

## ニワトリ胚前軟骨細胞の増殖と分化の調節機構\*

大宅 芳枝\*\*

広島大学生物圏科学研究科

### Regulatory Mechanisms of Cellular Proliferation and Differentiation in Chondrogenic Cells of the Chick Embryo

Yoshie OHYA

Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University  
Hiroshima 730, Japan

#### 要 旨

脊椎動物の体の基本構造は未分化間充織からの軟骨形成に基づいて決定される。従って、未分化前軟骨細胞の、増殖と軟骨分化の調節メカニズムの研究が、発生における形態形成を理解するために必須である。このためには、軟骨細胞に分化する能力を持つ未分化な前軟骨細胞を多く集め、細胞培養条件下に安定に扱うこと、および実験条件下でこれの軟骨分化を調節できることがもっとも理想的である。しかしながら、このような細胞培養系は現在までに確立されていなかった。本研究では、まずこれを確立し、ついでこれを用いて未分化前軟骨細胞の増殖および軟骨分化に果たす塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)およびトランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- $\beta$ )の調節機構を明らかにし、あわせて未分化前軟骨細胞自身が自らの増殖と分化を調節する因子を分泌していることを明らかにした。

強膜繊維芽細胞は、胚体内では強膜軟骨細胞層を取り巻く結合組織を構成している。単層培養されると繊維芽細胞の形態を示して安定に増殖し、全く軟骨の形質を発現することはない。この細胞を、直接あるいは単層培養の後に、血清濃度10%、培養皿あたり $2 \times 10^3$ 細胞の条件で軟寒天培養すると、クローン増殖した細胞が互いに接着しあって凝集した形態をとるコロニーと、球形の細胞が分散した形態をとるコロニーの2種類のコロニーが得られた。軟骨細胞の分化指標であるアルシアンブルーおよび軟骨プロテオグリカンであるPG-Hの抗体を用いてこれらのコロニーを染色すると、分散型のコロニーのみが陽性に染色され、分散型コロニーは軟骨に分化したコロニーであり、凝集型コロニーは分化していない繊維芽細胞のコロニーであることがわかった。以下、前者をC型(軟骨型)コロニー、後者をF型(繊維芽細胞型)コロニーと呼ぶこととした。なお、10%血清条件下の初代軟寒天培養で強膜繊維芽細胞からできるコロニーは、60%以上がC型コロニーであった。

---

広島大学総合科学部紀要Ⅳ理系編、第19巻(1993)

\* 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1993年2月12日、学位取得日 1993年3月25日

\*\* 現在の所属: 〒734 広島市南区霞1-2-3 広島大学歯学部口腔生化学教室

すなわち、①強膜繊維芽細胞は、少なくともそのポピュレーションの半分以上が軟骨に分化する能力を備えた未分化状態にある前軟骨細胞であること、②未分化状態を維持したまま単層培養下に安定に増殖することができること、③軟寒天内で培養されることにより軟骨細胞へと分化すること、が判った。この実験系を用いることによって、前軟骨細胞の増殖及び分化の調節機構についての新しい実験研究が可能となった。

まず、軟寒天培養液の血清濃度を可能な限り減らして血清の影響を取り除いた上で、既知の増殖因子が強膜繊維芽細胞の増殖及び軟骨分化をどのように調節するか調べた。

血清濃度2%、培養皿あたり $2 \times 10^3$ 細胞の条件で強膜繊維芽細胞を軟寒天にまきこみ、bFGF、TGF- $\beta$ 、血小板由来増殖因子(PDGF)、インシュリンを、それぞれ培養液に加えたところ、bFGFのみが顕著な細胞増殖促進活性を示してコロニー形成を促進し、さらにこのbFGFの働きによって増殖してできるコロニーはすべてF型コロニーであった。このbFGFのF型コロニーを形成させる作用、すなわちC型コロニーの形成を抑えつつ細胞を増殖させる作用はきわめて強く、血清濃度10%の、血清中の軟骨分化因子が強く働く条件でも、できてくるコロニーのほとんどをF型コロニーにさせる働きがあった。なお、TGF- $\beta$ は、強膜繊維芽細胞に対してコロニー形成促進活性はなかったが、bFGFと同時に加えるとコロニー形成を抑制することがわかった。

