

# 軟骨細胞の伸展, 分化に関する コンカナバリン A 結合膜蛋白質に関する研究

石 田 秀 幸

## Studies on Concanavalin A-Binding Membrane Proteins Involved in Spreading and Differentiation of Chondrocytes

Hideyuki Ishida

(平成7年3月28日受付)

### 緒 言

軟骨は胎生期には骨格の大部分を占めるが, 出生後, 内軟骨性骨化によって骨組織に置き換わる。内軟骨性骨化の過程で, 軟骨細胞は増殖を開始し, 細胞外基質を産生する成熟軟骨細胞を経て, 肥大軟骨細胞へと最終分化する<sup>1)</sup>。しかし, 軟骨細胞の分化の調節機構については未だに不明な点が多い。

細胞分化は一般に細胞膜糖蛋白質を仲介して調節されている。レクチンは糖と選択的に相互作用する蛋白質であり<sup>2)</sup>, 細胞膜表面の種々の糖蛋白質に結合することにより細胞の分化, 増殖および形態に影響を与える<sup>3,4)</sup>。

軟骨細胞に対するレクチンの影響については, Yanら<sup>5)</sup>がタチナタマメのレクチンであり  $\alpha$ -D-マンノースおよび  $\alpha$ -D-グルコース残基に親和性の高いコンカナバリン A (ConA) が軟骨細胞のプロテオグリカン合成を著しく促進することを報告している。しかし, 軟骨細胞の最終分化と石灰化に及ぼすレクチンの作用は不明である。

一方, ビタミン A (レチノイド) は軟骨の発生, 成長および内軟骨性骨形成に重要な役割を果たしている<sup>6-10)</sup>。軟骨細胞培養系にレチノイン酸を添加すると, 軟骨細胞は次第に伸展能を増しながら線維芽細胞様の平坦な細胞に変化し, 軟骨細胞の分化マーカーである球形の細胞形態, プロテオグリカン合成能<sup>11-13)</sup>

および II 型コラーゲン合成能<sup>14,15)</sup> を失い, 脱分化する。

本研究の目的は二つあり, まず軟骨細胞の伸展, 分化に及ぼす各種のレクチンの影響を検討した。次に, レチノイン酸添加により脱分化した軟骨細胞と, 良好に分化した軟骨細胞の細胞膜より, ConA 結合糖蛋白質を分離して, 軟骨細胞の分化と膜糖蛋白質との関係を検討した。

### 材料および方法

#### I. レクチンおよび培養細胞

##### 1. レクチン

植物レクチンとして, タチナタマメレクチンである ConA, コムギ胚芽レクチンである Wheat germ agglutinin (WGA), インゲンマメレクチンである Phaseolus vulgaris (PHA), レンズマメレクチンである Lens culinaris (Lentil), ハリエニシダレクチンである Ulex europeus (UEA I+II) および 4 量体である ConA を succinyl 化して 2 量体にした Succinyl-ConA (いずれも Sigma 社) を用いた。

##### 2. 軟骨細胞および線維芽細胞

軟骨細胞は生後 4 週齢の雄性ニュージーランド白色ウサギまたは生後数日の雑種ブタの静止肋軟骨部より Shimomura<sup>16)</sup>, Kato<sup>17)</sup> らの方法に準じて単離した。すなわち, 肋軟骨静止軟骨部を分離し, メスにて軟骨を細切した後, 0.1% EDTA を含む 0.1% トリプシン (Difco 社) にて 1 時間, 0.15% コラゲナーゼ (Worthington 社) にて 3 時間インキュベートした後, 120  $\mu$ m ナイロンフィルターを通過する細胞を回収した。また, 線維芽細胞は結合組織をトリプシン処理すること

広島大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 赤川安正教授) 本論文の要旨は, 平成 4 年 10 月の第 34 回歯科基礎医学会総会および平成 6 年 9 月の第 76 回広島大学歯学会例会において発表した。

により分離した。これらの細胞を 10  $\mu\text{g/ml}$  のコラーゲン溶液 (Bottger 社, type I) を含む 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  溶液と 37°C で 2 時間インキュベートすることによりコーティングした組織培養用プラスチックシャーレ (Corning 社) に播種し, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  気相下にて, 10% 牛胎児血清 (三菱化成社), 60  $\mu\text{g/ml}$  のカナマイシン (明治製薬), 50  $\mu\text{g/ml}$  のアスコルビン酸 (和光純薬), 250  $\mu\text{g/ml}$  の Amphotericin B (ICN Biochemical 社) を含む  $\alpha$ -MEM 培地 (三光純薬) 中で培養した。なお, 新鮮培地との交換は, 2 日毎に行った。

### 3. 軟骨細胞のレチノイン酸処理

上記の方法で単離した軟骨細胞にエタノール溶液に溶かしたレチノイン酸 (Sigma 社) を種々の濃度で添加し, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  気相下にて 24~96 時間培養した。

## II. 軟骨細胞の伸展に対するレクチンの影響

直径 10 cm の組織培養用プラスチックシャーレ (Corning 社) に軟骨細胞, 線維芽細胞およびレチノイン酸処理した軟骨細胞の各細胞を  $5 \times 10^5$  個播種し, 70~80% コンフルエントに達するまで培養し, phosphate buffered saline (PBS) にて 2~3 回洗浄した後, 0.01% トリプシンと 0.01% EDTA を含む PBS 中で 5~15 分間インキュベートして, 細胞を分散させた。次いで, 96 well 組織培養用プレート (Corning 社) に 1 well (直径 6 mm) あたり  $10^4$  個の細胞を播種し, 無血清の DMEM 培地 (日水製薬) にて 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  気相下にて 3 時間インキュベートした。全ての細胞が接着, 伸展したことを確認した後, 以下の実験を行った。

各種レクチンを種々の濃度で添加し, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  気相下にて 3 時間培養し, 位相差顕微鏡にて細胞伸展を観察した。すなわち, 一視野下に観察できる全細胞数に対する伸展した細胞の割合を 2 つの培養系で測定し, その平均値を伸展能として評価した。なお, 培養皿底面はフィブロネクチン (新田ゼラチン) あるいは II 型コラーゲン (高研) にてコーティングした, あるいは, コーティングをしていないプラスチックプレートを用いて, 細胞伸展実験を行った。

## III. 軟骨細胞の最終分化および石灰化に対するレクチンの影響

### 1. Alkaline phosphatase (ALPase) 活性の定量

ウサギ静止軟骨細胞を 96 well 組織培養用プレート (Corning 社) に 10% 血清存在下でコンフルエントに達するまで培養後, 血清濃度を 2% に下げ各レクチンを添加し, 24 時間後に血清濃度を 10% に戻し, 培養開始

から 20 日後までの ALPase 活性を測定した。すなわち, 細胞層を 0.9%  $\text{NaCl}$  にて洗浄後, 0.2% Triton X-100 を含む 0.9%  $\text{NaCl}$  溶液中にてホモジナイズし, さらに 4°C, 15 分間, 12,000  $\times g$  にて遠心してその上清を ALPase 活性の測定に用いた。各サンプルは Bessey らの方法<sup>18)</sup> に準じて, p-nitrophenyl phosphate (pNpp; 和光純薬) を基質として用い反応させ, 生じた p-nitrophenol (pNp) による吸光度 (410 nm) を測定した。

### 2. $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ ビタミン $\text{D}_3$ 受容体結合能

直径 10 cm 組織培養用プラスチックシャーレ (Corning 社) で培養した軟骨細胞を回収し, 生理食塩水にて 2 回洗浄した後, 3 ml の 0.3 M  $\text{KCl}$  を含む buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol) でホモジナイズした<sup>19)</sup>。次に, 500  $\times g$  にて 10 分間遠心後, その上清をさらに 226,000  $\times g$  にて 60 分間遠心した。得られたサイトゾル画分 (buffer A 0.4 ml 中に 0.5 mg 蛋白を含む) を 1.25-dihydroxy (26.27-methyl- $^3\text{H}$ ) cholecalciferol (20,000 dpm/26 pg/32 fmol; 中外製薬) および種々の濃度の非標識  $1.25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  を含むポリプロピレンチューブに移し, 20°C, 1 時間 30 分インキュベートした後, 5% charcoal および 0.5% dextran を含む 50  $\mu\text{l}$  の buffer A を加え, Vortex mixer にてそれぞれ 5 分間混和した。4°C, 30 分放置した後, 500  $\times g$ , 20 分間の遠心により charcoal 沈殿中に非結合の  $^3\text{H}$ -ビタミン  $\text{D}_3$  を沈殿させ除去し, 上清中のビタミン  $\text{D}_3$  受容体との複合体の放射活性を測定した。非特異的な結合は 200 倍の濃度のラベルしていないビタミン  $\text{D}_3$  を用いて決定した。

