

主論文題名

軟骨細胞の分化における p76/ コンドロト
ランスフェリンの役割：抗体を用いた解
析

学位申請者 尾田 良

原著

原稿総ページ数（図表を除く） 49

図 28

表 2

別刷数 100

表題

軟骨細胞の分化における p76/コンドロトランスフェリンの役割：抗体を用いた解析

軟骨細胞の分化における p76/コンドロ

トランスフェリンの役割：

抗体を用いた解析

尾田良

Role of p76/Chondrotransferrin in Chondro-
cyte Differentiation; Analysis with Anti-
Chondrotransferrin Antibodies

Ryo Oda

(平成9年1月14日受付)

緒言

骨の発生，成長および骨修復において内軟骨性骨化は不可欠で，この過程で軟骨細胞は，増殖期，基質産生期，肥大期を経て骨へと置換する。しかし，軟骨細胞の分化の調節機構は未だ不明である。

一般に，細胞分化の調節には形質膜上の成長因子受容体，細胞外マトリックス分子受容体，シグナル伝達調節蛋白などの糖蛋白が重要な役割を果たしている。従って，細胞分化の研究に糖蛋白と結合するレクチンは有用であり，実際多くのレクチンがリンパ球の増殖・分化を促進することが報告されている¹⁾。

一方 Yan らは，タチナタマメより得られるレクチンであるコンカナバリン A (ConA) が，軟骨細胞を未熟な扁平の形態から分化した球型に変化させ，軟骨分化のマーカであるプロテオグリカンとⅡ型コラーゲンの合成を著明に促進し²⁾，さらに最終分化のマーカであるビタミン D₃ 受容体，アルカリホスファターゼ，X 型コラーゲン及び石灰化を誘導することを報告している³⁾。しかもこれらの作用は，他の成長因子やホルモンと比べ強力であったが，軟骨細胞をレチノイン酸処理すると，ConA の分化促進作用は消失した²⁾。

石田は，ConA 作用を仲介する因子を ConA

結合性蛋白質として検索する過程で，ConAに結合する軟骨細胞形質膜の中で，76kDaの糖蛋白質（p76）がレチノイン酸により減少すること，また，p76は正常臓器において軟骨にのみ高レベルに発現し，その発現は軟骨細胞形質膜に局在していることを報告した⁴⁾。さらに，藤井はレチノイン酸によるp76の発現量の減少はmRNAレベルで調節されていること，また，p76を精製しアミノ末端及び内部シーケンスを解析，さらにcDNAをクローニングしてp76のアミノ酸配列がヒトの分子量97kDaの蛋白質（p97，メラノトランスフェリン）と86%，ヒト血清トランスフェリンと40%一致することを報告した⁵⁾。また，正常組織ではメラノサイトを含めてp76の発現が著しく低いことからp76は軟骨で主要な生理的役割を果たしていると考えられ，藤井らはp76をコンドロトランスフェリンと命名した。

本研究ではコンドロトランスフェリンに対

する各種の抗体を作製して、コンドロトランスフェリンの形質膜における存在様式、ConA作用へのコンドロトランスフェリンの関与、さらに軟骨細胞の分化におけるコンドロトランスフェリンの役割を検討した。

材料ならびに方法

1. 軟骨細胞の培養

軟骨細胞は Kato ら⁶⁾、Shimomura ら⁷⁾の方法に準じてウサギ肋軟骨から単離した。すなわち、生後4週齢の雄性日本白色家兎（広島実験動物）の肋骨静止軟骨部を分離し、尖刃刀にて細切した後、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アクチナーゼ E（科研製薬）と5%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM, 日水製薬）にて1時間、0.15%コラゲナーゼ（Worthington Biochemical 社）を含む DMEM にて3時間インキュベートした後、120 μm ナイロンフィルタ

一を通過する細胞を回収した。この細胞を組織培養用プラスチックシャーレ（Corning社）に播種し，37℃，5% CO₂気相下にて10%ウシ胎児血清（三菱化成），50μg/mlアスコルビン酸（和光純薬），50U/mlペニシリンGカリウム，60μg/mlカナマイシン（以上，明治製菓），250μg/mlアンホテリシンB（ICN Biochemical社）を含むアルファ変法イーグル培地（α-MEM，三光純薬）（medium A）または，同試薬を含むDMEM（medium B）中で培養した。

2. 軟骨細胞の継代

4週齢の雄性日本白色家兎の肋軟骨より単離した静止軟骨細胞を，直径15cmの培養シャーレを用いて30mlのmedium A中に10⁶個播種し，70%コンフルエントまで培養した。そして，phosphate buffered saline（PBS）で洗浄後0.1%トリプシン（Difco社）と0.1%EDTAを含むPBSにて3分間処理した後，120μmナ

イロンフィルターを通過する細胞を回収した。

3. コンドロトランスフェリンの精製

直径 15cm 培養用プラスチックシャーレ 30 枚 (corning 社) にてコンフルエント後 3 日まで medium A 中で培養した軟骨細胞を PBS にて 2 回洗浄し, ラバーポリスマンにて回収した。回収した軟骨細胞の懸濁液 (20ml) を 4 倍量 (80ml) の buffer A (0.25M sucrose, 5mM MOPS/KOH (pH7.4), 1mM EDTA, 1mM phenyl methylsulfonyl fluoride: PMSF, 10 μ M amidino-PMSF: APMSF, 10 μ M pepstatin A) で希釈し, ポリトロンにて氷上で粉碎した。さらに, この懸濁液をガラスホモジナイザーにてホモジナイズ後, 900 \times g で 4 $^{\circ}$ C にて 10 分間遠心を行い上清 (80ml) を回収した。沈殿はさらに 4 倍量の buffer A に懸濁し, ガラスホモジナイザーにて再度ホモジナイズし, 900 \times g で 4 $^{\circ}$ C にて 10 分間遠心を行い上清 (80ml) を回収した。回収した上清 (計

160ml) を 105, 000×g で 4℃ にて 1 時間超遠心し, 沈殿を 35ml の buffer A で懸濁後, 懸濁液 (8ml/チューブ) を遠心チューブ内の 17% (2ml) /40% (3ml) 蔗糖密度勾配溶液上へのせ, 4℃ で 1.5 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画分 (総計 8ml) を単離した。

次に, 軟骨細胞膜画分から蔗糖を除くため buffer B (5mM MOPS/KOH pH7.4, 1mM EDTA, 10 μM APMSF, 10 μM pepstatin A) にて 4 倍希釈 (32ml) し, 105, 000×g で 4℃ にて 1 時間遠心した。さらに, 沈殿を 40ml の buffer B で希釈し, 再度遠心した。沈殿 (50mg 蛋白) を 1%デオキシコール酸ナトリウム (Na-DOC) を含む buffer C (0.15M NaCl, 20mM Tris/HCl pH7.4, 10μM APMSF, 10μM pepstatin A) (40ml) により可溶化し, 105, 000×g で 4℃ にて 1 時間遠心し, 上清 (40ml) を回収した。次に, この上清を buffer C にて平

平衡化した WGA-Sepharose 6MB カラム (3×3 cm) (Pharmacia 社) に通し, その非結合画分を buffer C で平衡化した ConA-Sepharose カラム (3×3 cm) (Pharmacia 社) に通した。ConA 結合蛋白質 (2.5mg 蛋白) は, 0.5M methyl α -D-mannopyranoside (Sigma 社) を含む buffer C (40ml) を用いて溶出した。

次に, この溶出画分を限外濾過膜 (CENTRIPREP, Amicon 社) を用いて 2ml まで濃縮し, 塩濃度を下げるため buffer D (20mM Tris/HCl pH7.8, 0.05% Na-DOC, 0.5M methyl α -D-mannopyranoside) にて希釈 (10ml) した。これをさらに, monoQ カラム (0.5×5 cm) (Pharmacia 社) に buffer D と 1M NaCl を含む buffer D を用いて, 0-1.0M NaCl の濃度勾配, 0.5ml/min の流速で展開し, 蛋白を回収した。

各画分 (0.5ml) のうち 10 μ l を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し銀染色することにより, 単一まで精製されたコンド

ロトランスフェリン (100 μ g) の存在する画分を同定した。

4. 抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体の作製

3匹の8週齢のBALB/cマウスに、各々RIBIアジュバント溶液 (RIBI Immno Chem Research社) に混和したコンドロトランスフェリン (10 μ g/150 μ l) を皮下注射した。初回免疫の2, 4および5週間後に同量の抗原を注射して、その1週間後に採血した。これらのマウスより得た血清をそれぞれ抗コンドロトランスフェリン血清 prep-2, -3, -4とした。

5. 抗コンドロトランスフェリンモノクローナル抗体の作製⁸⁾

(1) Balb/c マウスへの免疫

65 μ g の抗原溶液 (20mM Tris/HCl pH7.8 0.5M NaCl 0.05% Na-DOC) (0.5ml) を同容量の RIBI アジュバントと混和し、8週齢

Balb/c マウス（日本クレア）3匹に等分して腹腔内投与し，その3週間後に13 μ gの抗原溶液（0.13ml/マウス）を同量のRIBIアジュバントと混和して腹腔内投与した。細胞融合に用いるマウスは，部分採血しELISA法にて決定した。

なお，ELISAはウサギ肋軟骨より単離した静止軟骨細胞を96穴プレート（Corning社）に10,000細胞/穴で播種してコンフルエント4日後まで培養し，過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド（PLP）固定した細胞プレートと，大腸菌にて作製したリコンビナント・コンドロトランスフェリン（10 μ g/ml）をコートしたものを抗原に用いた。

抗体価の最も高いマウスには二次免疫の2週間後に，三次免疫として13 μ gの抗原溶液（0.13ml）を同容量のRIBIアジュバントと混和し，マウスに腹腔内投与した。

（2）細胞融合

三次免疫処理の3日後にマウスより脾臓を

摘出し，50%ポリエチレングリコール存在下にて，P3-X63-Ag8-U1 マウスミエローマ細胞と細胞融合した⁹⁾。このマウスから得たポリクローナル抗体を prep-1 とした。

(3) 一次スクリーニング

上述と同様の軟骨細胞プレートとリコンビナント・コンドロトランスフェリン (10 μ g/ml) をコートしたプレートを用いて，ハイブリドーマの培養上清中の抗体の有無を ELISA 法に測定し，反応性のある 25 株を選択した。

(4) 二次スクリーニング

24 穴プレートにて元株細胞を培養し，再度その上清中の抗体価を細胞プレートとリコンビナント・コンドロトランスフェリン (10 μ g/ml) をコートしたプレートを用いての ELISA およびウサギ培養静止軟骨細胞の膜画分 (5 μ g) を抗原としてイムノブロットにて測定し，クローニングする 8 株を選択した。

(5) クローニング

選択した 8 株を, cloning medium (三光純薬) をフィーダー細胞の代わりとして, 96 穴プレートに 0.2 個/穴の細胞密度で播種し, 37℃で培養した。1 週間に 2 回培地を交換し, 2 週間後ハイブリドーマのコロニーを確認し, 24 穴プレートに移し培養し, さらに細胞密度が十分に高くなったところで 35-mm ディッシュに移した。この操作をさらにもう一度繰り返し, 最終的に 6 株 (No.2, 4, 9, 12, 17, 23) を確立した。

(6)ハイブリドーマクローン株のサブクラス検討

クローン株の産生する Ig は, 各種の抗血清 (Zymed 社) を用いて検索した結果, mAb-23 が IgG2b で, その他はすべて IgG1 であった。

6. 腹水の採取

5 匹の Balb/c マウスにそれぞれ 0.5ml の 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane (プリスタン) を腹腔内投与し, その 1 週間後にあらか

じめ培養しておいたハイブリドーマを血清不含の DMEM で 4×10^6 個/ml に分散させ，その 0.5ml を腹腔内投与した。1～3 週間後に腹水で腹部が膨れてくるのを確認し，腹部を切開しパスツールピペットを用いて腹水を採取し，あらかじめ 0.2ml の 0.2M $\text{Na}_3 \cdot \text{EDTA}$ 溶液を入れた 50ml 遠心管に回収した。これを確立した 6 株について行った。

7. IgG 精製

採取した腹水を硫酸分画により粗精製した。すなわち，各腹水を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターに通した後，飽和硫酸アンモニウム溶液を加え 20%硫酸アンモニウム溶液とし，析出した沈殿物を除去してその上清を回収し，再び飽和硫酸アンモニウム溶液を加え 50%硫酸アンモニウム溶液として析出した沈殿物を回収し PBS に対して溶解した。次いで，20mM Naphosphate, pH7.0 で平衡化した protein G カラム ($1 \times 3 \text{ cm}$) (Pharmacia 社) に展開し，

0.1M glycine-HCl, pH2.7 にて溶出し, 即座に 1M Tris-HCl, pH9.0 で中和した。さらに, PBS に対して透析を行い, 精製された IgG を得た。これらを以後, mAb-2, -4, -9, -12, -17, -23 とした。

8. イムノプロット

上記した抗コンドロトランスフェリン抗体は, イムノプロット法にてその特異性と抗体価を確認した。まず, 抗原を含む蛋白を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し, PVDF 膜 (Immobilon, Millipore 社) に転写した¹⁰⁾。この PVDF 膜を 4% スキムミルクを含む PBS で 2 時間ブロッキングして, 100~1000 倍希釈した抗コンドロトランスフェリン抗体を含む PBS と 4℃, 17 時間インキュベートした。さらに, ¹²⁵I-標識抗マウス IgG F(ab')₂断片 (アマシャム社) と 2 時間インキュベートし, 洗浄後, オートラジオグラフィーにより反応バンドを検出した。

9. 組織分布および軟骨組織中における分布

(1) 組織分布

4週齢の雄性日本白色家兎より単離した静止軟骨細胞，線維芽細胞，骨芽細胞の培養系より得た膜画分，および脳，肝臓，腎臓，膵臓，小腸，精巣から直接分離した膜画分（各10 μ g 蛋白）をイムノプロットに供した。なお，一次抗体として500倍希釈した prep-4 を用いた。

(2) 軟骨組織中における分布

4週齢の雄性日本白色家兎の肋軟骨をまず，成長板と静止軟骨に分画した。成長板は，さらに肥大層，基質形成層，増殖層に分けた。これらをそれぞれ G1，G2，G3 とした。また，膝関節の大腿骨頭から関節軟骨も回収した。これら G1～G3，静止軟骨および関節軟骨をそれぞれ尖刃刀にて細切した後，4M グアニジンに対して溶解し，さらに PBS に対して透析し

