

D-5 結合組織成長因子 CTGF/Hcs24 の軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 での発現と動態制御

久保田聡、江口傑徳、志茂剛、服部高子、近藤誠二、中西徹、滝川正春（岡山大学・歯学部・口腔生化学）

【目的】結合組織成長因子 CTGF/Hcs24 は、生理的条件下では肥大軟骨細胞層特異的に、またヒト軟骨肉腫由来の軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 では構成的に強く発現している。本研究では軟骨細胞における CTGF/Hcs24 の動態を探る目的で、HCS-2/8 細胞における遺伝子発現から細胞外への分泌にいたるまでの各段階で、CTGF/Hcs24 遺伝子、及びその産物の動きを追跡した。

【方法】CTGF/Hcs24 遺伝子プロモータ活性分析、および転写後調節を行うとされる 3' 非翻訳領域(3' -UTR)の機能解析には、蛍光リポソーム遺伝子をレポータとした DNA トランスフェクション法による一過性発現系を応用した。mRNA の解析には 3' -UTR 部分を増幅する半定量的 RT-PCR 法を、また合成された CTGF/Hcs24 タンパク質の追跡には、放射性ラベル免疫沈降法による pulse-chase 分析を主として適用した。免疫沈降法には、全長 CTGF/Hcs24 および、その C 末端付近の合成ペプチドに対する抗血清二つを用いて多面的解析を行った。またタンパク質の定量解析は ELISA 法を用いて行った。

【結果】ルシフェラーゼ活性評価による CTGF/Hcs24 プロモータの HCS-2/8 細胞内における転写活性は HeLa 細胞などと比較しても非常に高く、RT-PCR による mRNA 量評価の結果と一致していた。また 3' -UTR はここでも遺伝子発現に抑制的に働いており、この点は他の細胞と変わらない。細胞側に保持された CTGF/Hcs24 タンパク質の ELISA 法による定量でも、他の細胞に比較して大量の CTGF/Hcs24 の存在が確認された。さらに免疫沈降法により、標識された CTGF/Hcs24 タンパク質の経時追跡を行った結果、合成された CTGF/Hcs24 には、HCS-2/8 細胞が増殖期にある場合は急速な分泌がみられるが、これに対してコンフルエント期には細胞側に保持され、一部は分子量 10kDa 程度の小断片にプロセスされると思われる所見が得られた。このような CTGF/Hcs24 の動態は、以前の線維芽細胞における報告とは全く異なっている。

【考察】HCS-2/8 細胞に特異的にみられた CTGF/Hcs24 プロモータの転写活性の高さ、増殖期における CTGF/Hcs24 急速な分泌と、コンフルエント期におけるその対照的な動態は、軟骨細胞における CTGF/Hcs24 の特異的役割と制御機構の存在を示唆していると考えられる。

Regulation of gene expression, protein synthesis, and posttranslational fate of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24) in a chondrocytic cell line, HCS2/8

Satoshi Kubota, Takanori Eguchi, Tsuyoshi Shimo, Takako Hattori, Seiji Kondo, Tohru Nakanishi and Masaharu Takigawa

D-6 静止期の肺筋線維芽細胞における Decorin 及び p21 mRNA 発現の経時的変化と細胞の活性化仲谷達也¹、本田映子²、海老名雅仁³、佐藤 研³、宗像 浩¹
（¹近畿大・医・第二生化学、²近畿大・ライフサイエンス研、³東北大・加齢研・呼吸器腫瘍）

【目的】Decorin の発現は細胞増殖と密接に関係しており、静止期にある線維芽細胞は増殖期の細胞に比べて多量の Decorin を産生している。また、ある腫瘍細胞では Decorin の発現の増加が cyclin-dependent kinase inhibitor の 1 つである p21 の発現を高め、細胞周期を G1 期で止めるとされている。本研究では肺筋線維芽細胞で、接触阻害による静止期と血清除去による静止期において Decorin 及び p21 mRNA 発現と細胞の活性化の指標となる α -smooth muscle actin(SMA)蛋白発現を経時的に比較検討した。

【方法】ヒト肺筋線維芽細胞株 MRC-5 を用いて、接触阻害による静止期と血清除去による静止期を作製し、経時的に細胞数、 α -SMA 蛋白発現量、Decorin 及び p21 mRNA 発現量を比較した。細胞数は WST-8 assay、蛋白発現量は Western blot analysis、mRNA 発現量は Quantitative RT-PCR(ABI Prism 7700)により解析した。

【結果】細胞数は血清添加培地、無添加培地の両者とも 3 日目よりほとんど増減がなく、Decorin 及び p21 mRNA 発現量も両者ともこの時期より上昇し始め、その経時的変化は相関していた。しかし、p21 mRNA 発現量は両者に差はなかったが、Decorin mRNA 発現量は無添加培地の細胞が血清添加培地の細胞に比べ、2.8 倍の増加が観察された。また、 α -SMA 蛋白発現量は 3 日目までは両者に差がなかったが、7 日目より無添加培地の細胞が血清添加培地の細胞に比べて増加率の抑制を認めた。

【考察・結論】細胞数、Decorin 及び p21 mRNA 発現量の経時的変化より両者とも 3 日目より静止期に至っており、この細胞も Decorin 合成-p21 合成-G1 arrest という系が考えられる。また、7 日目以後に血清除去による静止期の細胞が接触阻害による静止期の細胞より α -SMA 蛋白発現量の低下を認めたことにより、細胞の活性化速度の抑制が考えられる。すなわち、両者の Decorin mRNA 発現量の差が、細胞の活性化の違いにも反映している可能性が強く、血清除去がその要因となったことが示唆される。

Expression of decorin and p21 mRNA, and α -smooth muscle actin in quiescent human lung myofibroblast

Tatsuya Nakatani¹, Eiko Honda², Masahito Ebina³, Ken Satoh³, and Hiroshi Munakata¹

¹Department of Biochemistry, Kinki University School of Medicine, ²Life Science Research Institute, Kinki University and ³Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Division of Cancer Control, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University