### 3. $^{45}\text{Ca}$ 取り込みおよび Ca 含量測定法

Mayor ら<sup>20)</sup> の方法に従い, 細胞の酸可溶性画分への  $^{45}\text{Ca}$  の取り込みを指標とした。すなわち, 直径 35 mm 組織培養用プラスチックシャーレ (Corning 社) で培養した軟骨細胞を, 培養終了の 3 時間前に  $^{45}\text{CaCl}_2$  (20  $\mu\text{Ci/culture}$ ) (New England Nuclear) を含む 2 ml のイーグル培地 (日水製薬) で処理した。細胞-基質層を氷冷下にて 0.9%  $\text{NaCl}/0.2\%$  Triton X-100 中でホモジナイズし 12,000  $\times g$  で 15 分間遠心した。次に, 沈殿を 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  を含む 0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) にて 20°C で 30 分間洗浄した。その後, 0.5 M  $\text{HCl}$  にて 20°C で 3 時間培養することによりカルシウムを可溶化し, 再び 3,000  $\times g$  で 15 分間遠心し, その上清を  $^{45}\text{Ca}$  の放射活性の測定に用いた。

また, カルシウム含量は原子吸光法で測定した。すなわち, 生理食塩水で洗浄した試料を 95% エタノールで固定した後, 電気炉 (Thermolyne model FD-1545,

USA) にて 800°C で 8 時間処理した。灰化した試料を 1% 塩化ランタンを含む 4N HCl にて溶解し、原子吸光分析装置 (AA-640; 島津, 京都) にて測定した。標準物質にはカルシウム標準液 (和光純薬) を用いた。

#### 4. アリザリンレッド染色

培養軟骨細胞を 10 mM Tris-HCl を含む生理食塩水で 2 回洗浄し、95% エタノールで 1 時間固定した。蒸留水で洗浄後、0.01% アリザリンレッド S (和光純薬) 溶液にて染色を行い、2 分後に蒸留水で水洗した<sup>21)</sup>。

### IV. ConA 結合細胞膜蛋白質の精製

#### 1. 軟骨細胞膜蛋白質の単離

直径 15 cm 組織培養用プラスチックシャーレ (Corning 社) にてコンフルエント後 3 日まで培養した培養軟骨細胞を PBS にて 2 回洗浄し、ラバーポリスマンにて回収した。回収した軟骨細胞を 4 倍量の緩衝液 (0.25 M sucrose, 5 mM MOPS/KOH (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF, 10 μM amidino-PMSF: APMSF, 10 μM pepstatin) に懸濁し、ホモジナイザー (ポルトロン) にて氷上でホモジナイズした<sup>22)</sup>。さらに細粉化するために粉砕した細胞の懸濁液をテフロンチューブ付きのガラスホモジナイザーにてホモジナイズ後、300×g で室温にて 10 分間遠心を行い、上清を 105,000×g で 1 時間、4°C にて超遠心した。沈殿を懸濁後、懸濁液を遠心チューブ内の 17%/40% 蔗糖密度勾配溶液上にのせ、4°C で 1 時間、200,000×g にて超遠心を行った。遠心後、17% 蔗糖溶液と 40% 蔗糖溶液との界面に存在する軟骨細胞膜蛋白質を単離した<sup>22)</sup>。

#### 2. ConA 結合膜糖蛋白質の分離

上記の軟骨細胞膜蛋白質から蔗糖を除くため、膜画分を buffer B (5 mM MOPS/KOH (pH 7.4), 1 mM EDTA, 10 μM APMSF, 10 μM pepstatin) にて希釈し、100,000×g, 4°C で 1 時間遠心した。沈殿を 1% デオキシコール酸を含む buffer C (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 μM APMSF, 10 μM pepstatin) により可溶化した。次に、この膜画分を buffer C にて平衡化した WGA セファロース 6 MB カラム (4 cm×2.5 cm, Pharmacia 社) に展開し、その非結合画分を buffer C で平衡化した ConA セファロースカラム (5 cm×1.5 cm, Pharmacia 社) に展開した<sup>23,24)</sup>。ConA 結合蛋白質は 0.5 M methyl-alpha-mannopyranoside (MeMan; Sigma 社) を含む buffer C を用いて溶出した。

溶出画分を 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液に対して透析後、限外濾過膜 (セントリコン, Amicon 社) を用いて濃縮した。

これらの試料は Laemmli 法<sup>25)</sup> に従って、4% / 20% ゲル内で還元条件にて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析し、Coomassie Brilliant Blue (CBB) あるいは銀染色にて染色した。

上記と同様の方法で、レチノイン酸処理した軟骨細胞および線維芽細胞の ConA 結合膜糖蛋白質を分離して SDS-PAGE で分析した。

### V. ConA 結合膜糖蛋白質の N 末端アミノ酸配列の決定

ConA 結合膜糖蛋白質 (0.1~0.2 mg) を SDS-PAGE に展開し、Towbin らの方法に従い<sup>26)</sup>, PVDF 膜 (Millipore 社) に 10°C で 40 分間、電気的に転写した。PVDF 膜上の蛋白質を CBB 染色して分子量 76 kDa の蛋白 (p 76) のバンドを切り出し、気相シーケンサーにて N 末端アミノ酸配列を決定した<sup>27)</sup>。

### VI. ConA 結合膜糖蛋白質の局在

#### 1. 抗 ConA 結合膜糖蛋白質抗血清の精製

前述した方法で得られた ConA 結合膜糖蛋白質 (p 76 および分子量 140 kDa の蛋白 (p 140)) を含むバンドをゲルごと切り出し、ホモジナイズして Ribi アジュバンドとともにマウスに腹腔内投与し、2 ヶ月後に血清を採取した。

#### 2. 細胞免疫染色

Chamber slide (Nunc 社) 内で培養した軟骨細胞を PBS で洗浄後、3.7% ホルムアルデヒドにて 4°C, 30 分間固定した後、室温で 10% 牛胎児血清を含む培地と 30 分間インキュベートして非特異的結合をブロッキングした。さらに PBS で洗浄後、抗 p 76 抗血清あるいは抗 p 140 抗血清 (いずれも 100 倍希釈) と室温で 30 分間インキュベートした。次いで PBS で洗浄後、FITC ラベル抗マウス-ヒツジ IgG F(ab')<sub>2</sub> (500 倍希釈, Cappel 社) と室温で遮光して 30 分間インキュベートした。洗浄、封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss 社, LSM 410, 歯学部中央研究室) を用いて観察した。

#### 3. 臓器分布およびウエスタンブロットティング

生後 4 週齢の雄性ニュージーランド白色ウサギの肝臓、腎臓、脾臓、小腸、脳、精巣の各臓器の ConA 結合膜糖蛋白質を前記の方法で精製し、SDS-PAGE に展開し銀染色した。あるいは、各臓器の膜画分蛋白質 (6 μg/lane) を SDS-PAGE にて分離した後、PVDF 膜に電気的に転写し、その PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む PBS でブロッキングした後、抗 p 76 抗血清 (500 倍希釈) と 4°C で 15 時間インキュベートした。さらに 0.05% Tween 20/PBS で膜を洗浄後、<sup>125</sup>I-抗

マウス-ヒツジ IgG (Amersham 社) と室温で2時間インキュベートした。

### 実験結果

#### I. 軟骨細胞の伸展に対するレクチンの影響

無血清条件下で、フィブロネクチンでコートしたシャーレ上において軟骨細胞を培養し、ConA 添加3時間後の細胞形態を位相差顕微鏡にて観察した。ConA 無添加では100%の軟骨細胞がシャーレに接着し、多数の小突起を出して伸展した (図1A)。しかし、ConA を  $3\mu\text{g/ml}$  (図1B) および  $20\mu\text{g/ml}$  (図1C) 添加すると、濃度依存性に伸展が抑制され、 $20\mu\text{g/ml}$  の高濃度では伸展は完全に抑制され、細胞形