た。このようにして得た抽出物の 0.5 μ g 蛋白をイムノプロットに供した。

10. 培養細胞の免疫染色

4 週齢の雄性日本白色家兎より単離した静止軟骨細胞を Chamber Slide (Nunc 社) 内で medium A 中で培養し, PBS で洗浄後 3.7%ホルムアルデヒドにて 4℃, 30 分間固定した後, 再度 PBS で洗浄し, 室温で 10%ヒツジ血清を含む PBS で 30 分間インキュベートし非特異的結合をブロッキングした。さらに, PBS で洗浄後, 抗コンドロトランスフェリン抗血清あるいはコントロール血清 (PBS で 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')₂ 断片 (300 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。その後 0.05% Tween20/PBS で 1 回, PBS で 2 回洗浄後, 封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss 社, LSM410) (広島大学歯学

部中央研究室所属) を用いて観察した。

11. 組織切片の免疫染色

4 週齢の雄性日本白色家兎の肋軟骨を切除後, 24 時間 PLP 固定後¹¹⁾水洗し, 固定・パラフィン包埋後 6 μ m の厚さの切片を作製し, 脱パラフィン処理を施した。切片は 0.3% H₂O₂ および 0.1% NaN₃ を含むメタノールにて内因性ペルオキシダーゼを不活性化し, 以後ペクスタイン免疫組織化学染色システム (ABC-PO; mouse-IgG キット, Vector Lab.社) を用いて以下の通りコンドロトランスフェリンの免疫染色を行った。

まず, ウシ精巢ヒアルロニダーゼ 250U/ml (Sigma 社) で 37 $^{\circ}$ C 下で 10 分間処理して, さらに 0.15% 正常ウマ血清とインキュベートすることにより非特異的結合をブロッキングした。その後, 100 倍希釈した抗コンドロトランスフェリン抗体 prep-4 あるいはコントロール血清と 30 分間インキュベートし, PBS で洗

浄した。続いて、ビオチンラベル抗マウス-ウマ IgG (200 倍希釈) と 30 分間インキュベートし、PBS で洗浄した。次に、標準試薬と 30 分間インキュベートし、PBS で洗浄後、DAB 基質 (ベクスタイン DAB 基質キット, Vector Lab.社) と 2 分間インキュベートし、5 分間水洗した。なお、ヘマトキシリンにて対比染色も行った。

12. ホスファチジルイノシトール特異的ホスファリパーゼ C (PI-PLC) 処理によるコンドロトランスフェリンの培養上清中への遊離

4 週齢の雄性日本白色家兎より単離した静止軟骨細胞を 96 穴プレートでコンフルエント後 4 日間 medium A 中で培養した後、無血清の α -MEM で 24 時間インキュベートし、PI-PLC (50% glycerol 0.1M NaCl を含む 10mM Tris-HCl buffer pH7.5 に溶解) (1.7U/10⁶細胞) (フナコシ) で 37℃, 2 時間処理し培養上清を回収 (100 μ l/穴) し、細胞層は PBS で

3 回洗浄後 Laemmli 緩衝液を用いて回収 (100 μ l/穴) した。回収した培養上清および細胞層は、それぞれ 5 および 20 μ l/lane でイムノプロットに供した。なお、一次抗体には、500 倍希釈した prep-4 を用いた。

13. 軟骨細胞の形態変化の観察

静止軟骨細胞を 10⁴個/穴、100 μ l の medium B で 96 穴プレートに播種、または 5 \times 10⁴個/穴、500 μ l の medium B で 24 穴プレートに播種し、90% confluent で上清を抜き取り、0.5% のウシ胎児血清を含む F-12/DMEM (1:1) (100 μ l) に置換した。24 時間後、各種抗体を添加した。ConA (Sigma 社) はその 30 分後に添加した。そして 24 時間後、位相差顕微鏡 (OLYMPUS IX70) にて観察した。

14. プロテオグリカン合成

静止軟骨細胞を 10⁴個/穴、100 μ l の medium B で 96 穴プレートに播種し、90%コンフルエ

ントに達したとき培養液を 100 μ l の 0.5% のウシ胎児血清を含む F-12/DMEM(1:1) に置換した。24 時間後、各種抗体を添加した。ConA, サクシニル-ConA (S-ConA), ジブチリル cyclic AMP (DBcAMP) あるいはインスリン (以上 Sigma 社) は、その 30 分後に添加した。[³⁵S] 硫酸は培養停止の 6 時間前に 0.5 μ Ci/ml の濃度で添加して、ConA 添加後 24 時間の影響を測定した。

あるいは、静止軟骨細胞を 10⁴個/穴、100 μ l の medium A で 96 穴プレートに播種し、コンフルエント時よりヒアルロン酸のみを特異的に分解するヒアルロニダーゼ (1unit/ml) (放線菌由来、天野製薬) とともに各種抗体を添加して、4 日間培養した。なお、培養液は 2 日毎に交換した。[³⁵S] 硫酸 (0.5 μ Ci/ml) は培養停止の 6 時間前に添加した。プロテオグリカン合成能は、セチルピリジニウムにより沈殿した画分への [³⁵S] 硫酸の取り込みから算定した¹²⁾。

15. DNA 合成

静止軟骨細胞を 10^4 個/穴, $100\mu\text{l}$ の medium A で 96 穴プレートに播種し, 90%コンフルエントに達したとき培養液を $100\mu\text{l}$ の 0.5% のウシ胎児血清を含む medium A に置換した。24 時間後, 各種抗体を添加した。ConA, S-ConA は, その 30 分後に添加した。 [^3H] thymidine は培養停止の 3 時間前に $10\mu\text{Ci/ml}$ の濃度で添加して, ConA 添加後 24 時間の影響を測定した。DNA 合成能は, 細胞内に取り込まれた [^3H] thymidine をトリクロロ酢酸溶液で固定し, NaOH 溶液で溶解したものを測定して算定した¹³⁾。

16. リンパ球の凝集, 幼若化および DNA 合成

4 週齢の日本白色家兎の胸腺を medium A 中で切開し軽くほぐした後, $120\mu\text{m}$ ナイロンフィルターを通過する細胞を回収し, medium A に 3×10^6 細胞/ml となるよう調節し, 懸濁液

0.2mlを24穴プレート播種した。それと同時にモノクローナル抗体及びコントロール IgG を添加し，ConAはその30分後に添加した。そして，66時間後，位相差顕微鏡にて観察した。また，66時間後に $3\mu\text{Ci/ml}$ となるように [^3H] thymidine を添加し，培養をさらに6時間続けた。次いで，ガラスフィルター（TOYO社）上に培養細胞を採取し，PBSで細胞をよく洗浄した後，ガラスフィルターに存在する放射活性を液体シンチレーションカウンター（ATTO社）で測定した。

結 果

1. 抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体

材料と方法で記した方法で4匹のマウスに免疫注射し，ロットの異なる4種類の抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体

(prep-1~-4) を作製した。図 1A に示すように, prep-1~-4 はコンドロトランスフェリンと特異的に反応した。なお, prep-1~-3 は 100, 300, 500 倍希釈で最大のバンドを検出したが 1000 倍希釈では反応が減少した。一方, prep-4 は 1000 倍希釈でも最大の反応性を示した(データ示さず)。

2. 抗コンドロトランスフェリンモノクローナル抗体

mAb-2, -4, -9, -12, -17, -23 は, いずれもコンドロトランスフェリンと特異的に反応した(図 1B)。なお ELISA 法で検討した結果, mAb-2 は $0.15\mu\text{g/ml}$, mAb-4 は $0.19\mu\text{g/ml}$, mAb-9 と mAb-12 は $0.1\mu\text{g/ml}$, mAb-17 は $0.12\mu\text{g/ml}$, mAb-23 は $0.13\mu\text{g/ml}$ までの希釈で最大の反応性を示した。

3. 組織分布および軟骨組織中の分布

軟骨細胞の膜画分には, prep-4 に強く反応

する 76kDa のコンドロトランスフェリンが存在したが，線維芽細胞，骨芽細胞およびその他の組織から得た膜画分には，コンドロトランスフェリンは検出できなかった（図 2A）。また，成長板軟骨（G1～G3），静止軟骨および関節軟骨の粗抽出画分にも高レベルのコンドロトランスフェリンが存在した（図 2B）。

図 2

4. 細胞免疫染色

コントロール血清は，軟骨細胞を染色しなかったが（図 3A，C），抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体は全ての細胞を強く染色した（図 3B，D）。また，高倍率ではコンドロトランスフェリンの軟骨細胞形質膜への局在が観察された（図 3E）。

図 3

5. 免疫組織染色

生体内の軟骨細胞にコンドロトランスフェリンが存在することは，抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体による免疫組織

染色よっても示された（図 4A）。なお，軟骨細胞はコントロール血清に対して染色反応を示さなかった（図 4B）。

図 4

6. コンドロトランスフェリンの疎水性部位

アミノ酸配列を Kyte と Doolittle の計算式に基づき分析すると¹⁴⁾，疎水性の高い領域はアミノ末端のシグナルペプチドとグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー結合に必要とされるカルボキシル末端の領域にのみ存在した（図 6）。

図 6

7. ホスファチジルイノシトール特異的ホスファリパーゼ C (PI-PLC) の影響

軟骨細胞の細胞層および培養上清をイムノブロットで検討すると，無添加および vehicle では培養上清中にコンドロトランスフェリンは存在せず，細胞層にのみ存在した。しかし，軟骨細胞を PI-PLC と共にインキュベートすると細胞層のコンドロトランスフェリンは減

少し培養上清中に遊離した（図 7）。

図 7

8. 軟骨細胞の形態に対する抗コンドロトランスフェリン抗体の影響

軟骨細胞培養系へのコントロール血清（図 8A）あるいは抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体 prep-1（図 8C）の単独添加は，細胞形態に影響しなかった。一方，ConA を添加すると細胞形態は球型に変化した。この ConA の作用をコントロール血清は阻止しなかったが（図 8B），prep-1 は ConA の軟骨細胞球型化作用をほぼ完全に抑制した（図 8D）。また，prep-2，-3 も prep-1 より弱いものの同様の抑制作用を示した（表 1）。一方，prep-4 は ConA 作用の抑制を低レベルにしか示さなかった（表 1）。

図 8

表 1

次に，ConA の軟骨細胞球型化作用を最も強く抑制した prep-1 を採血したマウスからモノクローナル抗体を作製した。これらのモノクローナル抗体のなかには ConA 作用を抑制す

る IgG が存在する可能性がある。実際，作製した 6 クローンの中で，抗コンドロトランスフェリンモノクローナル抗体 mAb-2 は ConA 作用を抑制した（図 9，10，表 1）。ConA の軟骨細胞球形化作用に対して（図 9B），mAb-2 は濃度依存的に抑制し，その効果は 20 μ g/ml でほぼ最大となった（図 9D~F）。なお，コントロール IgG は細胞形態に影響しなかった（図 9C）。

図 9

図 10

9. プロテオグリカン合成に及ぼす mAb-2 の影響

軟骨細胞の分化機能の発現に対する抗コンドロトランスフェリン抗体の影響をプロテオグリカン合成を測定することにより検討した。mAb-2 は濃度依存的に ConA のプロテオグリカン合成促進作用を抑制した（図 10A，表 1）。その効果は，5 μ g/ml で見いだされ 20 μ g/ml で最大となった。しかし，コントロール IgG および mAb-17 は 30 μ g/ml の高濃度でもプロ

テオグリカン合成に影響しなかった。また，
mAb-2 は S-ConA のプロテオグリカン合成促進作用をもほぼ完全に抑制した（図 10B）。

ConA 以外に，cyclic AMP 誘導体である DBcAMP とインスリンも軟骨細胞のプロテオグリカン合成を促進する¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし，mAb-2 はこれらの薬物によるプロテオグリカン合成の促進には影響しなかった（図 11）。

図 11

10. DNA 合成に対する mAb-2 の影響

ConA および S-ConA は軟骨細胞の増殖を抑制した³⁾。 mAb-2 (5 ~ 20 μ g/ml) は，ConA の DNA 合成抑制作用に影響しなかったが（図 12A），S-ConA により低下した DNA 合成を部分的に回復させた（図 12B）。

図 12

11. ConA によるリンパ球活性化に対する mAb-2 の影響

ConA は，*Phaseolus vulgaris* agglutinin (PHA) などの他のレクチンと同様にリンパ

球を凝集させ，幼若化させ（blast formation）かつ増殖を促進する¹⁾。本研究でも，胸腺リンパ球に $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の ConA を 66 時間添加後に観察すると，細胞が凝集して（図 13B），偽足を伸ばした細胞や大型細胞が出現した（図 13E）。しかし，mAb-2 は ConA によるリンパ球の凝集および幼若化を阻害しなかった（図 13C, F）。さらに，ConA ($3\mu\text{g}/\text{ml}$) は DNA への [^3H] thymidine 取り込みを 15 倍以上促進した。しかし，mAb-2 はこの ConA の DNA 合成促進作用に影響しなかった（図 14）。コントロール IgG および mAb-17 もリンパ球に対する ConA 作用に影響しなかった。なお，胸腺リンパ球に対する ConA の DNA 合成促進作用は $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で出現し $3\mu\text{g}/\text{ml}$ で最大となった（データ示さず）。

図 13

図 14

12. プロテオグリカン合成に対する mAb-2 単独の影響

ヒアルロニダーゼと共にコントロール IgG,

mAb-17あるいはmAb-2存在下で軟骨細胞を4日間インキュベートして、プロテオグリカン合成に及ぼす影響を検討した。IgGは分子量が約15万と大きいため分化した軟骨細胞により産生される軟骨基質層を通過することが困難であるので、本実験では基質の蓄積を抑制するヒアルロニダーゼを添加した。また、コンドロトランスフェリンの発現量はコンフルエント直後から4日間で10倍以上急激に増加するので（データ示さず）、mAb-2をコンフルエント直後から4日間添加した。本実験条件下で、mAb-2は濃度依存的にプロテオグリカン合成を抑制し、20 μ g/ml以上で最大の抑制を示した（図15）。しかし、コントロールIgGおよびmAb-17はプロテオグリカン合成に影響しなかった。

図 15

13. 軟骨細胞の分化に及ぼす抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体 prep-4 の影響

prep-4 は ConA 作用と類似して細胞の形態を扁平から球型に変化させた (図 16B)。また, prep-2, -3 も prep-4 より弱いながらも同様の ConA 様作用を示した (表 2)。さらに, prep-4 はプロテオグリカン合成を濃度依存的に促進し, 1%では約 2 倍にまでプロテオグリカン合成を促進した (図 17)。

