

## B30

Type I collagen matrix により骨芽細胞へ分化を誘導された骨髄細胞での遺伝子発現

○水野守道, 藤沢隆一, 久保木芳徳  
(北大, 歯, 生化学)

【目的】我々はこれまでに Type I collagen matrix が骨髄細胞の骨芽細胞への分化を誘導することを見出した。本研究では分化した細胞がどのような遺伝子を発現しているかを Northern blotting 法にて解析した。また Type I collagen は細胞膜に存在する  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンと結合し種々生理機能を発揮することが報告されているので, collagen と  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンの結合が骨芽細胞の分化誘導にどのような影響を与えるかも検討した。

【方法】骨髄細胞は4週令ラット大腿骨より採取し, 接着性細胞を増殖させ実験に用いた。骨芽細胞の形質として Alkaline phosphatase (ALP) 活性を比色定量法にて, collagen 合成能を 3H-proline 取り込み後の specific collagenase digestion assay 法にて測定した。

本研究で分析した遺伝子は BSP (Bone sialoprotein), OCN (Osteocalcin), OPN (Osteopontin), CA (Chondro-adherin), ALP (Alkaline phosphatase), Cbfa1 である。Probe の作製はまず, RT-PCR を行った後, PCR 産物を Plasmid vector に挿入し, そして大腸菌へ導入した。大腸菌を増殖させた後 Plasmid を精製し, これを鋳型として RNA probe を作製した。この probe を用いて Northern blotting を行った。

【結果】骨髄細胞を collagen と密着させ培養すると, Alkaline phosphatase (ALP) 活性, collagen 合成能が上昇し, さらに石灰化結節を形成した。この段階の細胞を採取し, 遺伝子発現を調べたところ, BSP, OCN, OPN, CA, ALP, Cbfa 1 遺伝子いずれの発現も認められた。

なお OPN は石灰化以前の段階から発現が認められた。一方, Collagen と  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンの結合を抑制したところ, ALP 活性, collagen 合成能は低下した。

【結論】以上の結果は Type I collagen matrix 上の細胞は骨芽細胞で特異的に発現されている遺伝子の多くを発現し, さらに collagen による分化誘導には collagen と細胞膜上の  $\alpha 2 \beta 1$  インテグリンの結合が関わっていることが明らかとなった。

Gene expressions of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix

Morimichi Mizuno, Ryuichi Fujisawa, Yoshinori Kuboki  
Dept. of Biochem., Hokkaido Univ., Sch. of Dent.

## B31

ヒト関節軟骨 Chondron における Type VI Collagen の分布及びその合成に対する TGF $\beta$ 、IL-1 $\beta$  の影響について

堀川 治、山田治基\*、中島秀人、菊地寿幸、市村正一、富士川恭輔、戸山芳昭\*\* ( 防衛医大・整形、保健衛生大・整形\*、慶大・整形\*\*)

【目的】ヒト関節軟骨 chondron の pericellular microenvironment (PCME) には type VI collagen が特異的に存在する。今回、変形性関節症 (OA) の病態進行に伴う PCME の変化を観察すると共に type VI collagen の合成に対する TGF $\beta$ 、IL-1 $\beta$  の影響について検討した。

【方法】ヒト正常関節軟骨3例、ヒト OA 関節軟骨16例を対象とし、これらを Mankin's score により組織学的に正常群 (N群)、軽度変性群 (S群)、中等度変性群 (M群) の3群に分類した。homogenization 法で chondron を抽出し、type VI collagen 抗体、CellTracker Green の二重染色を施行、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による PCME 及び chondrocyte の体積の算出を行い、3群間で比較した。また agarose gel による培養ヒト chondrocyte に TGF $\beta$  (T群) 及び IL-1 $\beta$  (I群) を添加し、それぞれの type VI collagen 合成に対する影響を CLSM を用いて検討した。

【結果と考察】chondron における PCME/chondrocyte の体積比は、軟骨変性の進行に伴い有意に増加していた。添加実験では、何も添加しない無添加群に比べ、T群では type VI collagen 合成が促進され、I群では合成は抑制傾向にあった。一般に OA 進行に伴い、growth factor や cytokine の発現は共に増加すると言われているが、今回の結果から、chondron では産生された type VI collagen が PCME に蓄積され、変性の進行に伴い type VI collagen の分布範囲が拡大することに関しては、IL-1 $\beta$  よりも TGF $\beta$  の影響を強く受けていることが示唆された。

Distribution of the type VI collagen in chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and the effect of TGF $\beta$  and IL-1 $\beta$

Dept. of Orthop. Surg., National Defense Medical College.  
Dept. of Orthop. Surg., Fujita Health Univ.\*

Dept. of Orthop. Surg., Keio Univ. School of Medicine\*\*  
Horikawa.O, Nakajima.H, Yamada.H\*, Kikuchi.T,  
Ichimura.S, Fujikawa.K, Toyama.Y\*\*