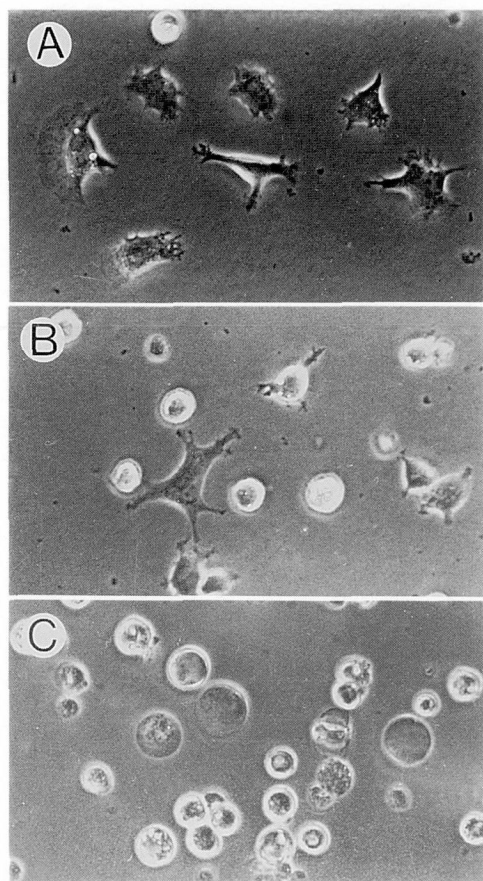


図1 軟骨細胞の形態に及ぼす各濃度における ConA の影響。

無血清条件下でフィブロネクチンでコートしたシャーレ上で軟骨細胞を培養し、ConA 添加3時間後の細胞形態を位相差顕微鏡にて観察した。

A: ConA 非添加。B: ConA  $3\mu\text{g/ml}$  添加。  
C: ConA  $20\mu\text{g/ml}$  添加。

態は球形になった。

図2はフィブロネクチン、II型コラーゲンコートおよびプラスチックプレート上におけるブタ軟骨細胞の伸展に及ぼす各種レクチンの影響を示す。コーティングの有無に関わらず、対照では100%の細胞が伸展したのに対して、WGA, PHA および ConA 添加群では、濃度依存性に伸展が抑制された。次に、ウサギの軟骨細胞、レチノイン酸処理したウサギ軟骨細胞およびウサギ線維芽細胞を用いて、フィブロネクチンでコーティングしたプレート上における、上記の細胞の伸展に及ぼす各種レクチンの影響を比較したところ、WGA, PHA および ConA 添加群で、濃度依存性にこれらの細胞の伸展が抑制された (図3)。表1はフィブロネクチンでコートしたプレート上における、ブタおよびウサギの軟骨細胞、レチノイン酸処理した軟骨細胞および線維芽細胞の伸展を50%抑制するのに必要とする各種レクチンの濃度を示している。表2はフィブロネクチンコート、II型コラーゲンコートおよびプ

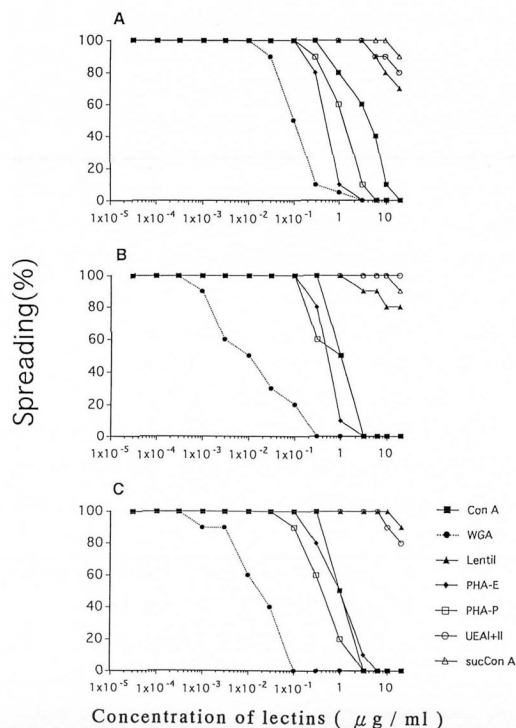


図2 フィブロネクチンコート (A)、II型コラーゲンコート (B) およびプラスチックプレート (C) 上におけるブタの軟骨細胞の伸展に及ぼす各種レクチンの影響。

各種レクチンを種々の濃度で添加して3時間培養後、位相差顕微鏡により細胞伸展を観察し、全細胞数に対する伸展した細胞の割合を伸展能として評価した。

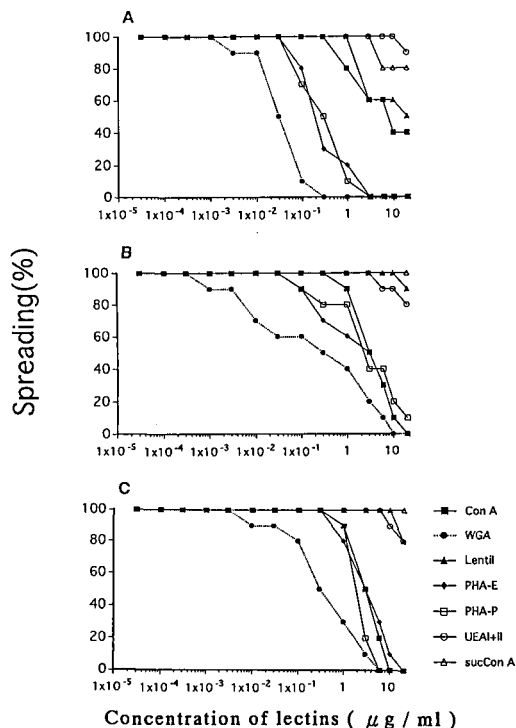


図3 フィブロネクチンコートしたプレート上でのウサギの軟骨細胞 (A), レチノイン酸処理した軟骨細胞 (B) および線維芽細胞 (C) の伸展に及ぼす各種レクチンの影響。

各種レクチンを種々の濃度で添加して3時間培養後、位相差顕微鏡により細胞伸展を観察し、全細胞数に対する伸展した細胞の割合を伸展能として評価した。

ラスチックプレート上でのウサギの各種細胞の伸展を50%抑制するのに必要とする各種レクチンの濃度を示す。コーティング、動物および細胞の種類に関わら

ず、WGA, PHA, ConA の順に低濃度から細胞伸展を抑制した。以上の結果は、フィブロネクチン、II型コラーゲンおよびプラスチックへの軟骨細胞および線維芽細胞の伸展に共通の膜糖蛋白質群が関与していることを示唆している。

## II. 軟骨細胞の最終分化および石灰化に対するレクチンの影響

### 1. ALPase 活性

静止軟骨細胞は通常 ALPase をほとんど産生しない。しかし、静止軟骨細胞培養系において、ConA および Succinyl-ConA は ALPase 活性を濃度依存性に誘導した (図4)。また、PHA, Lentil レクチンは5~10 µg/ml 以上の高濃度でのみ低レベルの ALPase 活性を誘導した。一方、WGA と UEA I+II レクチンは ALPase 活性に影響しなかった。

ConA と Succinyl-ConA の ALPase 活性促進作用は1 µg/ml より認められ、5~10 µg/ml で最大となった (図5A)。この系に ConA と特異的に結合する糖である MeMan を培養5日後に24時間添加すると ALPase 活性は完全に抑制された。また、培養12, 14日後に MeMan を添加した場合も ALPase 活性の増加が抑制された。しかし、培養18日後での MeMan の添加は ALPase 活性に影響しなかった (図5B)。

### 2. $1\alpha$ -25(OH)<sub>2</sub> ビタミン D<sub>3</sub> 受容体

ConA は静止軟骨細胞の培養14日後および20日後の  $1\alpha$ -25(OH)<sub>2</sub> ビタミン D<sub>3</sub> 受容体レベルを著しく増加させた (図6)。

### 3. 石灰化

ConA は <sup>45</sup>Ca 取り込み (図7A) および Ca 含量 (図7B) をそれぞれ7倍, 16倍に増加させた。

また、ConA を添加した軟骨細胞培養系は、アリザ

表1 フィブロネクチンコートしたプレート上におけるブタおよびウサギの各種細胞の伸展に及ぼすレクチンの影響

	Porcine			Rabbit		
	Chondrocyte	RA-exposed chondrocyte	Fibroblast	Chondrocyte	RA-exposed chondrocyte	Fibroblast
WGA	0.03	0.01	0.002	0.01	0.005	0.3
PHA-E	0.6	0.2	0.08	0.1	0.2	3.0
PHA-P	1.2	0.09	0.4	0.1	1.0	2.1
ConA	4.5	6.0	2.5	3.0	6.0	3.0
Lentil	20>	20>	20>	20>	20>	20>
UEA I+II	20>	20>	20>	20>	20>	20>
S-ConA	20>	20>	20>	20>	20>	20>

(µg/ml)

表中の数字は各細胞の伸展を50%抑制するのに必要とするレクチンの濃度を示す。

表2 フィブロネクチンコート (FN), II型コラーゲンコートおよびプラスチックプレート上におけるウサギの各種細胞の伸展に及ぼすレクチンの影響

	Chondrocytes			RA-exposed chondrocytes			Fibroblasts		
	FN	Type II collagen	Plastic	FN	Type II collagen	Plastic	FN	Type II collagen	Plastic
WGA	0.03	0.15	0.03	0.3	3	1	0.3	1	0.17
PHA-E	0.22	1.86	0.53	3	2	3	3	4	6
PHA-P	0.3	1	1	2.5	3	0.3	2.1	2.2	3
ConA	6.5	7	9	3	3	3	3	3	3
Lentil	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>
UEA I+II	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>
S-ConA	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>

( $\mu\text{g/ml}$ )