図 16

表 2

図 17

考 察

細胞分化の制御には, 形質膜上の糖蛋白質およびこれらと結合する因子が重要な役割を果たしている。軟骨でも, 膜糖蛋白質は分化の誘導や石灰化の制御に関わっていると考えられ, 実際, タチナタマメより得られるレクチンである ConA は軟骨細胞の分化を促進する。すなわち, ConA は軟骨細胞を未熟な扁平な形態から分化した球型に変化させ, プロテオグリカン合成を促進した²⁾。さらに, これ

らの ConA 作用はレチノイン酸の前処理により抑制された。一方，軟骨細胞形質膜の ConA 結合画分にはコンドロトランスフェリンが高レベルに存在しており，しかも，その発現はレチノイン酸により減少した⁴⁾。従って，コンドロトランスフェリンは軟骨細胞の分化促進作用を仲介する ConA 受容体である可能性がある。

本研究では，コンドロトランスフェリンに対する特異的な抗体を作製し，この蛋白が軟骨（成長板，静止軟骨，関節軟骨）にのみ高レベルに発現することを示した。また，コンドロトランスフェリンが *in vitro* と *in vivo* で軟骨細胞形質膜上に局在していること，およびグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー（GPI アンカー）で形質膜と結合していることを明らかにした。

GPI アンカーはホスファチジルイノシトールにグリコサミン 1 残基とマンノース 3 残基がグリコシド結合し，マンノースの非還元末

端がエタノールアミンとリン酸ジエステル結合し、さらに、そのアミンが蛋白のカルボキシル末端とアミド結合する基本構造をとる¹⁷⁾

(図 5)。このアミド結合の際、蛋白質のカルボキシル末端の 17~31 残基から成る疎水性ペプチドが切断されその切断によって生じた新しいカルボキシル末端がエタノールアミンに結合する¹⁸⁾。この切断されるカルボキシル末端のペプチドが、アンカー糖鎖結合のための一種のシグナルになっていることが補体制御因子である DAF (decay-accelerating factor) を材料に用いて Carasらによって証明されている¹⁹⁾。コンドロトランスフェリンにおいても疎水性の高い領域は、アミノ末端のシグナルペプチド領域とアンカー糖鎖結合のためのシグナルとなるカルボキシル末端の両端に存在し、GPI アンカーの条件を有している (図 6)。

また、GPI アンカー型蛋白は、PI-PLC により、図 5 の矢印で示すホスファチジルイノシ

図 5

トールのリン酸とジアシルグリセロールの間で特異的に切断され遊離することが知られている²⁰⁾²¹⁾。この切断は GPI アンカー同定のための指標であり，コンドロトランスフェリンも同様に PI-PLC 処理により形質膜から培養上清中に遊離した（図 7）。

コンドロトランスフェリンが ConA 受容体であるとの仮説が正しいとすれば，抗コンドロトランスフェリン抗体は軟骨細胞に対する ConA 作用に影響するはずである。実際に，ポリクローナル抗体 prep-1 は強力に，そして prep-2, -3 も中等度に ConA の軟骨細胞球型化作用を抑制した（図 8, 表 1）。また，prep-1 は ConA のプロテオグリカン合成促進作用も抑制した（表 1）。さらに，ConA の軟骨細胞球型化作用を最も強く抑制した prep-1 を採血したマウスから作製したモノクローナル抗体 mAb-2 は ConA による軟骨細胞の球型化および ConA と S-ConA によるプロテオグリカン合成の促進を強く抑制した（図 9, 10A, 表 1）。

抗コンドロトランスフェリン抗体のプロテオグリカン合成促進の抑制効果は、ConAに対して特異的であり、DBcAMPやインスリンによるプロテオグリカン合成の促進には影響しなかった（図 11）。一方、ConAとS-ConAは軟骨細胞のDNA合成を抑制するが、この作用はmAb-2により部分的にしか回復しなかった（図 12）。これらの結果は、ConAのDNA合成抑制にはコンドロトランスフェリンは部分的にしか関与していないことを示唆している。また、mAb-2はConAのリンパ球活性化作用に影響しなかったので（図 13, 14）、コンドロトランスフェリンはレクチンによるリンパ球の活性化には関与しないと考えられる。この結果は、コンドロトランスフェリンが軟骨にのみ高レベルに存在することと一致している。

動物生体内には植物レクチンであるConAは存在しないので、ConAはコンドロトランスフェリンに結合する未知のリガンド（軟骨分

化促進因子)の作用を模倣していると推察される。軟骨分化促進因子は増殖が停止したコンフルエント以後分泌されると推測されるが、実際コンフルエント後4日間 mAb-2を添加し続けると、プロテオグリカン合成の上昇が抑制された(図15)。この結果は、軟骨細胞の分化を最大限に亢進させるにはコンドロトランスフェリンの活性化が必須であることを示唆している。

興味深いことに、本研究では ConA 作用を阻害する抗体だけでなく、ConA 様作用を示す抗体も得られた。すなわち、prep-4 単独添加は ConA と同様に細胞形態を球型に変化させ、また、prep-2, -3 も弱いながら ConA 作用を模倣した(図16, 表2)。しかも、prep-4 はプロテオグリカン合成をも促進した(図17)。

これらの結果は、一見矛盾しているように思える。しかし、ポリクローナル抗体には同一抗原分子上の異なるエピトープを認識する IgG が混在しており、抗コンドロトランスフ

エリンポリクローナル抗体のエピトープの認識の差異が, prep-1~-4の生物作用の違いを説明すると考えられる。すなわち, これらのポリクローナル抗体は, ConAと同じ作用を示すようなエピトープを認識する抗体と ConA作用を阻害するエピトープを認識する抗体を様々な割合で同時に含んでいると推察される。prep-1は ConA作用を阻害する IgG (mAb-2など) を多く含んでいて, prep-4は ConA作用を模倣する IgG を多く含んでいると考えられ, prep-2, -3は両者の効果を共に観察できる割合で含んでいると考えられる。なお, 成長因子の受容体およびインテグリンに対する抗体の中には生物作用がない抗体および中和抗体以外にリガンドと同等の生物作用を示す抗体があることが多くの例で知られている²²⁾。

以上の結果からの推論を図 18 に示す。コンドロトランスフェリンの発現は mRNA レベルで生理的濃度のレチノイン酸によって抑制され⁵⁾, 血清中に存在する未知の因子によって

図 18

促進される（データ示さず）。そして、発現したコンドロトランスフェリンに ConA, ConA 作用を模倣する抗体あるいは未知のリガンドが結合するとコンドロトランスフェリンを介して分化を誘導するシグナルが伝達される。

このシグナル伝達系として、コンドロトランスフェリンが GPI アンカー蛋白であることから二つの可能性がある。一つは、GPI アンカー蛋白がリガンドと結合することにより、GPI アンカー分子の会合（clustering）が起こり endocytosis による細胞内への取り込み（internalization）が起こる。同時に活性化された PI-PLC により GPI アンカー結合部が切断され、可溶性蛋白分子と共に生成されたジアシルグリセロール、ホスファチジン酸および GPI が直接セカンドメッセンジャーとして働きシグナルが細胞内に伝達されるというものである^{23) 24)}。事実、T細胞において GPI アンカー分子を抗体で刺激した場合、GPI アン

カー分子の endocytosis と可溶性蛋白の細胞外放出が起こり DNA 合成が亢進することが観察されている²⁵⁾。もう一つは, transducer の介在である。ヒト T 細胞の GPI アンカー蛋白である CD59, CD55, CD48 やマウス T 細胞の Thy-1 は, protein tyrosine kinase の p56^{lck} と結合しており, それぞれの抗体刺激に反応して チロシンリン酸化が亢進する²⁶⁾。また, インターロイキン-6ファミリーの毛様体神経栄養因子 (CNTF) の受容体も GPI アンカー蛋白であり, CNTF 刺激により gp130 と leukemia inhibitory factor (LIF) 受容体と会合してシグナルを伝達する²⁷⁾。

一方, ConA や固定化された高濃度の未知のリガンドによってコンドロトランスフェリンの広範囲の clustering が起こると, 先の直接的分化シグナル以外にインテグリンの活性の抑制による細胞の球型化が起こり, この経路でも分化シグナルが伝達されると考えられる。いずれにせよ, ConA と抗コンドロトランスフ

エリン抗体は軟骨細胞の分化機構を解明するための今後の研究に役立つと期待される。

結 論

コンドロトランスフェリンは，GPI アンカーを介して軟骨細胞形質膜と結合していることが示唆された。またコンドロトランスフェリンは，軟骨細胞の分化に対する ConA の促進作用を仲介する受容体であることが判明した。

謝 辞

稿を終えるにあたり，御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯学部歯科保存学第一講座新谷英章教授および口腔生化学講座加藤幸夫教授に感謝します。さらに，本論文作成上，

御助言を賜りました歯科薬理学講座土肥敏博教授に深謝致します。また，口腔生化学講座 Yan Weiqun 博士，能城光秀助教授，河本健博士，大宅芳枝博士，橋本和人博士，ヘキストジャパン株式会社 Pan Haiou 博士にも本研究への協力に感謝します。最後に，本研究を進めるに際し多大なる御支援を頂いた歯科保存学第一講座ならびに口腔生化学講座の関係各位に感謝します。

参考文献

- 1) 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, 1-158, 1990.
- 2) Yan, W.Q., 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.

- 3) Yan, W.Q., Pan, H., Ishida, H., Nakashima, K., Suzuki, F., Nishimura, M., Jikko, A., Oda, R. and Kato, Y.: Effects of concanavalin A on chondrocyte hypertrophy and matrix calcification. *J. Biol. Chem.* in press, 1997.
- 4) 石田秀幸: 軟骨細胞の伸展, 分化に關与するコンカナバリン A 結合膜蛋白質に關する研究. 廣大齒誌 27, 195-209, 1995.
- 5) 藤井理史: 軟骨細胞に發現する膜型トランスフェリン様糖蛋白質 p76 の精製と性質. 廣大齒誌 28, 74-84, 1996.
- 6) 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.
- 7) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki,

- F.: Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tissue Res.* 19, 179-187, 1975.
- 8) Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497, 1975.
- 9) Yelton, D.E., Diamond, B.A., Kwan, S.P. and Scharff, M.D.: Fusion of mouse myeloma and spleen cells. *Curr Top Microbiol. Immunol.* 81, 1-7, 1978.
- 10) 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. U. S. A.* 76, 4350-4354, 1979.
- 11) McLean, I.W. and Nakane, P.K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy.

J. Histochem. Cytochem. 22, 1077-1083,
1974.

12) Kato, Y., Nomura, Y., Daikuhara, Y.,
Nasu, N., Tsuji, M., Asada, A. and
Suzuki, F.: Cartilage-derived factor (CDF)
I. Stimulation of proteoglycan synthesis in
rat and rabbit costal chondrocytes in culture.
Exp. Cell Res. 130, 73-81, 1980.

13) Kato, Y., Hiraki, Y., Inoue, H.,
Kinoshita, M., Yutani, Y. and Suzuki,
F.: Differential and synergistic actions of
somatomedin-like growth factors, fi-
broblast growth factor and epidermal
growth factor in rabbit costal chondrocytes.
Eur. J. Biochem. 129, 685-690, 1983.

14) Kyte, J. and Doolittle, R.F.: A simple
method for displaying the hydrophobic
character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157,
105-132, 1982.

15) Kato, Y., Koike, T., Iwamoto, M.,

- Kinoshita, M., Sato, K., Hiraki, Y. and Suzuki, F.: Effects of limited exposure of rabbit chondrocyte cultures to parathyroid hormone and dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate on cartilage-characteristic proteoglycan synthesis. *Endocrinology* 122, 1991-1997, 1988.
- 16) Kato, Y. and Gospodarowicz, D.: Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocyte cultures maintained in serum-free medium. *J. Cell Physiol.* 120, 354-363, 1984.
- 17) Tartakoff, A.M. and Singh, N.: How to make a glycoinositol phospholipid anchor. *Trends. Biochem. Sci.* 17, 470-473, 1992.
- 18) Low, M.G.: Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem. J.* 244, 1-13, 1987.
- 19) Caras, I.W. and Weddell, G.N.: Signal peptide for protein secretion directing gly-

cophospholipid membrane anchor attachment. *Science* 243 , 1196-1198 , 1989.

20)Low, M.G.: The glycosylphosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 988 , 427-454 , 1989.

21)Food, M.R., Rothenberger, S., Gabathuler, R., Haidl, I.D., Reid, G. and Jefferies, W.A.: Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J. Biol. Chem.* 269 , 3034-3040, 1994.

22)Seftor, R.E., Seftor, E.A., Stetler Stevenson, W.G. and Hendrix, M.J.: The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins during human melanoma cell invasion. *Cancer Res.* 53 ,

cophospholipid membrane anchor attachment. *Science* 243 , 1196-1198 , 1989.

20)Low , M.G.: The glycosylphosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 988 , 427-454 , 1989.

21)Food , M.R. , Rothenberger , S. , Gabathuler, R., Haidl, I.D., Reid, G. and Jefferies , W.A.: Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J. Biol. Chem.* 269 , 3034-3040, 1994.

22)Seftor, R.E., Seftor, E.A., Stetler Stevenson, W.G. and Hendrix, M.J.: The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins during human melanoma cell invasion. *Cancer Res.* 53 ,

- 3411-3415, 1993.
- 23) Romero, G., Luttrell, L., Rogol, A., Zeller, K., Hewlett, E. and Larner, J.: Phosphatidylinositol-glycan anchors of membrane proteins: potential precursors of insulin mediators. *Science* 240, 509-511, 1988.
- 24) Eardley, D.D. and Koshland, M.E.: Glycosylphosphatidylinositol: a candidate system for interleukin-2 signal transduction. *Science* 251, 78-81, 1991.
- 25) Soloski, M.J., Vernachio, J., Einhorn, G. and Lattimore, A.: Qa gene expression: biosynthesis and secretion of Qa-2 molecules in activated T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 2949-2953, 1986.
- 26) Stefanova, I., Horejsi, V., Ansotegui, I.J., Knapp, W. and Stockinger, H.: GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science*

254, 1016-1019, 1991.

27) Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y. and Yancopoulos, G.D.: LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260, 1805-1808, 1993.

