

博士（医学） 小林正明

学位論文題名

骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞の分化における  
IGF結合蛋白の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

緒 言

Insulin-like growth factor-II (IGF-II) は骨形成の重要な局所性成長因子として知られている。このIGFには細胞外でそれと結合し、IGFの生理作用を制御している6種類のIGF結合蛋白(IGFBP)が存在するが、骨芽細胞に対する作用の詳細、特に細胞分化との関係についてはまだ十分には解明されていない。

また、マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞(E1細胞)は血清存在下で長期間培養を続けると分化し、やがて細胞外基質の石灰化を起こすため骨化のモデルと考えられているが、培養経過と共にIGF-II分泌も増加する。そこで本研究では、ヒト血清よりIGFBP-3を精製し、骨芽細胞の分化におけるIGF-IIの効果に対する影響、及び細胞の分化に伴なってIGFBPの分泌様式がその分子種でどの様に異なるかをE1細胞を用いて検討した。

材料と方法

(1) IGFBP-3の精製

IGFBP-3はMartinとBaxterの方法を一部変更し、ヒト血清のCohn分画IV-1ペーストを75mM NaCl-2M酢酸に溶解し、SP-Sephadex C-25のバッチ法後、試料のpHを6.5に上げ、硫酸分画(35~55%)、Phenyl cellulofine、FPLCシステム(Superose 12、Protein Pak G-QA)により精製した。

(2) 細胞培養

(a) E1細胞の分化に対するIGF-IIとIGFBP-3の作用の検討

E1細胞を10%ウシ胎児血清(FCS)を含む $\alpha$ -MEMにてconfluent(この時点を以下培養0日とする)になってから更に3日間培養後、各種濃度のIGFBP-3やIGF-IIを添加、48時間後に細胞を回収し、アルカリリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。

(b) 培養液中の血清由来IGFBPの消長に対する検討

E1細胞を10%FCSを含む $\alpha$ -MEMにて培養し、培養0日と、更に培養を続けた(培養液は3日ごとに交換)培養21日に同じ培養液(10%FCS・ $\alpha$ -MEM)に交換し、それぞれ48時間培養後、培養液中のIGFBPを以下に示す方法で測定した。

(c) E1細胞のIGFBP分泌様式に対する検討

同様に各々一定日数培養してから、培養液を無血清 $\alpha$ -MEMに交換し、その後一定時間培養し、培養液中に分泌されるIGFBPおよび細胞のDNA量とALP活性を測定した。

(3) 培養液中のIGFBPの定量(Westernリガンドプロティング法)

試料を12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった後、ゲル上の蛋白質バンドをニトロセルロース膜に転写し、 $^{125}$ I-IGF-IIと4°Cで一晩反応させ、洗浄・乾燥後、X線フィルムに暴露し、フィルム上のバンドの強度をデンシトメーターを用いて定量化した。

結 果

(1) IGFBP-3の精製

最終標品は電気泳動上、タンパク質の銀染色で単一であり、その泳動距離はWesternリガンドプロティング法で得られたバンドと一致し、ヒトの主要なIGFBP-3の分子量(53kd)と一致することから、IGFBP-3と同定された。

(2) IGF-IIとIGFBP-3のE1細胞ALP活性に対する影響

IGFBP-3は細胞のALP活性に変化を与えたが、単独では効果がない量でIGF-IIとIGFBP-3を同時に添加すると、ALP活性は有意に増加し、IGFBP-3はIGF-IIの骨芽細胞の分化に対する作用を促進した。

(3) 培養液中の血清由来IGFBP-3の消長

培養0日の細胞では48時間培養後、培養液中の血清由来IGFBP-3のバンドはほぼ完全に消失した。しかし、培養21日の細胞では、細胞数は増加しているにもかかわらず、48時間後IGFBP-3のバンドは培養液中に残存した。

(4) 細胞の培養時間によるIGFBPの分子種による分泌様式の違い

培養0日では26kd IGFBPのみが分泌され、培養48時間まで時間に依存して増加した。培養21日では23kd, 26kd, 31kdの3種類のIGFBPの分泌が確認され、共に時間に依存して増加した。更に詳細に検討すると、培養日数の経過に伴い48時間の分泌量はそれぞれ増加したが、細胞のDNA量当たりで換算すると、23kd IGFBPは培養6日目からほぼ一定の分泌量を示し、26kdは最も分泌量の多い6日目をピークにその後ゆっくり減少した。31kd IGFBPは培養3日目から徐々に増加し、培養21日で培養3日目の約5.6倍に達した。

(5) E1細胞のIGFBP分泌パターンの変化と細胞分化との関係

骨芽細胞の分化マーカーとなるALP活性は培養日数の経過に従い上昇した。このALP活性と上記IGFBP分泌との関係を比較検討すると、ALP活性は31kd IGFBPとの間にのみ有意の正の相関( $r=0.955, p<0.01$ )を認め、E1細胞の分化に31kd IGFBP分泌が密接に関与することが明らかとなった。

### 考 察

本研究に於いてもこのE1細胞は培養後confluentになった直後ではALP活性は極めて低値であるが、その後培養日数の経過に伴いALP活性が増加することから、徐々に分化が進行したことが確認された。