表中の数字は各細胞の伸展を50%抑制するのに必要とするレクチンの濃度を示す。

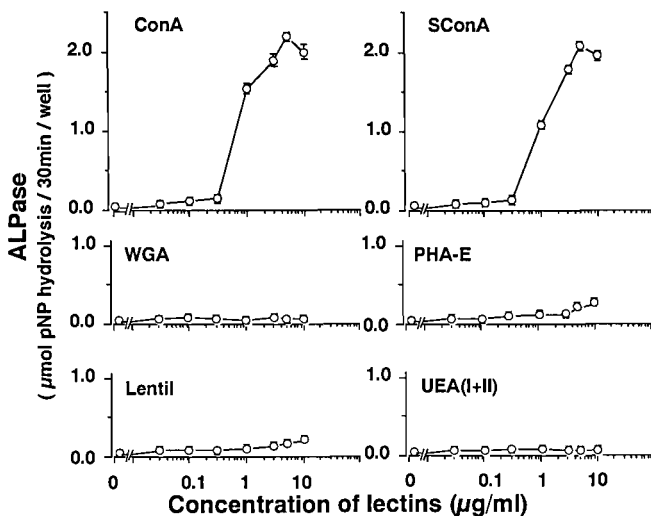


図4 静止軟骨細胞の ALPase 活性に及ぼす各種レクチンの影響 (培養15日後).

数値は3つの培養系の平均値  $\pm$  S.D. を示す。

リンレッドによって強く染色された (図8)。

### III. ConA 結合膜糖蛋白質の解析

#### 1. SDS-PAGE 分析

ウサギ軟骨細胞から得た膜蛋白質を SDS-PAGE にて分析した結果, 膜画分には40種類以上の蛋白バンドが存在した (図9左)。一方,  $1\mu\text{M}$  のレチノイン酸で4日間処理した培養軟骨細胞は, 脱分化して扁平な線維芽細胞様の細胞になった (図10)。しかし, レチノイン酸処理した培養系から得た膜画分の蛋白の泳動パターンは対照とほとんど変化していなかった (図9右)。

そこで次に, ウサギ軟骨細胞膜画分を ConA セファ

ローズカラムを用いて精製し, ConA 結合細胞膜糖蛋白質画分を SDS-PAGE にて分析したところ, この画分には約20種類の蛋白質が存在した (図11)。しかもレチノイン酸の添加により p 140 および p 76 の蛋白レベルが濃度依存性に変化した。すなわち, p 140 は  $0.01\mu\text{M}$  のレチノイン酸により増加し始め,  $1\mu\text{M}$  添加で著しく高レベルに達した。逆に, レチノイン酸の添加により p 76 は減少し,  $1\mu\text{M}$  では10%以下のレベルまで減少した (図11)。

なお, p 140 はレチノイン酸添加の1日後より増加し始め, 4日後には著明に増大した。一方, p 76 はレチノイン酸の添加2日後より減少した (図11)。

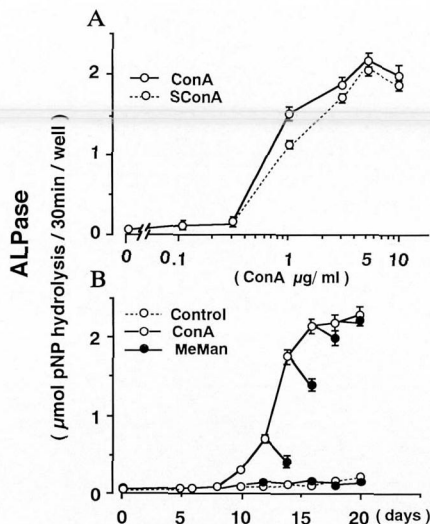


図5 A: 静止軟骨細胞の ALPase 活性に及ぼす ConA, Succinyl-ConA (SConA) の影響 (培養15日後).  
B: ConA の ALPase 活性促進作用に及ぼす MeMan の抑制作用.  
ConA; 10  $\mu\text{g/ml}$ , MeMan; 40 mM 添加  
数値は3つの培養系の平均値  $\pm$  S.D. を示す。

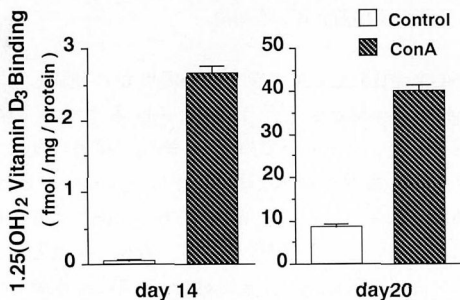


図6 静止軟骨細胞の  $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2$  ビタミン  $\text{D}_3$  受容体結合能.  
静止軟骨細胞培養系に ConA を 10  $\mu\text{g/ml}$  添加し, 培養14日後および20日後の  $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2$  ビタミン  $\text{D}_3$  受容体結合を測定した.  
数値は3つの測定値の平均  $\pm$  S.D. を示す。

## 2. p76 の N 末端アミノ酸配列の決定

自動気相アミノ酸シーケンサーを用いて, p76 を分析した結果, 図12に示すような N 末端15残基のアミノ酸配列が判明した。このアミノ酸配列をコンピュータにより検索したが, 既知の蛋白質のいずれの配列とも一致しなかった。

## 3. 細胞免疫染色

細胞免疫染色法により検討すると, p76 は軟骨細

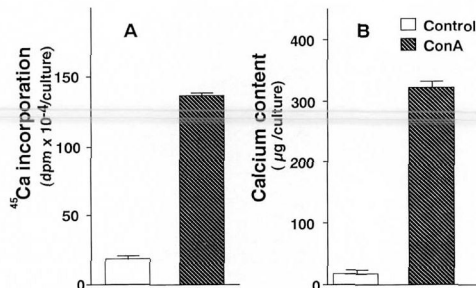


図7 静止軟骨細胞の  $^{45}\text{Ca}$  取り込み (A) および  $^{45}\text{Ca}$  含量 (B).  
静止軟骨細胞培養系に ConA を 10  $\mu\text{g/ml}$  添加し, 培養20日後の  $^{45}\text{Ca}$  取り込みおよび  $^{45}\text{Ca}$  含量を測定した.  
数値は3つの培養系の平均値  $\pm$  S.D. を示す。

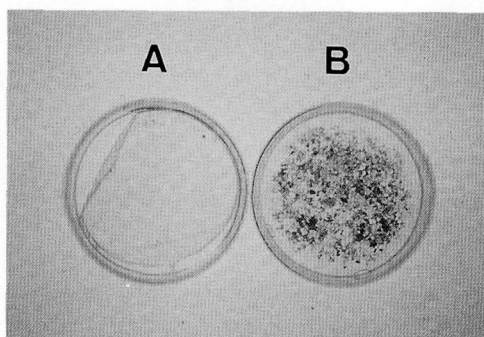


図8 静止軟骨細胞における石灰化の促進.  
培養25日目のアリザリンレッド染色の結果を示す.  
A. ConA 非添加。 B. ConA 添加。

胞形質膜にのみ限局して分布しているのに対して, p140 はプラスチックシャーレとの接着面と細胞外周等に分布していた。また, レチノイン酸で処理した軟骨細胞は p76 の発現をほとんど示さなかった。なお, 対照血清では細胞は染色されなかった (図13)。

## 4. p76 の組織分布

軟骨以外の臓器での p76 の分布を検討するために, ウサギの小腸, 腎臓, 肝臓, 脾臓, 精巣, 脳, 線維芽細胞および軟骨細胞から得た ConA 結合膜糖蛋白画分を SDS-PAGE にて分析した。その結果, 軟骨以外の臓器には分子量 76 kDa 付近の蛋白はほとんど検出されないのに対して, 軟骨細胞では最も主要な蛋白として p76 が存在していた (図14)。

さらに, 抗 p76 抗血清を用いたウエスタンブロッティング法に従って, ウサギの肝臓, 腎臓, 脾臓, 小

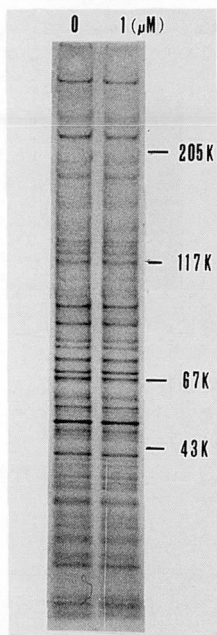


図9 ウサギ軟骨細胞から得た膜蛋白質の電気泳動パターン（銀染色）。

左のレーンはレチノイン酸非添加群の、右のレーンは  $1\mu\text{M}$  のレチノイン酸を4日間添加した培養系から得たサンプルを示す。

腸，脳，精巣の6臓器の膜蛋白画分を分析すると，p 76 は軟骨細胞にのみ存在した（図15）。また，p 76 が軟骨細胞の WGA 結合膜蛋白画分に存在せず，ConA 結合膜蛋白画分に存在することがウエスタンブロット分析から確認された（図15）。