表題脚注

広島大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任：新谷英章教授)

本論文の要旨は，平成7年9月の第37回歯科
基礎医学会において発表した。

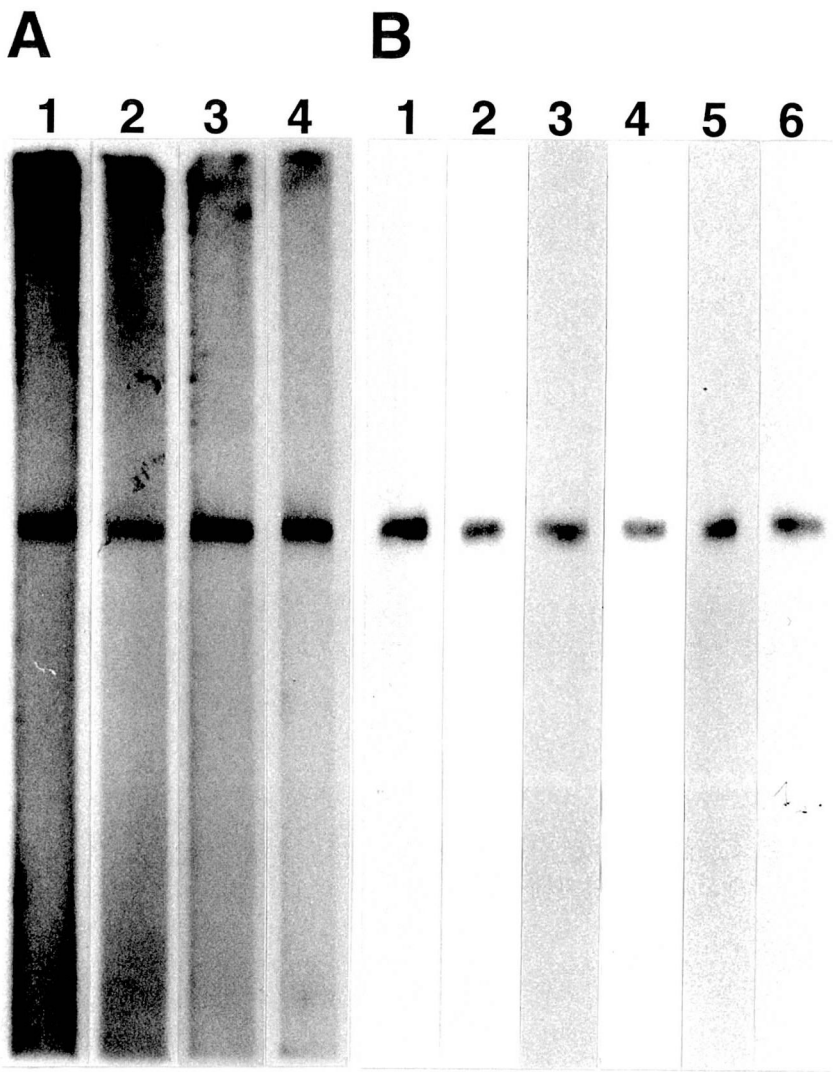
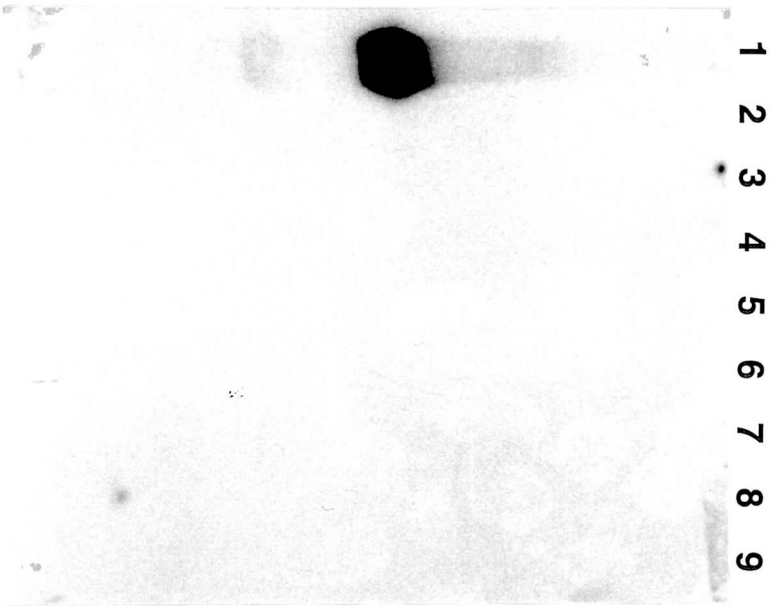
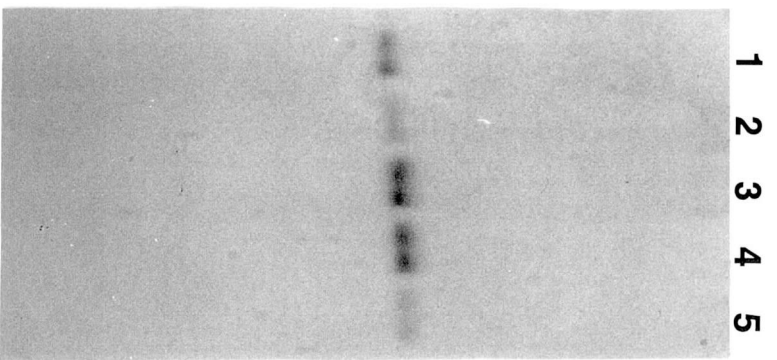


図 1

A



B



☒ 2

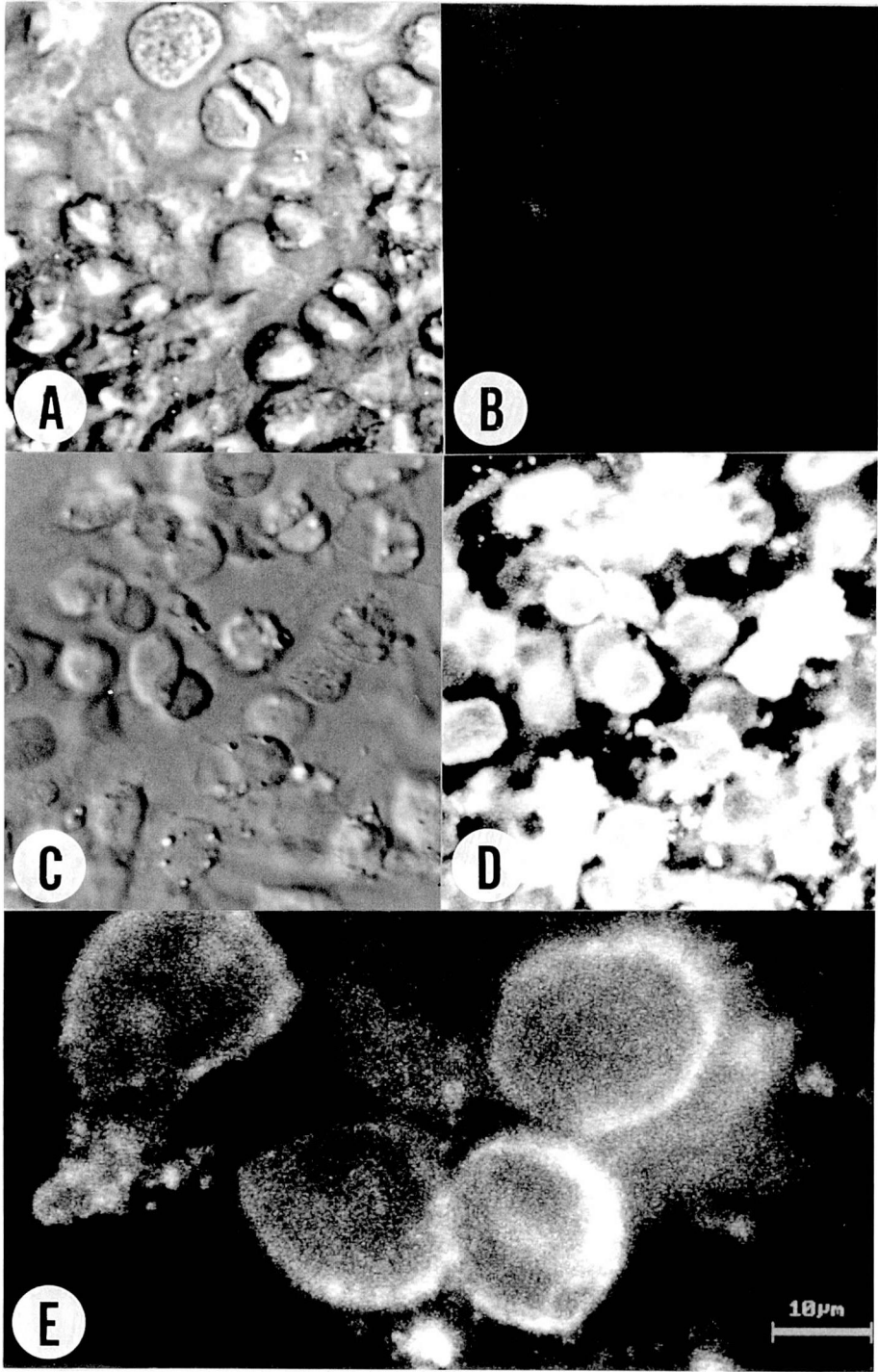


図 3

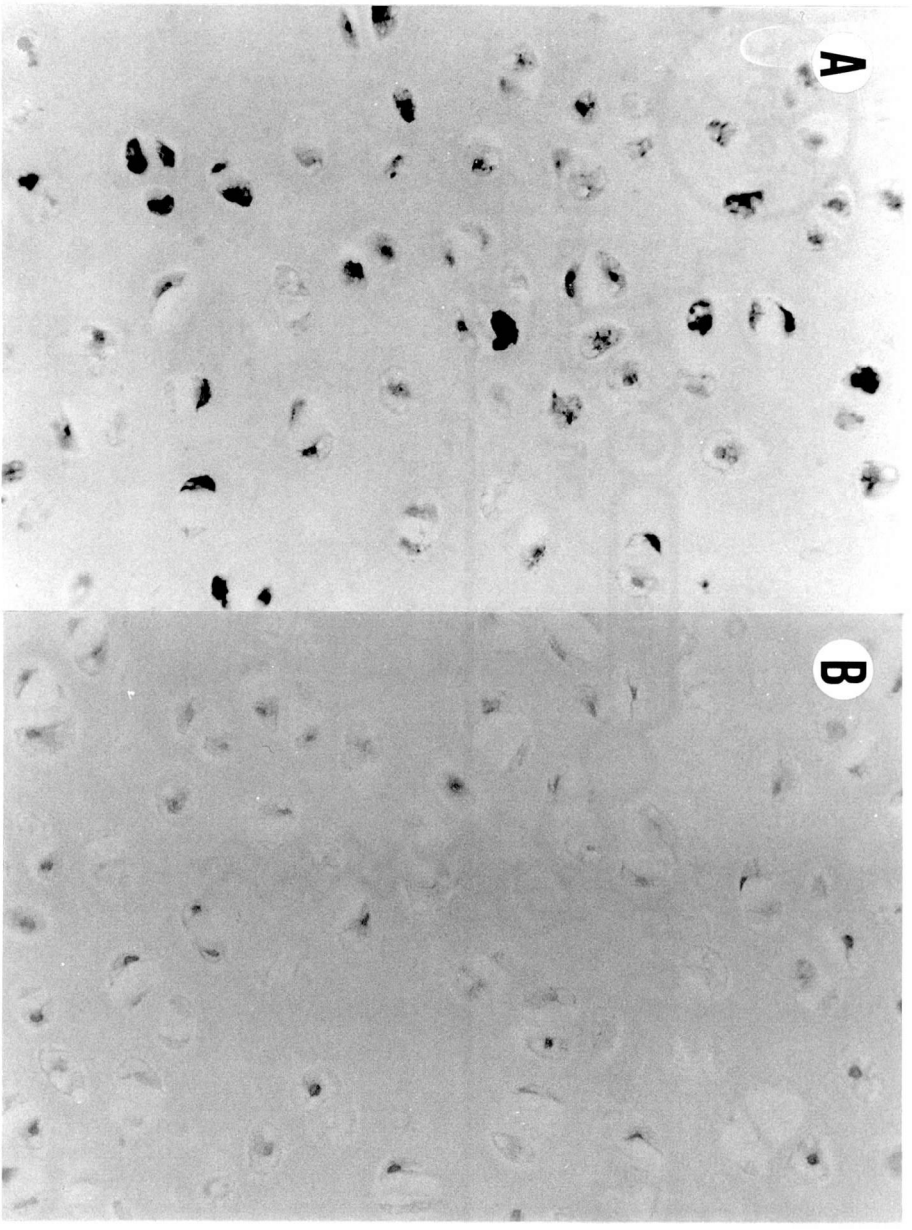
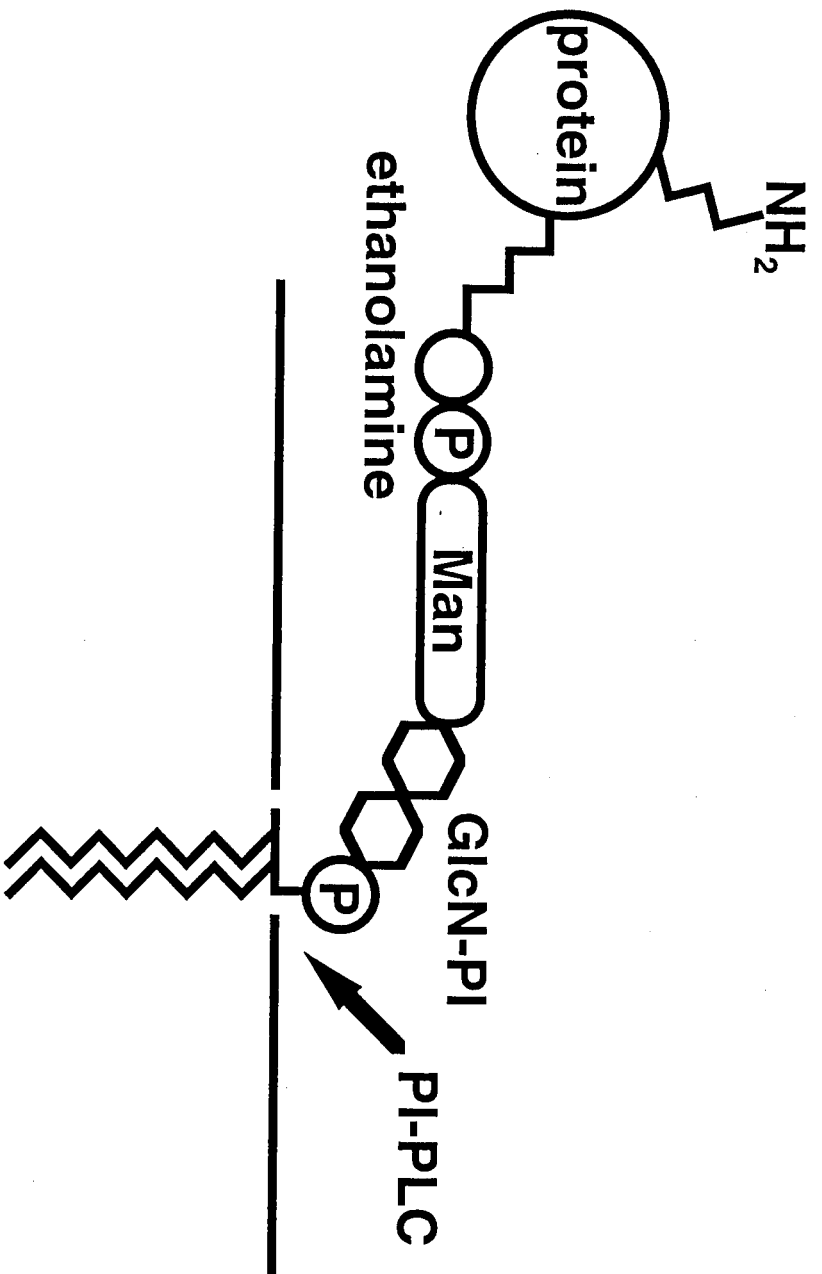