次に、未分化前軟骨細胞ではなく、すでに軟骨分化を終えた軟骨細胞である強膜軟骨細胞について、これらの働きを調べた。血清濃度10%、培養皿あたり $2 \times 10^3$ 細胞の条件下で軟寒天培養すると、強膜軟骨細胞からはC型コロニーのみが形成され、さらに培養を続けると細胞が肥大化した。一方、血清濃度2%、培養皿あたり $2 \times 10^3$ 細胞の条件でこの細胞をbFGFと共に培養すると、前軟骨細胞の場合と同様にコロニー形成を著しく促進した。なお、形成されたコロニーはすべて軟骨の分化形質を発現し、決して脱分化が起こることはなかったが、軟骨細胞の肥大化が抑制されていた。TGF- $\beta$ は、強膜軟骨細胞においても単独ではコロニー形成促進活性を示さないが、bFGFと同時に加えると強膜繊維芽細胞とは逆に、bFGFの増殖促進効果を相乗的に強めることがわかった。

強膜繊維芽細胞は、単層培養条件下では、自ら増殖因子を分泌しオートクライン的に増殖することができる。そこで、軟寒天培養下でも、2%の血清条件下で細胞まきこみ数を通常の10倍の、培養皿あたり $2 \times 10^4$ 細胞として培養したところ、コロニー形成率は5倍以上に上昇することが判った。また、この時のコロニーのほとんどはF型であった。このことから、この細胞が軟寒天中でもなんらかの細胞増殖因子をオートクライン的に分泌していること、及びその働きはbFGFに似て軟骨分化には阻害的である可能性が考えられた。そこで、無蛋白単層培養条件下で強膜繊維芽細胞を培養し、この培養上清を、血清濃度2%、培養皿あたり $2 \times 10^3$ 細胞の条件で、強膜繊維芽細胞の軟寒天培養に加えたところ、細胞まきこみ数を上げた場合と同様の効果が得られ、この時も得られたコロニーのほとんどがF型であった。そこで、この培養上清を濃縮し、DEAE-5PW HPLCによって分画した溶液を軟寒天中に加えてコロニー形成促進活性を検定したところ、第15画分溶液のみに顕著な活性がみられた。この場合、できるコロニーの80%以上がF型であり、働きはやはりbFGFと類似していた。なお、この因子はbFGFと異なり強膜軟骨細胞に対してはコロニー形成促進活性を持たず、また単層培養下の実験でも、bFGFとは作用が異なっていた。

以上の結果を総括すると以下ようになる。

1) 単層培養下では安定な未分化状態の前軟骨細胞である強膜繊維芽細胞は、軟寒天培養下で血清の影響のもとに軟骨に分化する。この軟寒天培養系では血清濃度を2%という低濃度まで下げることができたので、外部から添加した因子の前軟骨細胞の増殖と軟骨分化に対する影響を調べることが可能となった。

2) bFGFは、未分化前軟骨細胞である強膜繊維芽細胞および分化軟骨細胞である強膜軟骨細胞の、いずれに対しても細胞の分化状態を変化させることなくその増殖を強く促進することが示された。このbFGFの増殖促進効果に対して、TGF- $\beta$ は、未分化前軟骨細胞には増殖抑制的に、分化軟骨細胞では増殖促進的に働いた。bFGFおよびTGF- $\beta$ は胚の形態形成途上の軟骨組織に発現していることが判っている。従って、以上の結果は、胚の中でbFGFとTGF- $\beta$ が同時に働けば、分化段階の異なった同一細胞種の細胞である前軟骨細胞と軟骨細胞で、巧妙に異なった増殖調節が行なわれうることをはじめて示したことになる。

3) 強膜繊維芽細胞自身が分泌するオートクライン増殖因子のうち、DEAE-5PW HPLCにより分離された第15画分は、bFGFの働きと類似して、未分化前軟骨細胞に対してその分化状態を変えることなく増殖を促進した。実際に前軟骨細胞から軟骨細胞への分化の進行に関わると考えられる因子を、未分化前軟骨細胞自身の培養系から直接分離できた例はこれまでになく、この第15画分は実際に胚体内で働いている因子であることが期待された。