## 考 察

### I. 軟骨細胞の伸展に対するレクチンの影響

動物細胞の接着および伸展は，遊走，増殖および分化の初発段階として不可欠である。軟骨細胞の分化は細胞形態の変化と密接に連動しており，レチノイン酸添加による軟骨細胞の扁平化は分化機能を抑制する<sup>11-15</sup>。また，枝芽の間葉系細胞のマイクロフィラメントをサイトカラシンで破壊すると，細胞形態は球形化し，軟骨細胞へと分化する<sup>28</sup>。

ConA は軟骨細胞の形態を球形化し，プロテオグリカン合成を促進することが報告されており<sup>5</sup>，本研究では軟骨細胞の伸展を抑制する ConA 以外のレクチンが存在するか否かを検討した。その結果，ConA 以外に WGA および PHA が軟骨細胞の伸展を抑制することが判明した。また，これらのレクチンはレチノイン酸処理して扁平化した細胞および線維芽細胞の伸展を

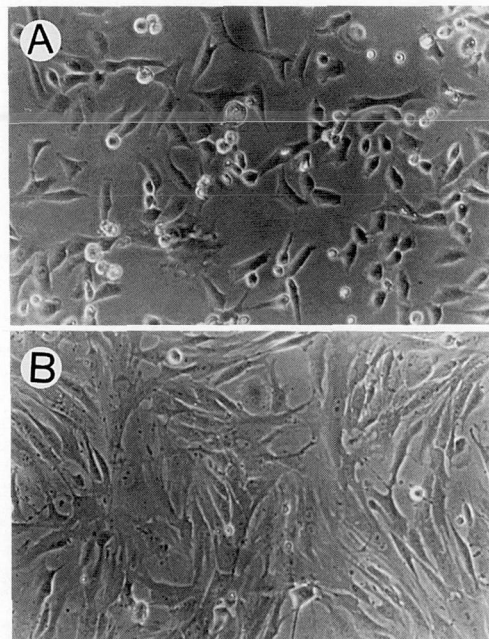


図10 静止軟骨細胞の形態に及ぼすレチノイン酸の影響

静止軟骨細胞培養系に  $1\mu\text{M}$  のレチノイン酸を4日間添加して，細胞形態の変化を位相差顕微鏡にて観察した。

A：添加前 B：添加後

も WGA, PHA, ConA の順で低い濃度から抑制した。Oppenheimer-Marks ら<sup>29</sup> はフィブロネクチンにてコートしたシャーレ上での BHK 細胞の接着に及ぼすレクチンの影響を調べた結果，やはり WGA と ConA が伸展を抑制し，しかも WGA の方が ConA よりも抑制作用が強いことを報告しており，今回の結果と一致している。軟骨細胞の伸展に対しても WGA が最も強力に抑制したが，この結果は細胞膜上の糖蛋白群のうち WGA と結合する，すなわち，N-アセチルグルコサミンを含む糖蛋白群が伸展に関与していることを示唆している。

本研究ではレチノイン酸処理した軟骨細胞でもあるいは線維芽細胞に対しても，また動物の種を問わずウサギでもブタの細胞でも，各種のレクチンは同様な結果を示した。さらに，II型コラーゲンおよびプラスチックシャーレ上においても，WGA, PHA, ConA の順に低濃度で各種細胞の伸展を抑制した。これらの知見は共通の膜糖蛋白群が結合細胞の伸展機構に関与していることを示唆している。最近，接着分子に対する数種類の細胞膜受容体（インテグリンなど）が細胞伸展に関与していることが報告されている<sup>30</sup>。しかし，これらの既知の接着分子受容体以外に，多くの膜



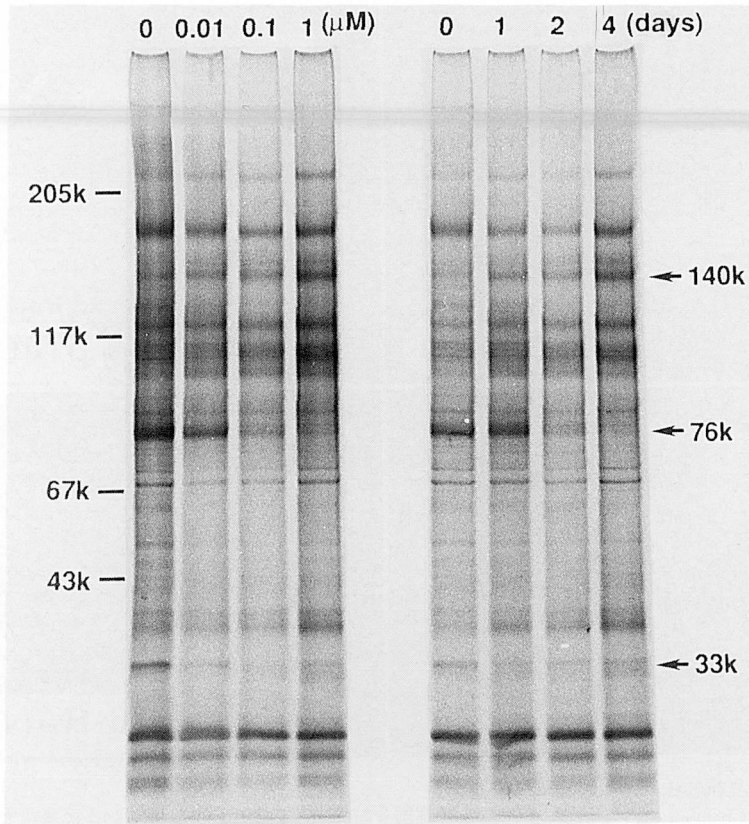


図11 ウサギ軟骨細胞から得た ConA 結合膜糖蛋白質の電気泳動パターン (銀染色)。

左の4レーンはレチノイン酸を0~1  $\mu\text{M}$  添加した培養系、右の4レーンは1  $\mu\text{M}$  のレチノイン酸を0~4日間添加した培養系から得たサンプルを示す。

Ser - Val - Glu - Val - Arg - X - X - Thr -  
Ala - Ser - Glu - Pro - Pro - Gln - Gln

図12 p76 のN末端アミノ酸配列。

ConA 結合膜糖蛋白質 (0.1~0.2 mg) を SDS-PAGE に展開し、PVDF 膜に電氣的に転写した後、膜を CBB 染色して p76 のバンドを切り出し、気相シーケンサーにてN末端アミノ酸配列を決定した。

糖蛋白質が細胞伸展機構に関与していると推察される。

軟骨細胞の細胞伸展能は低く、球形の形態を有しているが、レチノイン酸を添加すると線維芽細胞様細胞に脱分化し、伸展能を増大する<sup>11-13</sup>)。伸展抑制実験でレチノイン酸処理した軟骨細胞は、未処理の軟骨細胞と同等のレクチン応答能を示した。この結果はレクチンによる伸展抑制に関与する膜糖蛋白質は、レチノ

イン酸による影響を受けないことを示唆している。

## II. 軟骨細胞の最終分化および石灰化に対するレクチンの影響

長管骨骨端部における成長板軟骨細胞の増殖、肥大化、石灰化とそれに引き続く骨への置換は長管骨の伸長に不可欠である<sup>1,31</sup>)。すなわち、成長板軟骨細胞は増殖層での細胞分裂の後、多量の軟骨基質を分泌する成熟軟骨細胞となる。さらに、成熟軟骨細胞は著しく肥大化するとともに高レベルの ALPase 活性を有する基質小胞を細胞外基質中に放出し<sup>19</sup>)、短鎖コラーゲン (X型コラーゲン<sup>32-34</sup>) および  $1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2$  ビタミン  $\text{D}_3$  受容体<sup>35</sup>) を産生する肥大軟骨細胞へと最終分化する。ALPase は局所での有機リン酸エステルを加水分解し無機リン酸イオン濃度を上昇させるとともに<sup>36</sup>)、アパタイトの結晶化を阻害するピロリン酸等を分解して石灰化を促進すると考えられている<sup>37</sup>)。成長板軟骨細胞