图 4



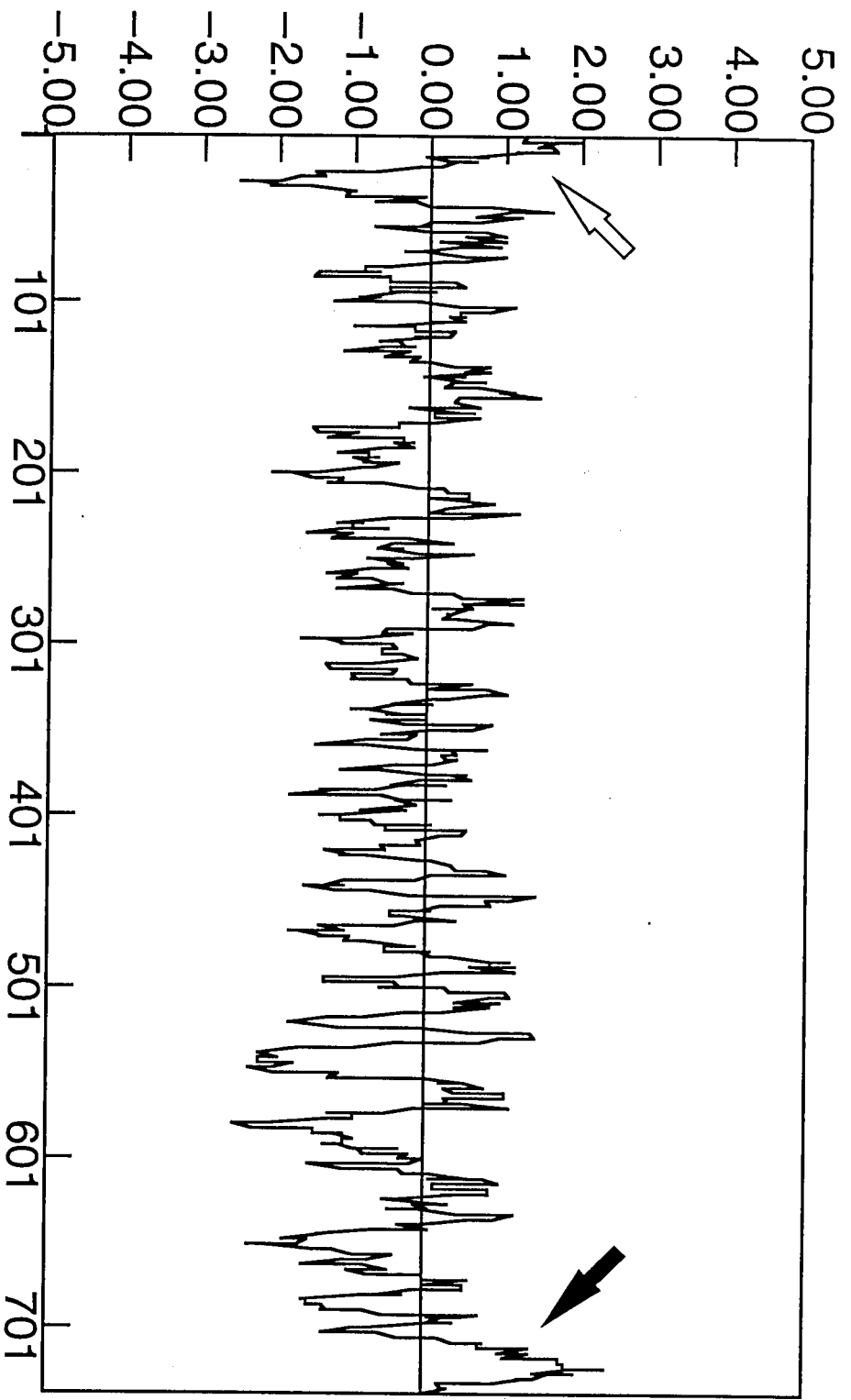


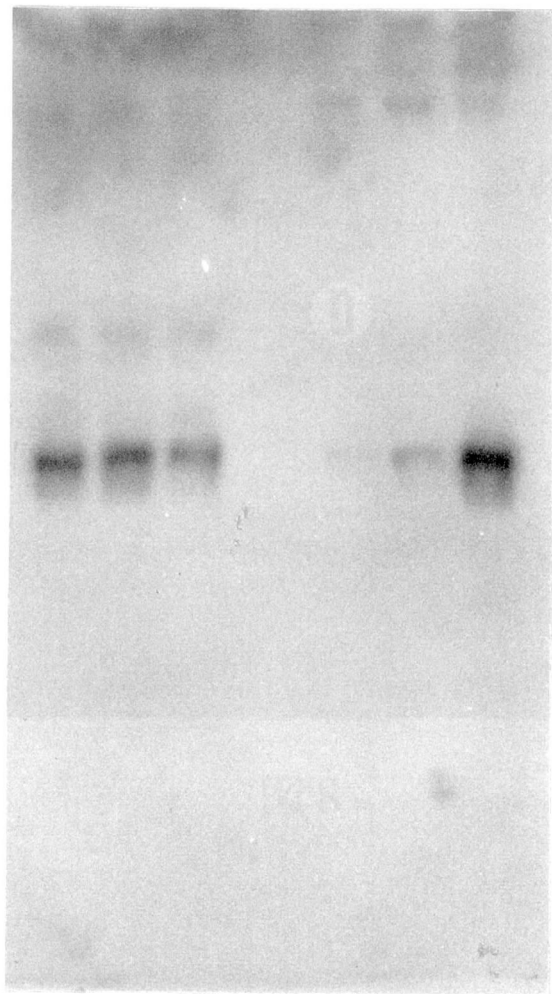
Table: Kyte & Doolittle

Cell layer

Medium

none
vehicle
PI-PLC

none
vehicle
PI-PLC



← 76kDa

図 7

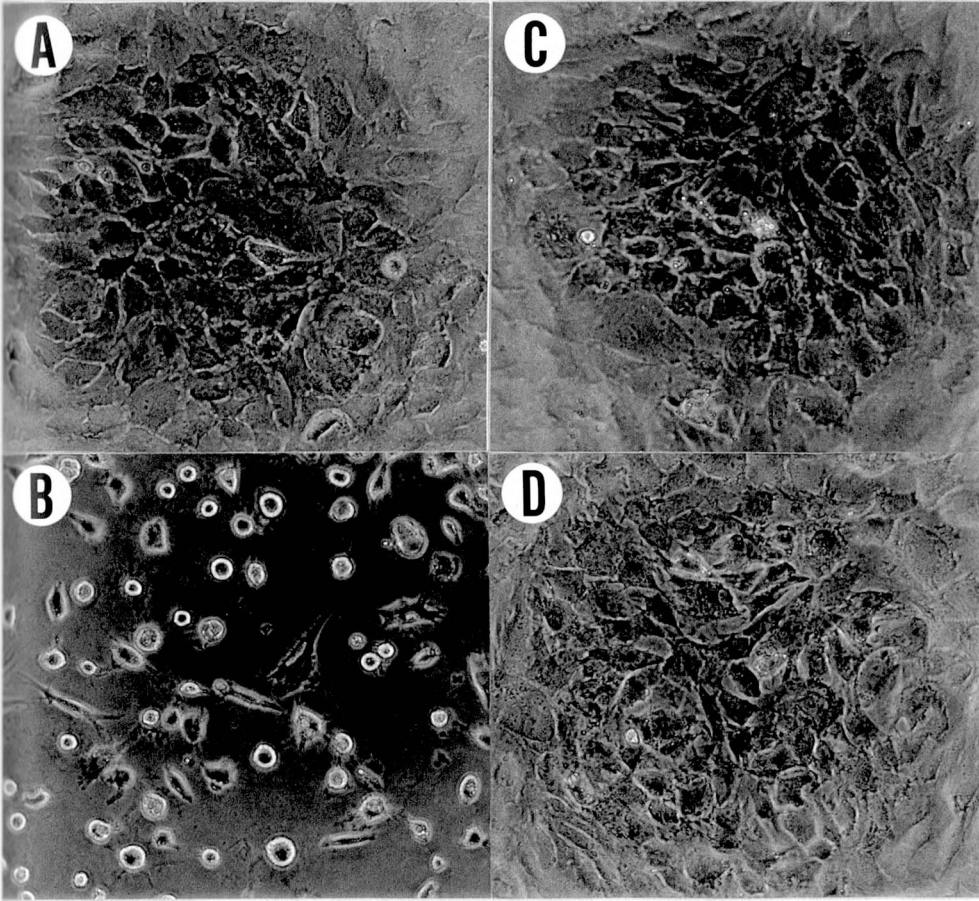


図 8

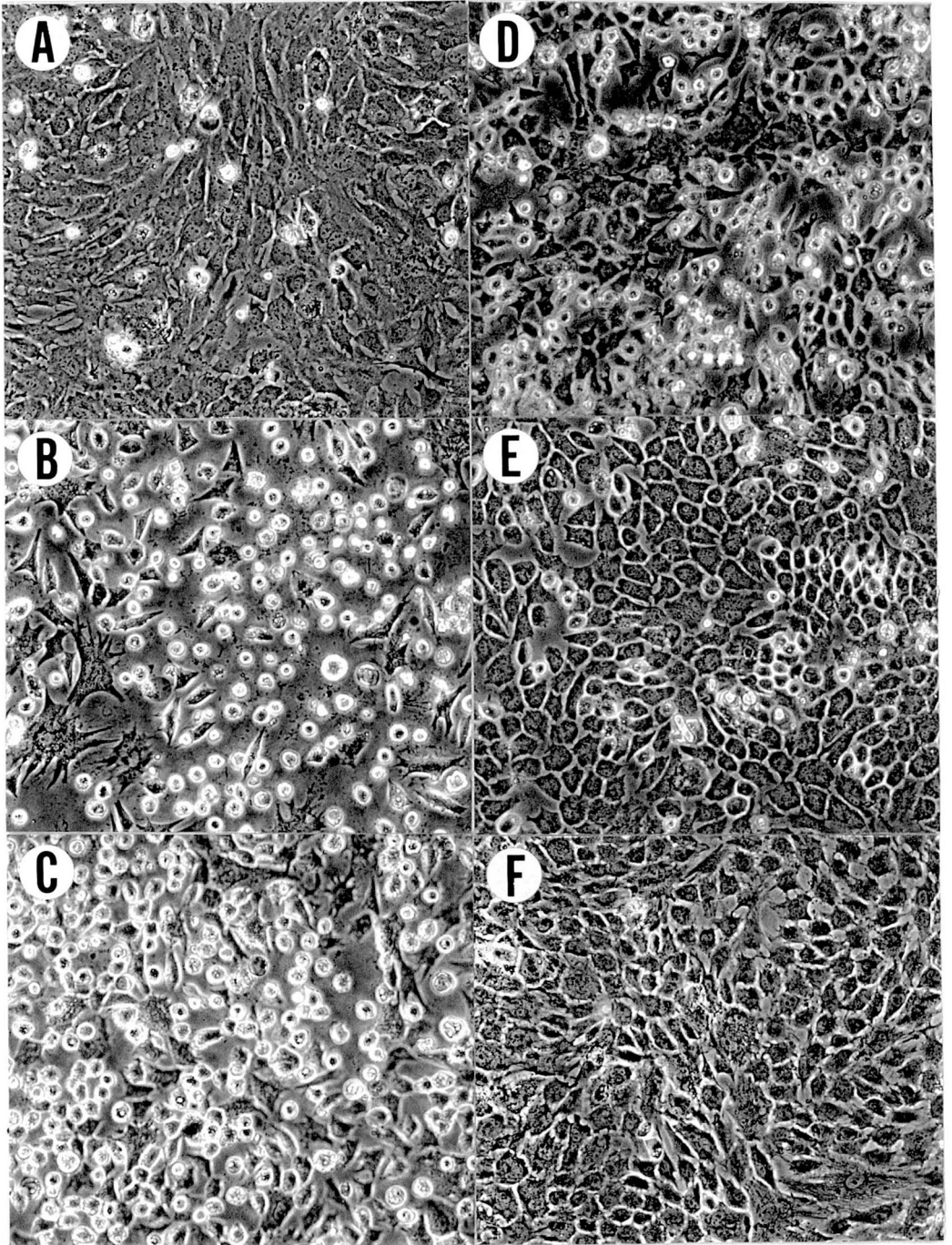
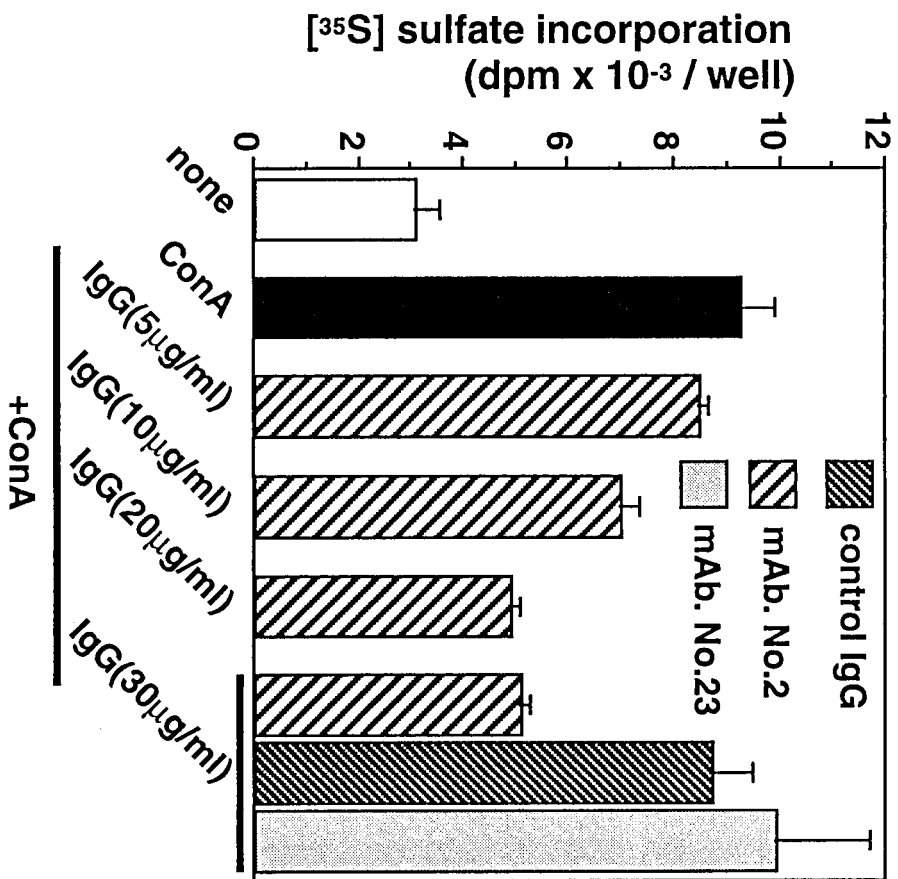
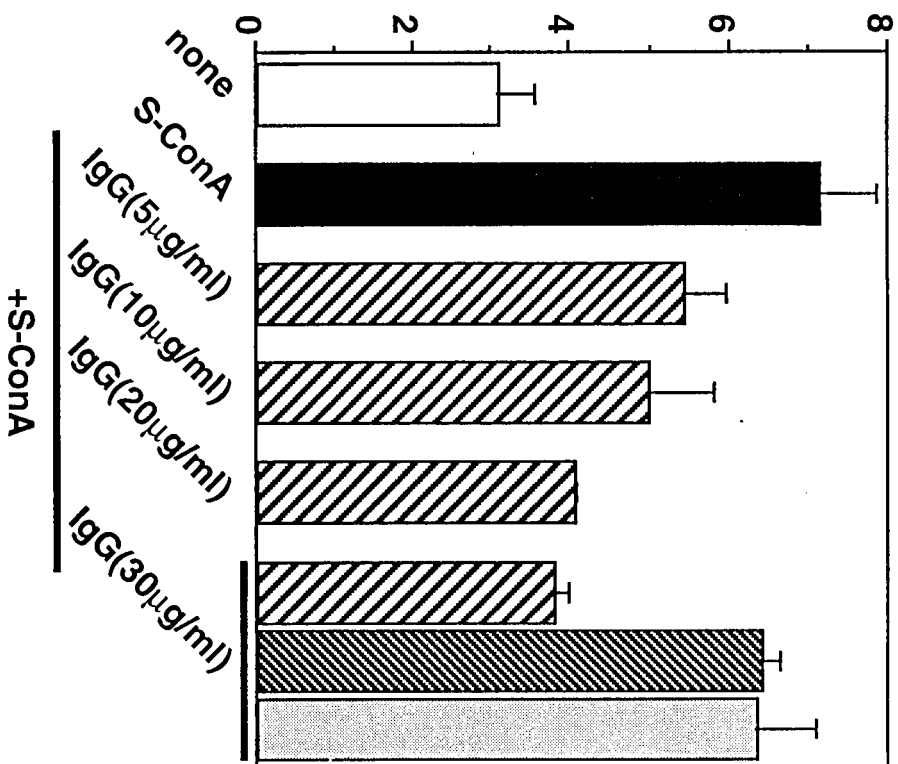


