

## 審査の結果の要旨

氏名 来田 吉弘

本研究は成長板軟骨の分化制御機構を明らかにするため、ウサギ肋軟骨成長板細胞を用いて、培養上清から軟骨では新規の蛋白を誘導する試みを行い、下記の結果を得ている。

1. ウサギ肋軟骨成長板細胞を培養して、培養日数を変えて DNA 含有量、ウロン酸含有量、アルカリホスファターゼ活性、カルシウム含有量を定量した。また、副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTH/PTHrP) 受容体、X 型コラーゲン、オステオポンチンの各遺伝子発現の変化を計測した。これらの結果から、この培養細胞は経時的に *in vivo* とよく似た分化をすると考えられた。
2. ジブチリルサイクリック AMP (dbcAMP) をこの細胞に作用させ、培養上清中に分泌される 19 kDa の蛋白を、ゲルろ過等の方法を用いて培養上清より精製した。この蛋白の分子量および N 末端のアミノ酸配列 (14 アミノ酸) がウサギのレチノール結合蛋白と一致し、抗ヒトレチノール結合蛋白モノクローナル抗体と交差したことから、この蛋白がウサギレチノール結合蛋白であることが示された。軟骨でレチノール結合蛋白が合成されていることは新しい発見であった。また、dbcAMP はレチノール結合蛋白を遺伝子レベルで強力に誘導することが示された。
3. 研究の課程で、この蛋白は PTH/PTHrP によっても遺伝子レベルで誘導されることが示されたが、生理的に PTH/PTHrP がレチノール結合蛋白の誘導を介して軟骨の分化制御に関与している可能性は、文献的考察より否定的であった。
4. レチノール結合蛋白は、レチノイン酸の特異的分解酵素であるレチノイン酸水酸化酵素を遺伝子レベルで誘導することが示された。レチノイン酸は成長板軟骨を肥大化石灰化に導く作用を有しているが、レチノイン酸とレチノール結合蛋白との共存下では見かけ上レチノイン酸の作用は抑制されていたことから、レチノール結合蛋白

はレチノイン酸の作用を抑制する可能性があると考えられた。

以上、本論文ではウサギ肋軟骨成長板細胞の培養上清から、軟骨では新規のレチノール結合蛋白を単離精製した。レチノール結合蛋白には見かけ上レチノイン酸を抑制する作用があることを明らかにした。本研究は、軟骨分化に重要な役割を果たすと考えられるレチノイン酸の作用を調節する因子として、新たにレチノール結合蛋白を発見し、今後の成長板軟骨分化制御機構の解明に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものとする。