ファミリー2(CCN2)も含まれる。しかしながら、LRP1 は神経細胞などでは詳細な研究がなされているが、軟骨細胞における存在や役割は知られていない。そこで、本研究では LRP1 も内軟骨性骨化に何らかの関与をしているのではないかと仮説のもとに、軟骨組織および軟骨細胞における LRP1 の発現および局在、さらには機能の解析を試みた。

【材料及び方法】

免疫染色。マウス脛骨の切片に抗 LRP1 抗体 H-80 を反応させ、次に二次抗体 Alexa Fluor488 ヤギ抗ウサギ IgG、およびローダミン-phalloidin を反応させた。カバーガラス上で培養した細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 LRP1 抗体 8G1、H-80、抗カテプシン D 抗体 C-20、および抗 Rab11 抗体 C-19 を反応させ、さらに Alexa Fluor 標識の二次抗体、propidium ヨウ化物、1 μ M SYTOX Green Nucleic Acid Stain を反応させた。

細胞培養。ウサギ成長軟骨細胞を 5 週齢ウサギ肋軟骨からコラゲナーゼ処理により分離し、 α -MEM(10%牛胎児血清(FBS)+)で培養した。HeLa(子宮頸癌細胞株)、SaOS-2(骨芽細胞様細胞株)、MDA-231(乳癌細胞株)、HCS-2/8(軟骨細胞様細胞株)は DMEM(10%FBS+)で培養した。

RNA 抽出と cDNA 合成。回収した細胞から RNeasy キットのプロトコールに従って総 RNA を抽出した。総 RNA(2 μ g)を AMV Reverse Transcriptase によって逆転写した。

リアルタイム PCR。LightCycler システムで TOYOBO SYBR GREEN PCR Master Mix を使用した。

ウエスタンブロット。4-20%勾配ポリアクリルアミドゲルを使用し細胞から回収したタンパクを電気泳動した。プロッティング装置を使用しタンパクを polyvinylidene difluoride 膜に移した。膜に抗 LRP1 抗体 5A6、8G1、または抗 β アクチン抗体 AC-74 を反応させ、さらに HRP コンジュゲート抗マウス IgG を反応させた。タンパクは ECL Western Blotting Detection システムを使用し検出した。

CCN2 の Cy3 標識と細胞内への取り込み分析。CCN2 は Cy3 Mono-Reactive dye を反応させた。無血清培地(1 μ g/ml Cy3-CCN2+)で、5-45 分、37°C で培養し、免疫染色を行った。

【結果】

1. マウス脛骨軟骨部での LRP1 の分布を蛍光免疫染色法により観察した結果、LRP1 は肥大化層以外の成長板軟骨、関節軟骨、半月板軟骨細胞全体で観察された。
2. 軟骨細胞の分化に伴う *lrp1* mRNA の発現変化を、ウサギ肋軟骨成長軟骨細胞 *in vitro* 分化培養系により検討した結果、*lrp1* mRNA の発現は *col10a1* mRNA の発現より先行した。またこれは *ccn2* mRNA の発現とオーバーラップしていた。一方 LRP1 タンパクの蓄積も、これと同じ時間的経過でピークに達した。
3. 起源の異なる細胞株間における LRP1 の産生量の違いをウエスタンブロット法によって解析した結果、MDA-231 と HeLa と比べて HCS-2/8 や SaOS-2 で LRP1 は著しく多かった。mRNA 発現レベルでも、タンパクと同様の結果が得られた。
4. LDLR ファミリーのうち、骨形成に重要な役割を果たしていることが知られている *lrp5/6* mRNA の発現についても検討した結果、どちらの発現も HeLa や SaOS-2 と比較して HCS-2/8 では低い発現レベルだった。
5. HCS-2/8 における LRP1 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で免疫染色法により観察した結果、細胞表面だけでなく、細胞内および核内にも観察された。
6. Cy3 によって標識した CCN2 を培地に添加して調べた結果、CCN2 の軟骨細胞内への取り込みは時間を経るに従い増加し、それは LRP1 と細胞内で部分的に共局在していた。取り込まれた CCN2 はリソソームだけでなく、リサイクリングエンドゾームや核にも輸送された。

【結論及び考察】

他の細胞株と比較して LRP1 は軟骨細胞で高発現し、特にその発現は肥大軟骨細胞層以外の軟骨細胞で顕著であった。また、LRP1 が軟骨細胞での CCN2 の取り込みに部分的に関与していることも示唆された。よって LRP1 は CCN2 の量や局在を制御し、軟骨細胞の分化を制御している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

低密度リポタンパク受容体関連タンパク 1(LRP1)は高分子量の受容体であり、エンドサイトーシスとリン酸化によってシグナル伝達を調節する。LRP1は動物の発生に不可欠な分子で、LRP1欠損マウスは胎生中期のうちに死亡してしまう。LRP1には様々なリガンドがあり、その中には内軟骨性骨化における重要な因子であるCCNファミリー2(CCN2)も含まれる。しかしながら、LRP1は神経細胞などでは詳細な研究がなされているが、軟骨細胞における存在や役割は知られていない。そこで、本研究ではLRP1も内軟骨性骨化に何らかの関与をしているのではないかと仮説のもとに、軟骨組織および軟骨細胞におけるLRP1の発現および局在、さらには機能の解析を試み、その結果、以下の結論を得ている。

1.マウス脛骨軟骨部でのLRP1の分布を観察した結果、LRP1は肥大化層以外の軟骨細胞で観察された。軟骨細胞の分化に伴う*lpl* mRNA・LRP1タンパクの発現・蓄積変化を、ウサギ軟骨成長軟骨細胞 *in vitro* 分化培養系により検討した結果、*lpl* mRNA・LRP1タンパクの発現・蓄積は *col10a1* mRNAの発現より先行し、*ccn2* mRNAの発現と重複していた。起源の異なる細胞株間におけるLRP1の産生量の違いを解析した結果、乳癌由来細胞株MDA-231と子宮頸部癌由来細胞株HeLaと比べて軟骨細胞様細胞株HCS-2/8や骨芽細胞様細胞株SaOS-2でLRP1は著しく多かった。mRNA発現レベルでも、タンパクと同様の結果が得られた。LDLRファミリーのうち、骨形成に重要な役割を果たしていることが知られている *lpl5/6* mRNAの発現についても検討した結果、どちらの発現もHeLaやSaOS-2と比較してHCS-2/8では低かった。すなわち、他の細胞株と比較してLRP1は軟骨細胞で高発現し、特にその発現は肥大軟骨細胞層以外の軟骨細胞で顕著であった。

2.HCS-2/8におけるLRP1の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、細胞表面だけでなく、細胞内および核内にも観察された。さらにCy3によって標識したCCN2を培地に添加して調べた結果、CCN2の軟骨細胞内への取り込みは時間を経るに従い増加し、それはLRP1と細胞内で部分的に共局在していた。取り込まれたCCN2はリソソームだけでなく、リサイクリングエンドソームや核にも輸送された。このことから、LRP1が軟骨細胞でのCCN2の取り込みに部分的に関与していることも示唆された。

以上の結果はLRP1がCCN2の量や局在を制御し、軟骨細胞の分化を制御している可能性が示しており、本研究はLRP1の機能解明という観点から極めて価値の高い研究である。したがって、本申請論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。