図 9

A**B**

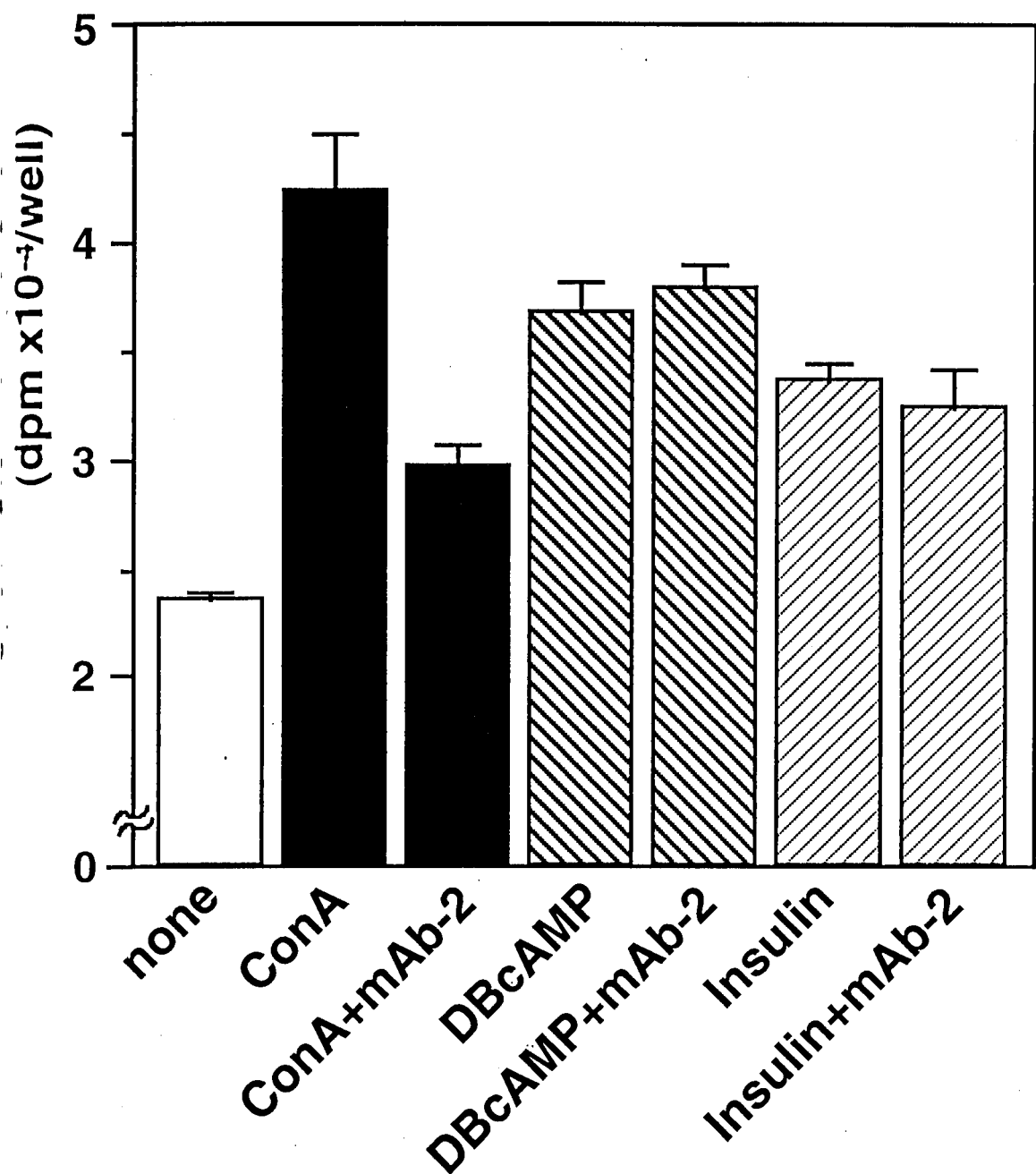
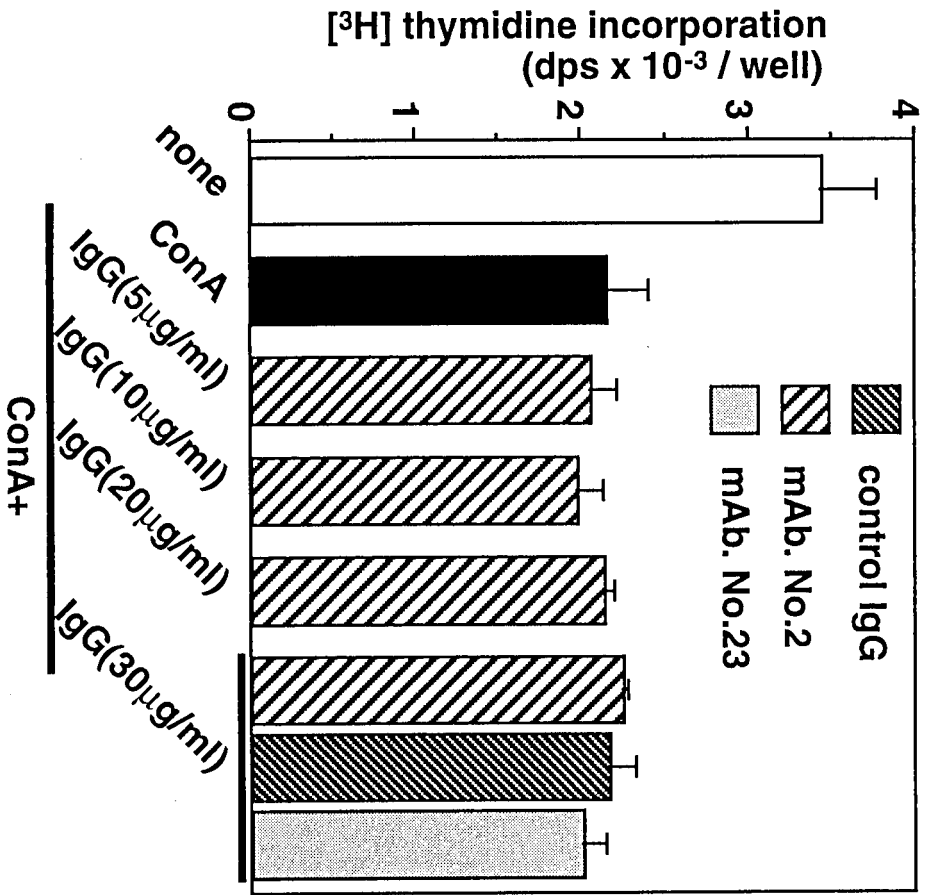
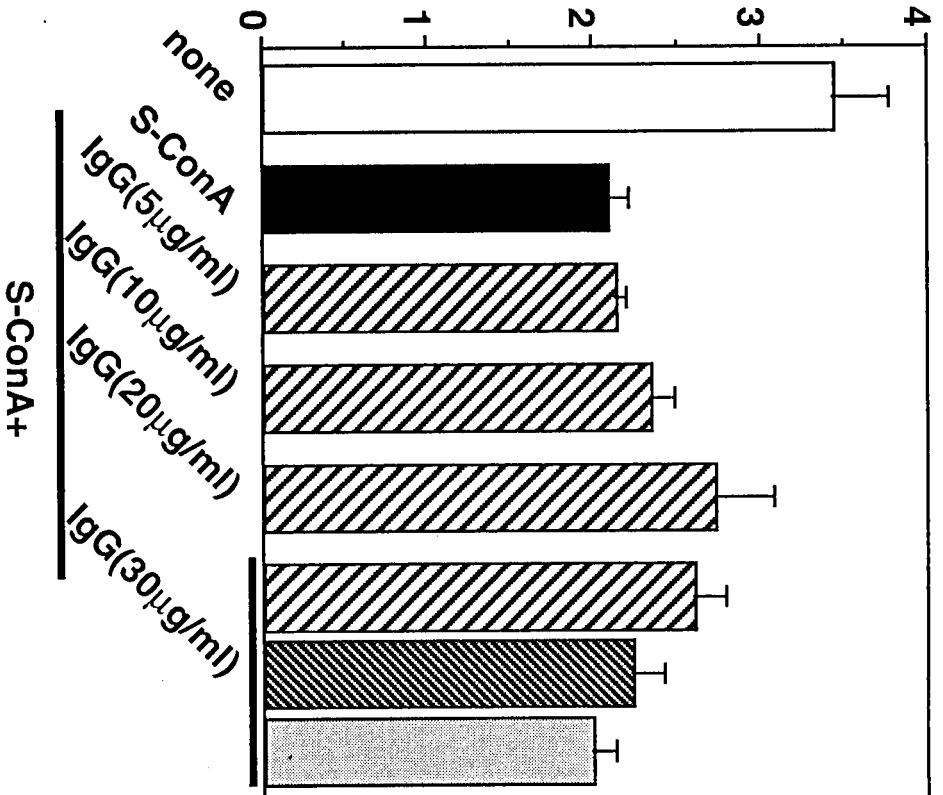