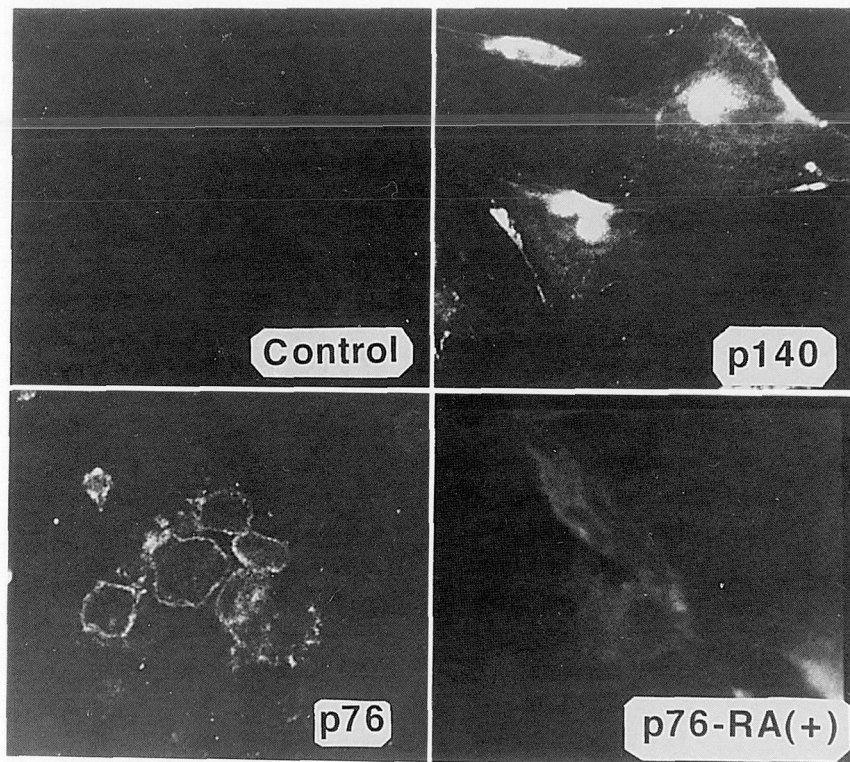


図13 蛍光抗体法による細胞免疫染色。

Chamber slide 内で培養した軟骨細胞を抗 p 76 抗血清および抗 p 140 抗血清と室温で 30 分間インキュベートした。その後、FITC ラベル抗マウスーヒツジ IgG F(ab')<sub>2</sub> と室温で遮光して 30 分間インキュベートした。

胞の最終分化の調節に関与する成長因子、ホルモンに関しては、ALPase 活性、石灰化の制御等を指標としてこれまでに多くの研究がなされている。線維芽細胞増殖因子 (FGF)<sup>38-40)</sup>、副甲状腺ホルモン (PTH)<sup>41)</sup>、トランスフォーミング増殖因子-β (TGF-β)<sup>42)</sup>、インターロイキン-1 (IL-1)<sup>43)</sup>、1α-25 (OH)<sub>2</sub> ビタミン D<sub>3</sub><sup>44)</sup> などは、いずれも成長軟骨細胞の最終分化および石灰化を抑制することが知られている。成長軟骨細胞の最終分化を促進する因子としては、カルシトニンおよび甲状腺ホルモンが知られており、特にカルシトニンは成長軟骨細胞にその受容体が局在すること<sup>45)</sup>、遠心管培養系で ALPase 活性および石灰化を促進することから<sup>41)</sup>、軟骨の石灰化の促進因子の一つであると考えられている。

これに対して、静止軟骨部では基質が石灰化すると弾力性が失われることから、最終分化が強く抑制されている。すなわち、成長軟骨細胞は最終分化と石灰化のプログラムを獲得しているのに対し、静止軟骨細胞ではこのプログラムが作動していない。本研究で、静止軟骨細胞への各種レクチンの作用を検討した結

果、ConA およびその誘導体である Succinyl-ConA のみが静止軟骨細胞の最終分化と石灰化を促進することが判明した。

MeMan は ConA と特異的に結合する糖であり<sup>46)</sup>、ConA による ALPase 活性の誘導は MeMan を加えることにより抑制されたことから、ConA は細胞膜上の ConA 結合糖蛋白質を仲介して軟骨細胞に直接的に作用することが強く示唆された。また、培養 5、12、14 日後での MeMan の添加は ALPase 活性を抑制したが、培養 18 日後での添加は ALPase 活性には影響しなかった。すなわち、培養 18 日後では軟骨細胞の最終分化プログラムが不可逆的段階まで進行していた。

Succinyl-ConA は ConA を無水コハク酸と反応させてサクシニル化することにより得られた ConA の誘導体<sup>47)</sup>であり、生理的 pH でも 2 量体構造を有し、2 価の糖結合能を持つ。軟骨細胞の伸展に関して、4 価の糖結合能を持つ ConA は細胞伸展を抑制したのに対して Succinyl-ConA は伸展には影響しなかった。ところが、Succinyl-ConA は ConA と同程度に ALPase を誘導した。従って、軟骨細胞の伸展抑制に関しては 4

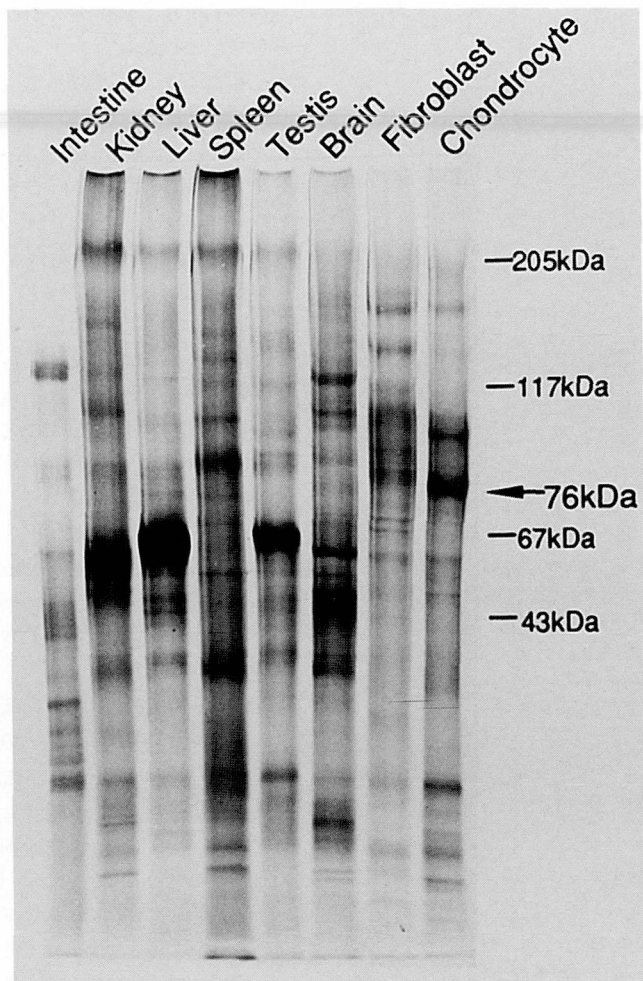


図14 各臓器における ConA 結合蛋白質の電気泳動パターン (銀染色).  
ウサギの小腸, 腎臓, 肝臓, 脾臓, 精巣, 脳, の各臓器, あるいは, 線維芽細胞や軟骨細胞から得た ConA 結合膜糖蛋白質を SDS-PAGE により分析した。

価の ConA による膜糖蛋白の広範囲な cross-linking が必要であるのに対して, 最終分化の促進に関してはそれが必要でないことが判明した。

静止軟骨細胞培養系で, ConA は  $1\alpha$ -25(OH)<sub>2</sub> ビタミン D<sub>3</sub> 受容体レベルを *in vivo* での成長板軟骨細胞と同レベルまで上昇させた。さらに ConA は, 細胞外基質の広範な石灰化をも促進した。すなわち, ConA は静止軟骨細胞を最終分化させることのできる構造のはっきりした最初の物質であり, 内軟骨性骨形成と石灰化機構とを追求するための強力な道具となると期待される。

### Ⅲ. ConA 結合細胞膜糖蛋白質について

細胞膜糖蛋白質は細胞間相互作用, 細胞外基質-細

胞相互作用, 細胞認識に重要な役割を果たしている。軟骨細胞の分化の過程においても, 形態的および機能的に大規模な細胞形質の変化が起こるが, これまで軟骨細胞の膜糖蛋白質と分化との関係は不明であった。

一方, レチノイドはビタミン A 欠乏症および過剰症の研究から, 軟骨の成長発育および内軟骨性骨形成に一定範囲の濃度のレチノイドが不可欠であることが知られている<sup>6)</sup>。レチノイン酸を肢芽 (翼芽) の中胚葉組織に外来性に添加すると, 骨格の二重形成を引き起こす<sup>7)</sup>。肢芽の間葉系細胞培養系において, レチノイン酸は  $10^{-8}$  M から  $10^{-7}$  M の濃度では軟骨形成を促進し,  $10^{-6}$  M の濃度では抑制する<sup>8)</sup>。軟骨細胞の培養においては, レチノイン酸は  $10^{-7}$  M の濃度で X 型コラーゲン, オステオネクチン, オステオポンチン,

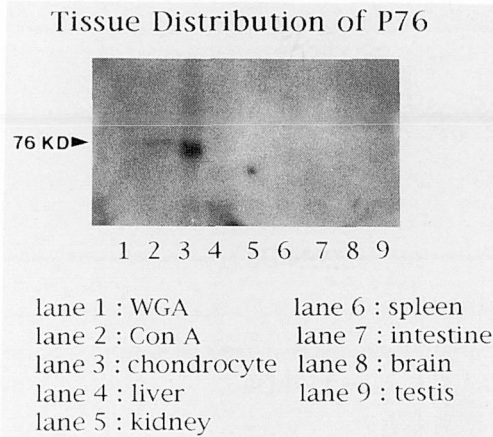


図15 p76 の臓器分布 (ウエスタンブロット分析).

