

論文内容の要旨

論文題目：内軟骨性骨形成機構の解明

レチノール結合蛋白の同定とその生理的意義

指導教官：中村 耕三教授
東京大学大学院医学系研究科
平成7年4月入学
医学博士課程
外科学専攻
来田 吉弘

整形外科医が扱う四肢の機能障害の中には、骨関節の成長と形態形成異常が原因となっている疾患群があり、骨形態形成の過程を制御して生理的な形態を有する骨を形成させる技術の開発が強く求められている。その骨の成長と形態形成は成長板軟骨組織で起こるが、その詳細な機構についてはまだまだよくわかっていない。

成長板軟骨組織は、細胞増殖が盛んな増殖層と増殖を止め石灰化に繋がる肥大層とに分けることができ、それぞれが成長板軟骨の2つの性質、成長と骨化（石灰化）、を制御していると考えられている。

成長板軟骨の組織形成と細胞分化の機構については、1980年代後半頃から、多数の成長因子やビタミン、ホルモン類が培養軟骨細胞の形質発現に影響を与えると報告されている。こうした因子の遺伝子変異や遺伝子操作が成長板軟骨と骨格の形成異常を引き起こすことも報告されている。なかでも近年、制御因子としての副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）の役割が注目されている。副甲状腺ホルモン（PTH）と軟骨細胞あるいは軟骨膜細胞が合成するオートクライン/パラクライン因子である PTHrP はそのアミノ末端側の機能ドメインのアミノ酸配列が類似しており、軟骨細胞膜上に存在する PTH/PTHrP 受容体の共通のリガンドとして作用する。PTH/PTHrP とそのセカンドメッセンジャーである cAMP は、培養成長板軟骨細胞を用いた研究やノックアウトマウス、遺伝子導入マウスなどの解析から、軟骨の増殖と成熟を促進し、骨への移行を抑制する調節因子と考えられている。また、成長板軟骨の増殖層と肥大層の境界の数層（前肥大層）の細胞が、特に強く PTH/PTHrP 受容体を発現してい

て、成長板軟骨の2つの機能（成長と骨化（石灰化））の制御に重要な役割を担っていると考えられるようになってきた。

ところが、PTH/PTHrPによりその受容体が活性化されて cAMP が誘導されることと、結果として起こる軟骨細胞の形質変化とを関連付ける情報は乏しく、PTH/PTHrP-cAMP 系による成長板軟骨の分化制御機構の解明は、大きな課題となっている。そこで本研究は、ウサギ培養成長板軟骨細胞を用いて成長板軟骨における PTH/PTHrP の作用機序を探索することを通して、成長板軟骨組織の形成と成長の制御機構の解明に至ることを主目的とした。

研究の第1段階において、本研究で用いた培養細胞が、*in vivo* と同様の分化経過をたどることを蛋白および遺伝子レベルで確認した。PTH/PTHrP による形質変化もあらためて遺伝子レベルで確認し、さらに PTH/PTHrP が新しい骨化（石灰化）分化マーカーであるインディアンヘッジホッグ（Ihh）とオステオポンチン（OPN）を遺伝子レベルで抑制することを明らかにした。

次いで、成長板軟骨細胞に対する PTH/PTHrP-cAMP 系の作用機序を探索することを目的とし、培養上清中から PTH/PTHrP あるいは cAMP で誘導される分子量約 19 kDa の蛋白を分離精製した。この精製蛋白のアミノ末端のアミノ酸配列はレチノール結合蛋白（RBP）のものと一致し、精製蛋白が RBP モノクローナル抗体と特異的に交差し、その分子量が RBP と一致することから、この蛋白を RBP と同定した。そして、軟骨組織中には肝臓以外の組織としては最高レベルの RBP mRNA が発現していることと、骨化しない静止軟骨や関節軟骨では成長板軟骨より多くの RBP mRNA が発現していることを明らかにした。また、RBP mRNA は軟骨から骨への移行に重要な成長板の前肥大型で強く発現しており、培養軟骨細胞に対しては、軟骨形質を誘導することなく骨化（石灰化）関連遺伝子であるインディアンヘッジホッグとオステオポンチンの発現を抑制することを明らかにした。これらのことから PTH/PTHrP-cAMP 系の作用の少なくとも一部分は RBP を介したものであると考えられた。

ところで、RBP は、ビタミン A（レチノイド）特異的結合蛋白であり、肝臓から局所組織へのレチノールの輸送蛋白である。ビタミン A は、広く細胞の増殖分化に影響を与え、組織形成の制御に重要な役割を果たしている。食物から吸収されたビタミン A は、レチノールの形で RBP とともに肝細胞から分泌され、血中を標的組織まで輸送される。標的細胞に取り込まれたレチノールは、レチノールを経てレチノイン酸に代謝され、各種遺伝子の発現を調節し、レチノイン酸自身が誘導する特異的分解酵素であるレチノイン酸水酸化酵素により分解される。肝臓以外にも腎臓や目などビタミン A の標的組織の中には、RBP を少量ながら合成分泌しているものがあり、そうした RBP は肝由来のレチノイドの作用を修飾すると報告されている。

本研究では成長板軟骨細胞が RBP を合成分泌していることを明らかにしたが、成長板軟骨もビタミン A の標的組織の一つである。ビタミン A は、軟骨形質を抑制して肥大化（石灰化）を誘導するとされているが、RBP にはレチノイン酸水酸化酵素を誘導する作用があった。そして、RBP はレチノイン酸との共存下で見かけ上レチノイン酸の作用を抑制するようであった。

以上のように、本研究では PTH/PTHrP が cAMP とともに RBP を合成分泌することを明らかにし、RBP はレチノイン酸の作用を抑制する可能性が示唆された。しかし、文献的考察により、PTH/PTHrP が生理的条件下でも RBP の合成分泌を介して成長板軟骨の分化制御に関与していると考えするには疑問が残された。