図 1 1

A**B**

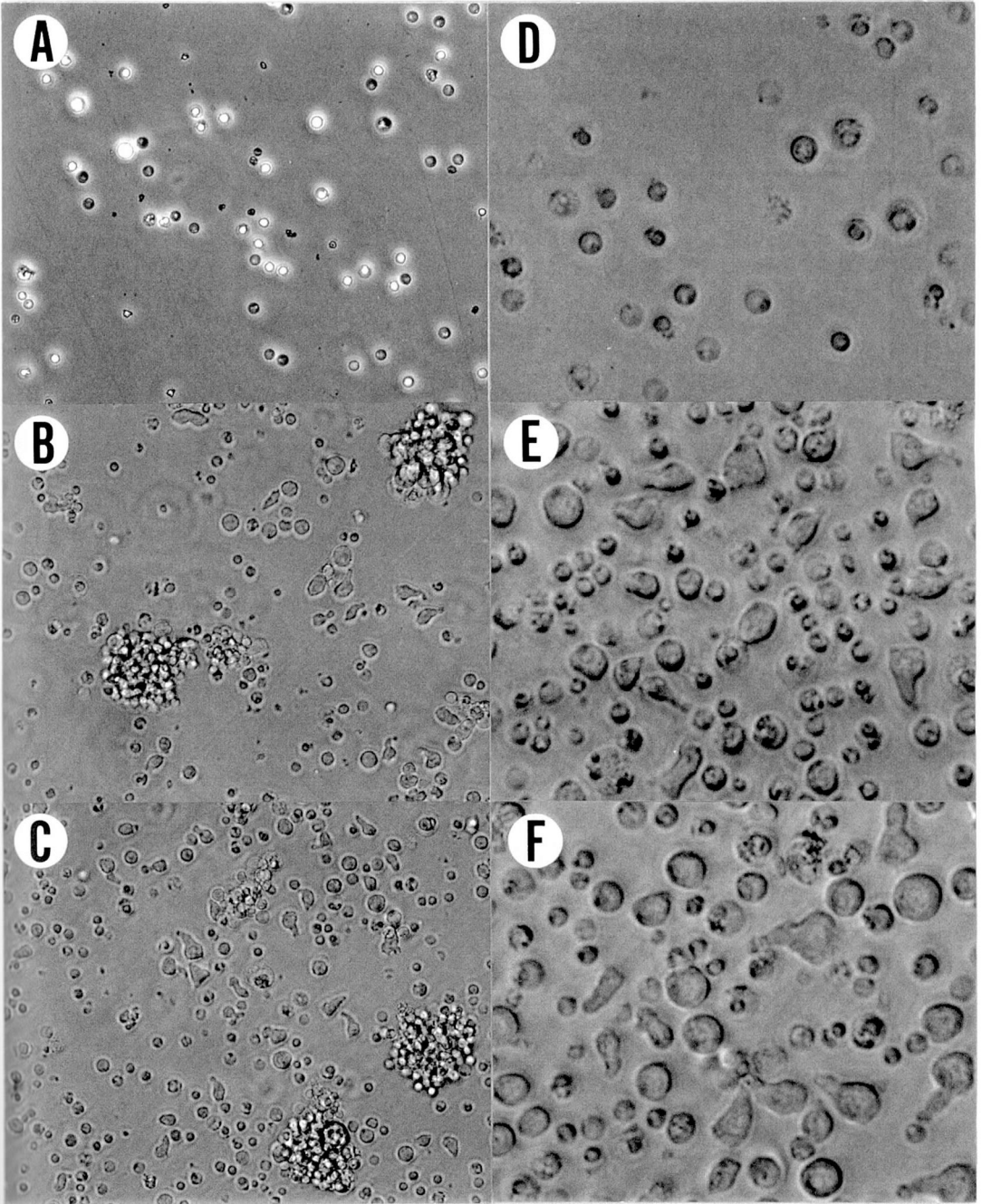
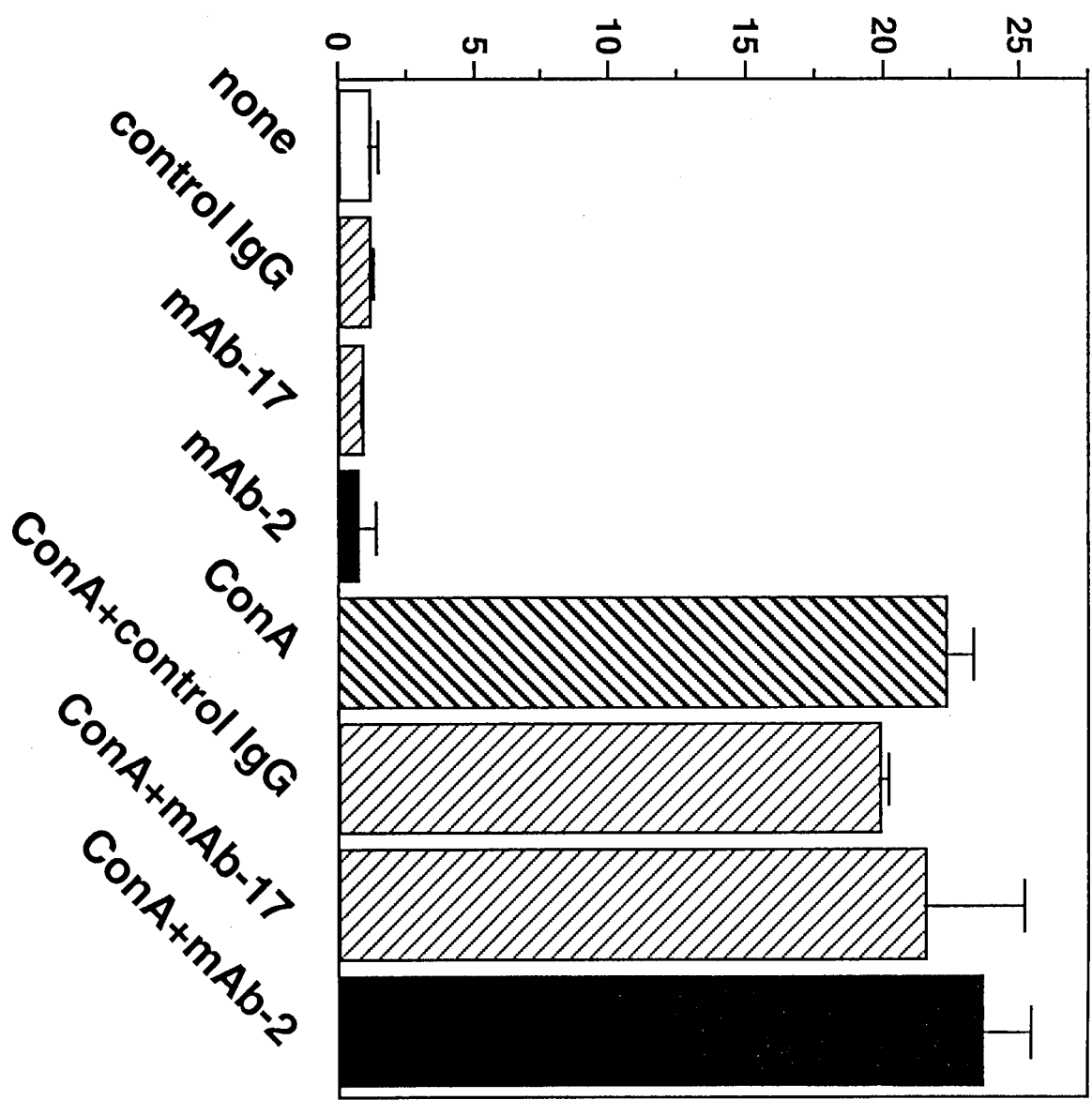


図 1 3

[³H] thymidine incorporation
(dpm x 10⁻³ / well)



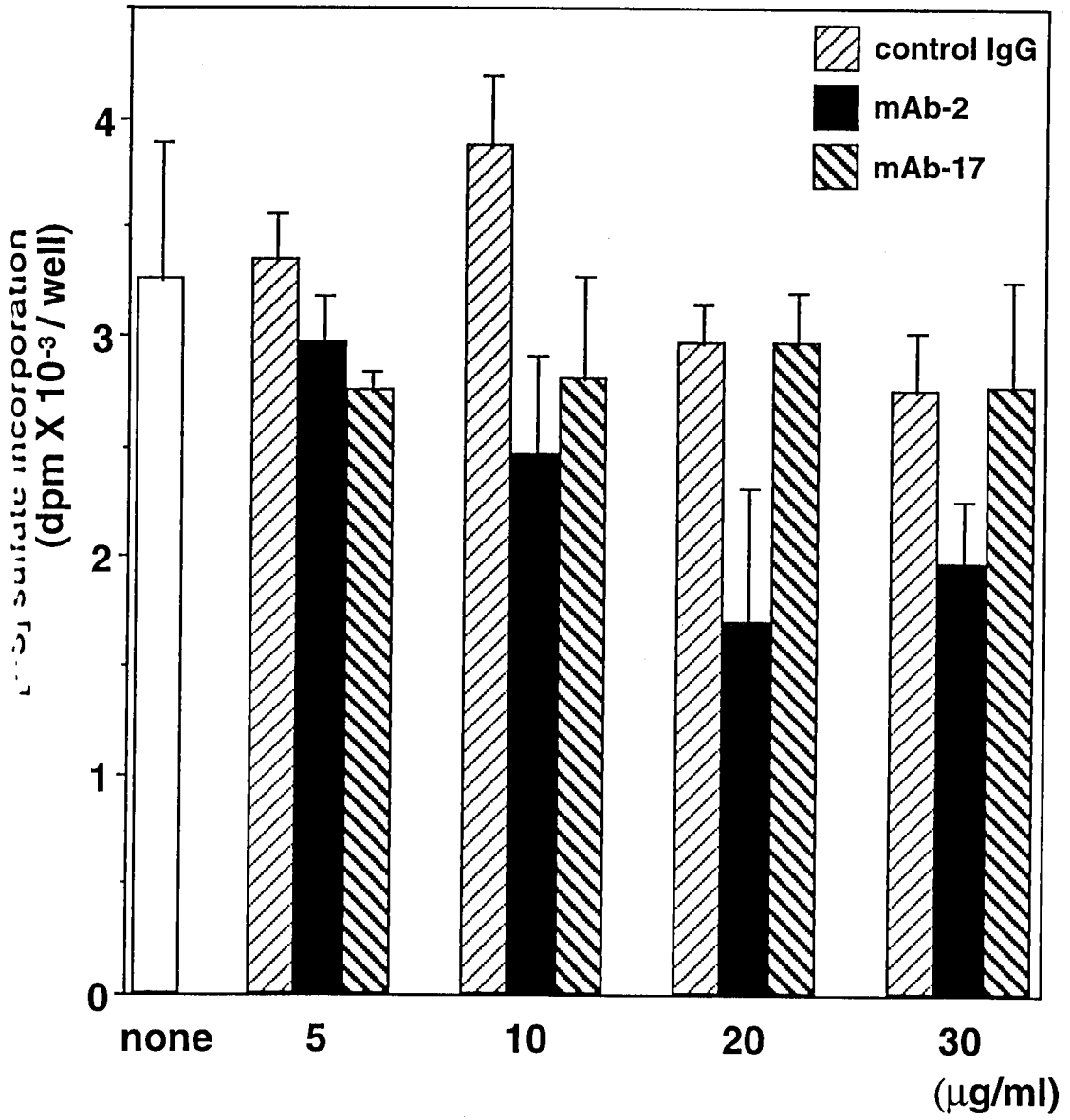


図 1 5

351 sulfate incorporation (dimethyl- 35 S-methionine)