軟骨の WGA, Con A 結合膜糖蛋白質 (レーン 1 およびレーン 2, レーンあたり 2  $\mu$ g) およびウサギの各臓器の膜画分蛋白 (レーン 3 ~ 9, レーンあたり 6  $\mu$ g) を SDS-PAGE により分離した後, PVDF 膜に電氣的に転写し, 抗 p76 抗血清 (500倍希釈) と 4°C で15時間インキュベートした。さらに,  $^{125}$ I-抗マウスーヒツジ IgG と室温で2時間インキュベートした。

ALPase の mRNA レベルを増加させ<sup>9,10</sup>,  $5 \times 10^{-8}$  M から  $10^{-6}$  M の濃度で肥大軟骨細胞を骨芽細胞様細胞に形質変換させる<sup>48</sup>). 本研究で用いた静止軟骨細胞培養系では, レチノイン酸はコンフルエントの前後に添加しているため, 細胞増殖, 肥大化および骨芽細胞への形質変換にはほとんど影響しなかった。しかし, 本研究において,  $10^{-8}$  M から  $10^{-6}$  M のレチノイン酸は静止軟骨細胞の形態を著しく変化させた。それにも関わらず, レチノイン酸は軟骨細胞膜蛋白画分の泳動パターンにはほとんど影響しなかった。従って, 軟骨細胞の膜蛋白の大部分は house-keeping gene の産物であると考えられる。興味深いことに, 多数の ConA 結合画分の中で, p76 と p140 のみがレチノイン酸によりそのレベルが変化した。これらの蛋白は細胞形態を維持する構造上の蛋白質もしくは軟骨細胞の分化形質の発現を制御するシグナル蛋白であると考えられる。

レチノイン酸は血清中に 10~15 nM 含まれている<sup>49</sup>). さらに, 肢芽におけるレチノイン酸のレベルは発生の時期や部位に依存して変動する。このことは, 軟骨の発生期においてレチノイドの濃度が局所的に変化することを示唆している<sup>50</sup>). 10%血清 (1.0~1.5 nM レチノイン酸) 存在下の軟骨細胞培養系に  $10^{-8}$  M のレチノイン酸を添加すると, p140 のレベルは増加し, p76 のレベルは低下した。この結果は少なくとも in vivo のある時期においてレチノイドが軟骨細

胞の p140 および p76 のレベルを制御していることを示唆している。

p76 はレチノイン酸添加により減少する ConA 結合膜糖蛋白質であり, 軟骨細胞が分化している時期に発現している。軟骨細胞を高密度で培養した場合, 単層培養の場合と比較して p76 の発現が高かった (データ未発表)。また,  $^{125}$ I で軟骨細胞膜表面をラベルして ConA 結合膜糖蛋白質を分離すると, p76 は膜表層の最も主要な蛋白質の一つであった (データ未発表)。ウエスタンブロット法を用いた臓器分布の結果および他の臓器の ConA 結合膜糖蛋白質の電気泳動パターンの分析から, p76 は軟骨細胞に特異的に発現している蛋白質であることが明らかとなり, しかも N 末端アミノ酸配列の分析結果から p76 は新規の蛋白質であることが判明した。

これまでにアグリカン<sup>51</sup>, II 型<sup>52</sup>, IX 型<sup>53,54</sup>, X 型<sup>32-34</sup> コラーゲン, cartilage-matrix protein<sup>55</sup>, chondromodulin-I<sup>56</sup> などの軟骨特異的の分子が報告されている。しかし, 軟骨細胞に特異的な膜蛋白の発見は本研究が最初である。

ConA などの植物レクチンはリンパ球の分化, 増殖のメカニズムを探求するための道具として広く用いられている<sup>3</sup>). しかし, リンパ球では多数のレクチンが活性化能を持つため, レクチンレセプターの解析は困難である。これに対して軟骨細胞培養系では, 多数のレクチンの中で ConA (あるいは Succinyl-ConA) のみが分化を誘導するので, 軟骨細胞を用いたレクチンレセプターの研究は今後有望である。

ConA はタチナタマメ中に存在する植物レクチンであり, 動物の生体内には存在していないが, Halberg らによって, 軟骨型プロテオグリカンの core protein の C 末端ドメイン (130残基) にレクチン様の作用があることが報告された<sup>57</sup>). また, 最近になってプロテオグリカン以外に多数の動物レクチンが見いだされている<sup>58</sup>). 軟骨中の動物レクチンが内在性の ConA 様因子として軟骨細胞の分化を制御している可能性があり, これは今後の課題である。

## 総 括

軟骨細胞の伸展, 分化に関与するレクチンの作用を検討し, 軟骨細胞細胞膜に特異的に存在する ConA 結合膜糖蛋白質について検討した結果, 以下の知見を得た。

1. 糖特異性の異なる 7 種類の植物レクチンのうち, WGA, PHA および ConA は軟骨細胞の伸展を抑制する作用を有し, しかも細胞の種類, コーティングの種類に関わらず, WGA, PHA, ConA の順に低い濃

度で伸展を抑制した。

2. ConA および Succinyl-ConA は静止軟骨細胞の肥大軟骨細胞への最終分化と石灰化を強力に促進した。

3. ConA セファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーと SDS-PAGE による分析から、軟骨細胞膜画分には約20種類の ConA 結合膜糖蛋白質が存在することが判明した。

4. ConA 結合膜糖蛋白質のうち、軟骨細胞が脱分化する場合には p 140 が、高度に分化する場合には p 76 がそれぞれ増加することが判明した。

5. p 76 の N 末端アミノ酸配列を調べた結果、これまでに報告のない新規の蛋白質であることが判明した。

6. p 140 および p 76 では軟骨細胞膜上における分布が異なっており、p 76 は軟骨細胞形質膜外周にのみ限局して分布しているのに対して、p 140 は軟骨細胞と培養皿器質との接着面などに分布していた。

7. ウエスタンブロッティング法にて臓器分布を調べた結果、p 76 は軟骨細胞にのみ発現する蛋白質であることが判明した。

以上、ConA が軟骨細胞の伸展および分化に対し強力な作用を有することが明らかとなり、ConA 結合膜糖蛋白質のうち特に p 76 は軟骨にのみ特異的に発現している新規の蛋白質であることが判明した。従って、p 76 は軟骨細胞形質膜の分化マーカーとして有力な研究手段となると期待される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第一講座赤川安正教授ならびに前本学歯科補綴学第一講座教授津留宏道名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し、終始御懇切なる御指導、ご助言を頂いた本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に衷心より感謝の意を表します。さらに、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座土肥敏博教授に深謝致します。

また、本研究遂行上終始御指導、御鞭撻を頂いた大阪大学歯学部生化学講座中島和久博士に深謝致します。さらに本研究遂行上および本論文作成上御指導、御助言を頂いた本学口腔生化学講座能城光秀助教授、Yan Weiqun 博士、笛吹恵美子博士、ヘキストジャパン株式会社 Pan Haiou 博士、大阪大学歯学部放射線学講座実光章年博士に深謝致します。