このE1細胞の培養系において、単独では無効な量でIGF-IIとIGFBP-3を同時に添加すると、ALP活性は上昇し、IGFBP-3はIGF-IIの骨芽細胞の分化に対する作用を促進した。

また、E1細胞がconfluent直後ではFCSに含まれるIGFBP-3のバンドは培養液中にほとんど検出されなくなり、これは細胞が分化していくためにFCS中のIGFとIGFBPを細胞が必要とし、その結果、培養液中のIGFBP-3が消失したものと考えられる。しかし、分化が進んだ培養後期ではIGFBP-3のバンドは培養液中に残存し、本研究で明らかになったように細胞自身が他のIGFBPを分泌するため、もはや細胞はFCS中のIGFBPを必要とせず、培養液中に残存した可能性が強いと思われる。

一方AmarnaniらのE1細胞培養液からのIGFBPの精製の報告と併せると、本研究で検出された26kdはIGFBP-4、31kd IGFBPはIGFBP-6に相当するものと思われる。IGFBP-6はIGF-Iに比べIGF-IIに約10倍強い親和性があり、E1細胞では、IGF-Iは培養初期から後期にかけほぼ一定量産生するのに対し、IGF-IIの産生は培養の経過に伴い増加し、培養20日にはIGF-Iの約12倍産生する。また、ヒト骨基質においてもIGF-IIがIGF-Iの約13.5倍含まれており、本研究で得られた培養後期での31kd IGFBPの増加はこれらの報告と合わせ考えると、十分に生理的意義を有するものと思われる。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 金田清志

副査教授 西信三

副査教授 石橋輝雄

## 学位論文題名

### 骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞の分化における IGF結合蛋白の役割に関する研究

骨形成の重要な局所性成長因子として知られているinsulin-like growth factor-II (IGF-II)には細胞外でそれと結合し、IGFの生理作用を制御している6種類のIGF結合蛋白(IGFBP)が存在する。また、マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞(E1細胞)は血清存在下で長期間培養を続けると分化し、やがて細胞外基質の石灰化を起こすため骨化のモデルと考えられているが、培養経過と共にIGF-II分泌も増加する。本研究では、ヒト血清よりIGFBP-3を精製し、骨芽細胞の分化におけるIGF-IIの効果に対する影響、及び細胞の分化に伴なってIGFBPの分泌様式がその分子種でどの様に異なるかをE1細胞を用いて検討した。

E1細胞を10%ウシ胎児血清(FCS)存在下にconfluentになってから更に3日間培養後、ヒト血清より精製したIGFBP-3とIGF-IIの細胞のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性に対する効果を検討した。その結果、単独では効果がない量のIGF-IIとIGFBP-3を同時に添加すると、ALP活性は有意に増加し、IGFBP-3はIGF-IIの骨芽細胞の分化に対する作用を促進した。

E1細胞を10%FCSを含む培養液で48時間培養後、培養液中の血清由来IGFBPをWesternリガンドプロッティング法で測定した。培養0日の細胞では48時間培養後、培養液中の血清由来IGFBP-3のバンドはほぼ完全に消失した。しかし、培養21日の細胞では、細胞数は増加しているにもかかわらず、48時間後IGFBP-3のバンドは培養液中に残存した。

同様に各々一定日数培養してから、無血清培養液に交換し、その後一定時間に培養液中に分泌されるIGFBPを検討すると、培養0日では26kdIGFBPのみが分泌され、培養48時間まで時間に依存して増加した。培養21日では23、26、31kdの3種類のIGFBPの分泌が確認され、共に時間に依存して増加した。更に詳細に検討すると、培養日数の経過に伴いそれぞれ分泌量は増加したが、細胞のDNA量当たりで換算すると、23kdIGFBPは培養6日からほぼ一定の分泌量を示し、26kdは最も分泌量の多い6日をピークにその後ゆっくり減少したが、31kdIGFBPは培養3日から徐々に増加した。

また、E1細胞のALP活性は培養日数の経過に従い上昇し、徐々に分化が進行したことが確認された。このALP活性と上記IGFBP分泌との関係を比較検討すると、ALP活性は31kdIGFBPとの間にのみ有意の正の相関を認め、E1細胞の分化に31kdIGFBP分泌が密接に関与することが明らかとなった。

以上より、E1細胞が分化していくために血清中のIGFとIGFBPを必要とし、その結果、培養液中のIGFBP-3が消失したものと考えられる。しかし、分化が進んだ培養後期ではIGFBP-3のバンドは培養液中に残存し、本研究で明らかになったように細胞自身が31kd IGFBPを分泌するため、もはや細胞はFCS中のIGFBPを必要とせず、培養液中に残存した可能性が強いと思われる。

公開発表に際し、西教授からIGF-IIとBMPとの関係、IGFBPがautocrineに作用しているのか、石橋教授から31k IGFBPの増加は細胞に作用するのに十分量なのか、金田教授からIGFBP-3がIGF-IIの作用を促進する作用機序について、さらにフロアーより他の細胞でのIGFBPの作用について等の質問がなされ、これらに対して学位申請者よりそれぞれ適切な回答が得られた。

審査員一同は、骨芽細胞の分化とIGF結合蛋白との関係に新知見を与えた本論文を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。