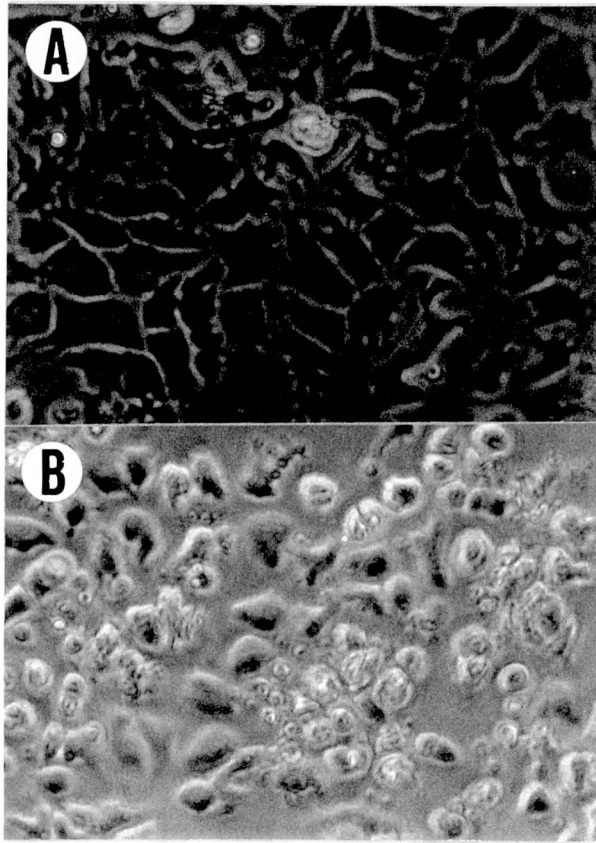


図 16

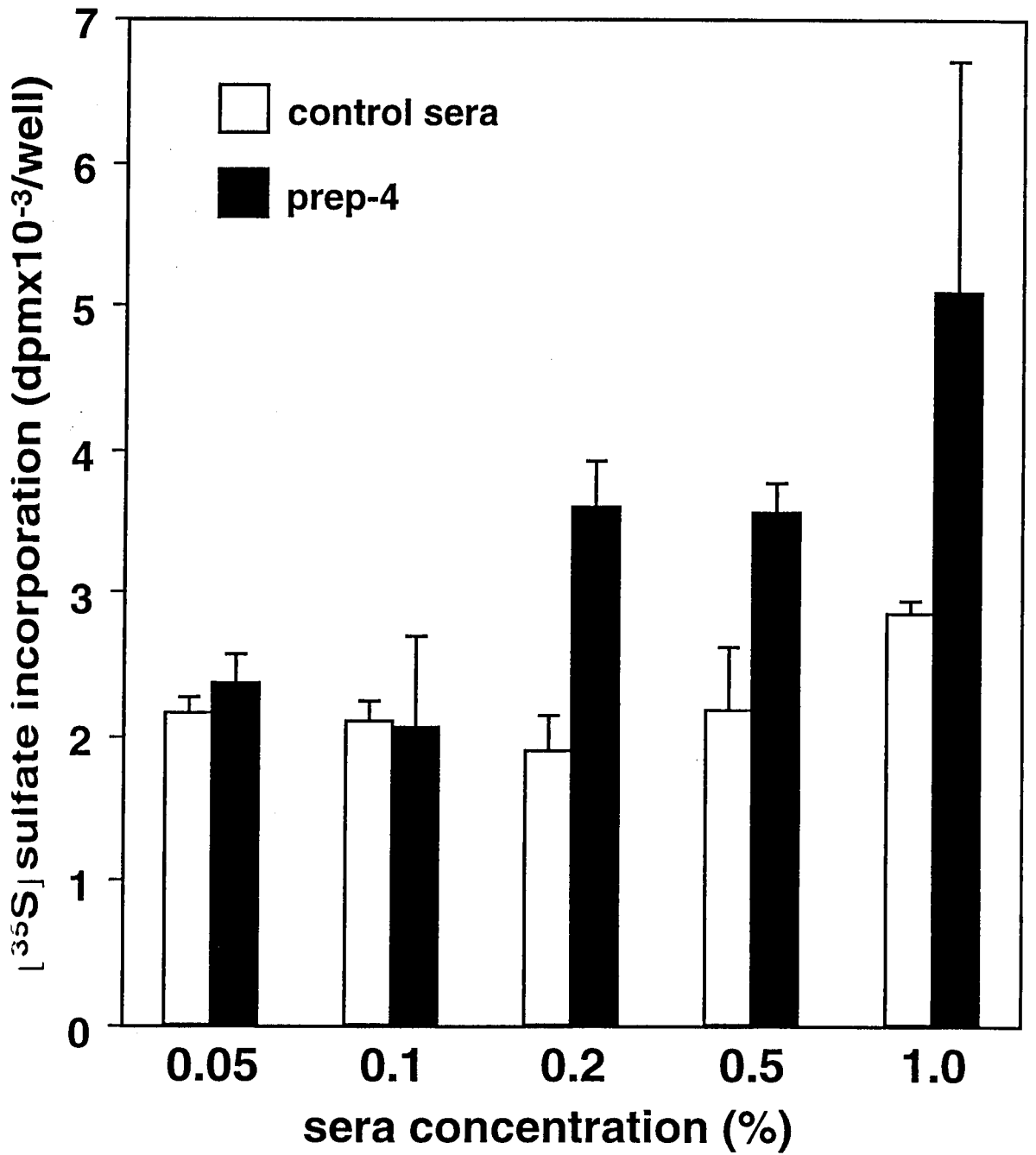


図 17

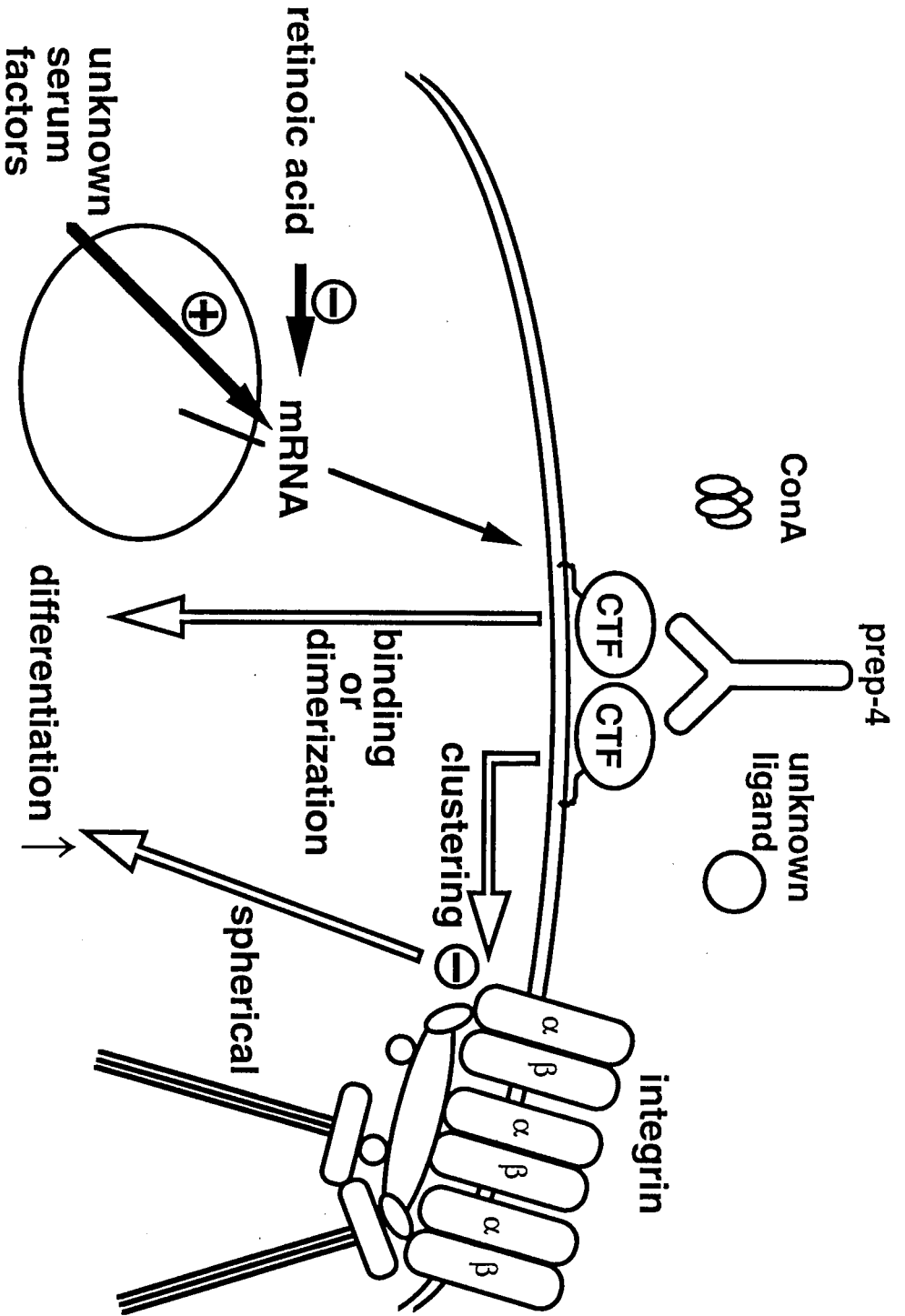


图 1 8

	Inhibition of ConA actions	
antibodies	cell shape	PG
prep-1	≡	+
prep-2	≡	±
prep-3	+	±
prep-4	±	—
mAb-2	≡	≡
mAb-17	—	—

※ PG: proteoglycan

- 1 抗コンドロトランスフェリン抗体のConA作用（細胞球型化およびプロテオグリカン合成促進）に対する影響
 +はConA作用の抑制を示し,-は影響のないことを示す。

	ConA-like actions	
antibodies	cell shape	PG
prep-1	—	—
prep-2	+	N.D.
prep-3	++	N.D.
prep-4	+++	+++
mAb-2	—	N.D.
mAb-17	—	N.D.

※ PG: proteoglycan

抗コンドロトランスフェリン抗体のConA様作用（細胞球形化およびプロテオグリカン合成促進）

+はConA様作用があることを示し、-は影響のないことを示す。またN.D.は測定していないことを示す。

図 1 抗コンドロトランスフェリン抗体の特異性.

(A) 抗原として培養軟骨細胞を用い, 一次抗体として prep-1 (lane 1), prep-2 (lane 2), prep-3 (lane 3), prep-4 (lane 4) をそれぞれ 500 倍希釈で添加してイムノブロットを行った。すべての抗体は 76kDa のコンドロトランスフェリンと特異的に反応した。

(B) 一次抗体として mAb-2 (lane 1), mAb-4 (lane 2), mAb-9 (lane 3), mAb-12 (lane 4), mAb-17 (lane 5), mAb-23 (lane 6) をそれぞれ 3000 倍希釈で添加してイムノブロットを行った。すべての抗体はコンドロトランスフェリンと特異的に反応した。

図 2 組織分布および軟骨組織中の分布.

(A) 軟骨細胞 (lane 1), 線維芽細胞 (lane 2), 骨芽細胞 (lane 3) および脳 (lane 4), 肝臓 (lane 5), 腎臓 (lane 6), 膵臓 (lane 7), 小腸 (lane 8), 精巣 (lane 9) の膜画

分（各 10 μ g 蛋白）を抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体 prep-4 を一次抗体に用いてイムノプロットを行った。

（B）軟骨組織から直接得た成長板軟骨の肥大層（G1）（lane 1）基質形成層（G2）（lane 2），増殖層（G3）（lane 3），静止軟骨（lane 4）および関節軟骨（lane 5）（各 0.5 μ g 蛋白）を抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体 prep-4 を一次抗体に用いてイムノプロットを行った。

図 3 細胞免疫染色.

Chamber Slide 内で培養し，ホルムアルデヒドにて固定した後 10% ヒツジ血清を含む PBS とインキュベートしブロッキングした。さらに，抗コンドロトランスフェリン抗血清あるいはコントロール血清（PBS で 100 倍希釈）とインキュベートした。次いで，FITC ラベル抗マウス-ヒツジ IgG F(ab')₂ 断片（300 倍希釈）とインキュベートして，共焦点レーザー

顕微鏡を用いて観察した。AとCは、位相差顕微鏡像。Bは、コントロール血清を用いたAの免疫染色像。Dは、抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体 prep-4を用いたCの免疫染色像。Eは、Dの高倍率像。

図4 組織免疫染色。

ウサギ肋軟骨より切片を作製し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化し、ヒアルロニダーゼで処理後、0.15%正常ウマ血清とインキュベートすることにより非特異的結合をブロックした。その後、100倍希釈したコントロール血清(A)あるいは抗コンドロトランスフェリン抗体 prep-4(B)とインキュベートし、続いてピオチンラベル抗マウス-ウマIgG(200倍希釈)とインキュベートし、DAB基質を添加して発色させた。

図5 GPIアンカーの基本構造。

GPI アンカーはホスファチジルイノシトールにグリコサミン 1 残基とマンノース 3 残基がグリコシド結合し，マンノースの非還元末端がエタノールアミンとリン酸ジエステル結合し，さらにそのアミンと蛋白のカルボキシル末端がアミド結合する基本構造をとる。また，PI-PLC によって矢印で示すホスファチジルイノシトールのリン酸とジアシルグリセロールの間で特異的に切断される。

図 6 コンドロトランスフェリンの疎水性領域。

アミノ酸配列を Kyte と Doolittle の計算式に基づき分析すると，疎水性の高い領域は白矢印の N 末端と黒矢印の C 末端の領域に存在した。

図 7 PI-PLC 処理によるコンドロトランスフェリンの培養上清中への遊離。

ウサギより単離した静止軟骨細胞をコンフ

ルエント後 4 日間培養した後，無血清の培養液で 24 時間インキュベートし，無添加，PI-PLC を溶解した vehicle (50% glycerol 0.1M NaCl を含む 10mM Tris-HCl pH7.5) あるいは PI-PLC (1.7U/10⁶細胞) 存在下で 2 時間インキュベートし培養上清を回収し，細胞層は PBS で洗浄後 Laemmli 緩衝液を用いて回収した。回収した培養上清および細胞層は，500 倍希釈した prep-4 を用いてイムノプロットに供した。

図 8 軟骨細胞の形態に対する prep-1 の影響。

静止軟骨細胞をコンフルエントまで培養後，1%コントロール血清 (A) あるいは 1% prep-1 (B) を添加した。そして，30 分後に ConA (5 μ g/ml) を添加して 24 時間インキュベートした。

図 9 軟骨細胞の形態に対する mAb-2 の影響。

静止軟骨細胞をコンフルエントまで培養後，

ConA (5 μ g/ml) を添加 (B) あるいは添加しなかった (A)。コントロール IgG (20 μ g/ml) (C) あるいは 5 μ g/ml (D), 10 μ g/ml (E), 20 μ g/ml (F) の mAb-2 を添加した。そして、さらに 24 時間インキュベートした。

図 1 0 軟骨細胞のプロテオグリカン合成に対する mAb-2 の影響。

継代した静止軟骨細胞を 90%コンフルエントまで培養後、100 μ l の 0.5%のウシ胎児血清を含む F-12/DMEM(1:1) 中で 24 時間インキュベートした。そして、mAb-2 (5-30 μ g/ml), コントロール IgG (30 μ g/ml) あるいは mAb-17(30 μ g/ml) 添加の 30 分後に ConA(5 μ g/ml) (A) あるいは S-ConA (10 μ g/ml) (B) を添加してさらに 24 時間インキュベートした。

[³⁵S] 硫酸 (0.5 μ Ci/ml) は培養停止の 6 時間前に添加した。

図 1 1 ConA, DBcAMP およびインスリンの

プロテオグリカン合成促進に対する mAb-2 の影響.

mAb-2 (20 μ g/ml) の添加 30 分後に ConA (5 μ g/ml), DBcAMP (1mM) あるいはインスリン (1 μ g/ml) を添加した。これ以外は図 10 と同じ条件で実験を行った。

図 1 2 DNA 合成に対する mAb-2 の影響.

継代した静止軟骨細胞を 90%コンフルエントまで培養後, 培養液を 100 μ l の 0.5%のウシ胎児血清を含む medium A 中で 24 時間インキュベートした。そして, mAb-2 (5~30 μ g/ml), コントロール IgG (30 μ g/ml) あるいは mAb-17 (30 μ g/ml) を添加した。ConA (5 μ g/ml) (A) あるいは S-ConA (10 μ g/ml) (B) は, その 30 分後に添加した。 [3 H] thymidine は培養停止の 3 時間前に 10 μ Ci/ml の濃度で添加して, ConA, S-ConA 添加の 24 時間後まで培養した。

図 1 3 ConA によるリンパ球凝集および幼若化に対する mAb-2 の影響.

4 週齢の日本白色家兎の胸腺リンパ球を medium A に 3×10^6 細胞/ml となるよう懸濁し、懸濁液 0.2ml を 24 穴プレート播種した。それと同時に mAb-2 (20 μ g/ml) を添加し、ConA (3 μ g/ml) はその 30 分後に添加した。そして、66 時間後位相差顕微鏡にて観察した。A ~ C の拡大をそれぞれ D ~ F に示す。

A, D は無添加, B, E は ConA 添加, C, F は mAb-2 添加後に ConA 添加したリンパ球を表す。

図 1 4 リンパ球の DNA 合成促進に対する ConA と mAb-2 の影響.

4 週齢の日本白色家兎の胸腺リンパ球を medium A に 3×10^6 細胞/ml となるよう懸濁し、懸濁液 0.2ml を 24 穴プレート播種した。それと同時に mAb-2, mAb-17 あるいはコントロール IgG (20 μ g/ml) を添加し、ConA (3 μ g/ml)

はその 30 分後に添加した。66 時間後に [^3H] thymidine (3 $\mu\text{Ci/ml}$) を添加し, さらに培養を 6 時間続けた。

図 1 5 プロテオグリカン合成に対する mAb-2 単独の影響。

コンフルエントの静止軟骨細胞培養系に, ヒアルロン酸のみを特異的に分解するヒアルロニダーゼとともにコントロール IgG, mAb-2 あるいは mAb-17 (5~30 $\mu\text{g/ml}$) を添加して 4 日間培養した。 [^{35}S] 硫酸 (0.5 $\mu\text{Ci/ml}$) は培養停止の 6 時間前に添加した。

図 1 6 軟骨細胞の形態に及ぼす抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体 prep-4 の影響。

静止軟骨細胞をコンフルエントまで培養後, 1%コントロール血清 (A) あるいは 1% prep-4 (B) を添加して, 24 時間インキュベートした。

図 1 7 軟骨細胞のプロテオグリカン合成に及ぼす抗コンドロトランスフェリンポリクローナル抗体 prep-4 の影響.

継代した静止軟骨細胞を 90%コンフルエントまで培養後, 100 μ l の 0.5%のウシ胎児血清を含む F-12/DMEM(1:1) 中で 24 時間インキュベートした。そして, コントロール血清あるいは prep-4 を共に 1%の濃度で添加した。

[³⁵S] 硫酸 (0.5 μ Ci/ml) は培養停止の 6 時間前に添加して, 抗体添加の 24 時間後までインキュベートした。

図 1 8 軟骨細胞の分化調節におけるコンドロトランスフェリンの役割.