最後に本研究を進めるに際し、多大なる御支援を頂いた本学歯科補綴学第一講座ならびに口腔生化学講座

の関係各位に感謝致します。

## 文 献

- 1) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明: 骨の科学. 医歯薬出版, 東京, 18-23, 1985.
- 2) Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N.: What should be called a lectin? *Nature* 285, 66, 1980.
- 3) Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462-467, 1960.
- 4) Sharon, N. and Lis, H.: レクチン (大沢利明, 小浪悠紀子 訳). 学会出版センター, 東京, 37-48, 1990.
- 5) Yan, W., Nakashima, K., Iwamoto, M. and Kato, Y.: Stimulation by concanavalin A of cartilage-matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte cultures. *J. Biol. Chem.* 265, 10125-10131, 1990.
- 6) Ornoy, A. and Zusman, I.: Vitamins and cartilage.; Cartilage (Hall, B.K. editor). 2, Academic Press, New York, 297-326, 1983.
- 7) Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L. and Lee, J.: Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296, 564-566, 1982.
- 8) Ide, H. and Aono, H.: Retinoic acid promotes proliferation and chondrogenesis in the distal mesodermal cells of chick limb bud. *Dev. Biol.* 130, 767-773, 1988.
- 9) Pacifici, M., Golden, E.B., Iwamoto, M. and Adams, S.L.: Retinoic acid treatment induces type X collagen gene expression in cultured chick chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 195, 38-46, 1991.
- 10) Iwamoto, M., Shapiro, I.M., Yagami, K., Boskey, A.L., Leboy, P.S., Adams, S.L. and Pacifici, M.: Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 207, 413-420, 1993.
- 11) Takigawa, M., Ishida, H., Takano, T. and Suzuki, F.: Polyamine and differentiation: Induction of ornithine decarboxylase by parathyroid hormone is a good marker of differentiated chondrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1481-1485, 1980.
- 12) Solorsh, M. and Meier, S.: The selective inhibition of mucopolysaccharide synthesis by vitamin A treatment of cultured chick embryo chondrocytes. *Calcif. Tiss. Res.* 13, 131-142, 1973.
- 13) Shapiro, S.S. and Poon, J.P.: Effect of retinoic acid on chondrocyte glycosaminoglycan biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 74-81, 1976.
- 14) Benya, P.D. and Padilla, S.R.: Modulation of the rabbit chondrocyte phenotype by retinoic acid terminates type II collagen synthesis without inducing type I collagen: The modulated phenotype differs

- from that produced by subculture. *Dev. Biol.* **118**, 296-305, 1986.
- 15) Horton, W.E., Yamada, Y. and Hassell, J.R.: Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev. Biol.* **123**, 508-516, 1987.
  - 16) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F.: Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tiss. Res.* **19**, 179-187, 1975.
  - 17) Kato, Y. and Gospodarowicz, D.: Effect of exogenous extracellular matrices on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J. Cell Biol.* **100**, 486-495, 1985.
  - 18) Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**, 321-329, 1946.
  - 19) Iwamoto, M., Sato, K., Nakashima, K., Shimazu, A. and Kato, Y.: Hypertrophy and calcification of rabbit permanent chondrocytes in pelleted cultures: Synthesis of alkaline phosphatase and 1, 25-dihydroxycholecalciferol receptor. *Dev. Biol.* **136**, 500-507, 1989.
  - 20) Maor, G., von der Mark, K., Reddi, H., Heinegård, D., Franzen, A. and Silbermann, M.: Acceleration of cartilage and bone differentiation on collagenous substrata. *Collagen Rel. Res.* **7**, 351-370, 1987.
  - 21) Dahl, L.K.: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 474-479, 1952.
  - 22) Mollenhauer, J. and von der Mark, K.: Isolation and characterization of a collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes. *Embo. J.* **2**, 45-50, 1983.
  - 23) Kowal, R. and Parsons, R.G.: Stabilization of proteins immobilized on sepharose from leakage by glutaraldehyde crosslinking. *Anal. Biochem.* **102**, 72-76, 1980.
  - 24) Campbell, K.P. and MacLennan, D.H.: Purification and characterization of the 53,000-dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **256**, 4626-4632, 1981.
  - 25) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
  - 26) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354, 1979.
  - 27) Matsudaira, P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038, 1987.
  - 28) Zanetti, N.C. and Solursh, M.: Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **99**, 115-123, 1984.
  - 29) Oppenheimer-Marks, N. and Grinnell, F.: Effects of plant lectins on the adhesive properties of baby hamster kidney cells. *Eur. J. Cell Biol.* **23**, 286-294, 1981.
  - 30) Hynes, R.O.: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-554, 1987.
  - 31) Iannotti, J.P.: Growth plate physiology and pathology. *The Orthopedic Clinics of North America* **21**, 1-8, 1990.
  - 32) Gibson, G.J., Schor, S.L. and Grant, M.E.: Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: Synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J. Cell. Biol.* **93**, 767-774, 1982.
  - 33) Capasso, O., Tajana, G. and Cancedda, R.: Location of 64K collagen producer chondrocytes in developing chicken embryo tibiae. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1163-1168, 1984.
  - 34) Schmid, T.M. and Conrad, H.E.: Metabolism of low molecular weight collagen by chondrocytes obtained from histologically distinct zones of chick embryo tibiotarsus. *J. Biol. Chem.* **257**, 12451-12457, 1982.
  - 35) Suda, S., Takahashi, N., Shinki, T., Horiuchi, N., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Enomoto, S. and Suda, T.: 1  $\alpha$ -25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and their action in embryonic chick chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.* **37**, 82-90, 1985.
  - 36) Robison, R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* **17**, 286-293, 1923.
  - 37) Freish, H. and Neuman, W.F.: Mechanisms of calcification: Role of collagen, polyphosphates and phosphatase. *Am. J. Physiol.* **200**, 1296-1300, 1961.
  - 38) Kato, Y. and Gospodarowicz, D.: Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* **100**, 477-485, 1985.
  - 39) Kato, Y. and Iwamoto, M.: Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* **265**, 5903-5909, 1990.
  - 40) Iwamoto, M., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki, F. and Kato, Y.: Reduction in basic fibroblast growth factor receptor is coupled with terminal differentiation of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 461-467, 1991.
  - 41) Kato, Y., Shimazu, A., Nakashima, K., Suzuki,

- F., Jikko, A. and Iwamoto, M.: Effects of parathyroid hormone and calcitonin on alkaline phosphatase activity and matrix calcification in rabbit growth-plate chondrocyte cultures. *Endocrinology* 127, 114-118, 1990.
- 42) Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F. and Takano, Y.: Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor  $\beta$  and serum factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9552-9556, 1988.
- 43) Kato, Y., Nakashima, K., Iwamoto, M., Murakami, H., Hiranuma, H., Koike, T., Suzuki, F., Fuchihata, H., Ikehara, Y., Noshiro, M. and Jikko, A.: Effects of interleukin-1 on syntheses of alkaline phosphatase, type X collagen, and 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor, and matrix calcification in rabbit chondrocytes cultures. *J. Clin. Invest.* 92, 2323-2330, 1993.
- 44) Kato, Y., Shimazu, A., Iwamoto, M., Nakashima, K., Koike, T., Suzuki, F., Nishii, Y. and Sato, K.: Role of 1, 25-dihydroxycholecalciferol in growth-plate cartilage: Inhibition of terminal differentiation of chondrocytes *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6522-6526, 1990.
- 45) Taylor, L.M., Tertinegg, I., Okuda, A. and Heersche, J.N.M.: Expression of calcitonin receptors during osteoclast differentiation in mouse metatarsals. *J. Bone Mineral Res.* 4, 751-758, 1989.
- 46) Goldstein, I.J., Hollerman, C.E. and Smith, E.E.: Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. *Biochem.* 4, 876-883, 1965.
- 47) Gunther, G.R., Wang, J.L., Yahara, I., Cunningham, B.A. and Edelman, G.M.: Concanavalin A derivatives with altered biological activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1012-1016, 1973.
- 48) Cancedda, F.D., Gentili, C., Manduca, P. and Cancedda, R.: Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J. Cell. Biol.* 117, 427-435, 1992.
- 49) Ballock, R.T., Heydemann, A., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Roberts, A.B. and Sporn, M.B.: Inhibition of the chondrocyte phenotype by retinoic acid involves upregulation of metalloprotease genes independent of TGF- $\beta$ . *J. Cell. Physiol.* 159, 340-346, 1994.
- 50) Thaller, C. and Eichele, G.: Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327, 625-628, 1987.
- 51) Doege, K.J., Sasaki, M., Kimura, T. and Yamada, Y.: Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. *J. Biol. Chem.* 266, 894-902, 1991.
- 52) Inoue, H., Hiasa, K., Samma, Y., Nakamura, O., Sakuda, M., Iwamoto, M., Suzuki, F. and Kato, Y.: Stimulation of proteoglycan and DNA syntheses in chondrocytes by centrifugation. *J. Dent. Res.* 69, 1560-1563, 1990.
- 53) Reese, C.A. and Mayne, R.: Minor collagens of chicken hyaline cartilage. *Biochemistry* 20, 5443-5448, 1981.
- 54) Vaughan, L., Winterhalter, K.H. and Bruckner, P.: Proteoglycan Lt from chicken embryo sternum identified as type IX collagen. *J. Biol. Chem.* 260, 4758-4763, 1985.
- 55) Paulsson, M. and Heinegård, D.: Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem. J.* 183, 539-545, 1979.
- 56) Hiraki, Y., Tanaka, H., Inoue, H., Kondo, J., Kamizono, A. and Suzuki, F.: Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 971-977, 1991.
- 57) Halberg, D.F., Proulx, G., Doege, K., Yamada, Y. and Drickamer, K.: A segment of the cartilage proteoglycan core protein has lectin-like activity. *J. Biol. Chem.* 263, 9486-9490, 1988.
- 58) 山本一夫: レクチンの構造, 機能, および糖鎖認識機構. 生化学 66, 1111-1129, 1994.