株化骨芽細胞 MC 3 T 3-E 1 による Transforming
Growth Factor- β (TGF- β) の産生と
その Autoregulatory 効果

菊 地 寛 高

明海大学歯学部口腔微生物学講座 (主任 : 北野繁雄教授)

〔受付 : 平成 3 年 9 月 11 日〕

Production of Transforming Growth Factor- β
by Osteoblastic MC 3 T 3-E 1 Cells, and
Autoregulatory Effect of the Factor
on Their Functions

Hiroataka Kikuchi

*Department of Oral Microbiology
Meikai University School of Dentistry, 1-1 Keyakidai,
Sakado-city, Saitama 350-02 Japan
(Chief : Prof. Shigeo Kitano)*

〔Accepted for publication : September 11, 1991〕

Key words : TGF- β / osteoblast / autocrine

Abstract : The purpose of this study was to examine the autoregulatory effect of transforming growth factor- β (TGF- β) derived from mouse osteoblastic cell, MC3T3-E1, on some functions of the cells. These cells secreted both active and latent formes of TGF- β into their culture medium. The peak of the TGF- β activity was observed in the conditioned medium on day 9-11 after initiation of the culture. By Bio-Gel P-60 gel filtration, a single peak of TGF- β activity in the acidified conditioned medium was detected in the fraction corresponding to an apparent molecular weight of 25 K-daltone. The TGF- β activity was neutralized by anti-human TGF- β antibody. It was demonstrated by Northern blot and immunoprecipitation analyses that the cells expressed the TGF- β gene and then secreted TGF β into their culture medium. The TGF- β semipurified by gel filtration increased DNA and collagen syntheses of the cells. However, the factor decreased their alkaline phosphatase activity in a dose-dependent fashion. These results suggest that osteoblastic cell-derived TGF- β regulates some cellular functions in an autocrine manner.

緒 言

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収とをくり返し、絶えずその形態を調節している組織である。そして、この骨形態調節機構における骨芽細胞の増殖や分化は、全身的ならびに局所的因子により、複雑に調節されている。このような調節因子のなかで TGF- β は、個体あたりの総量で骨組織に最も多く含有されていること^{1,2)}、ヒト血小板由来 TGF- β が骨芽細胞の細胞外マトリックスの合成を増加させ^{3,4)}、逆に、骨吸収に対しては促進的に作用すること⁵⁾、などから骨代謝における重要な共役因子として、注目されている。また、骨芽細胞自身が多量の TGF- β を産生し⁶⁾、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ や PTH などの骨吸収因子に反応し、その産生量を増加させること^{7,8)}、TGF- β がリンパ球^{9,10)}や肝細胞¹¹⁾、または、他の組織由来の線維芽細胞や腫瘍細胞¹²⁾など多くの細胞に対して、むしろ増殖を抑制する方向に作用し、増殖が促進されるのは骨芽細胞などごく一部の細胞であることを考えると、骨芽細胞に対する TGF- β の効果を明らかにすることは、骨代謝における局所因子としての TGF- β の役割を理解するうえで、非常に重要であると考えられる。さらに、骨組織のように閉鎖的な環境においては、骨細胞は autocrine 的に自己の増殖や機能発現を制御している可能性が大きい。したがって、骨代謝における TGF- β の役割を理解するためには、骨芽細胞由来の TGF- β を用いて同細胞に対する autoregulatory 効果を明らかにすることが重要である。しかしながら、現在までに骨芽細胞由来の TGF- β による骨芽細胞自身に対する autoregulatory 効果に対する知見は見あたらない。そこで著者は、株化骨芽細胞 MC3T3-E1 の培養上清から TGF- β を部分精製し、同因子を用いて、本細胞の増殖と機能発現に対する効果を検討した。その結果、MC3T3-E1 細胞は TGF- β を産生し、自ら産生した TGF- β により、autocrine 的に DNA 合成やコラーゲン合成を促進し、逆に、alkaline phosphatase (ALP) 活性を抑制する、という知見を得たのでここに報告する。

材料・方法

1. 細胞培養

本実験には Kodama ら^{13,14)}により C57BL/6 マウス頭蓋冠から株化された骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いた。細胞は、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含む α -Modified Minimum Essential Medium (α -MEM, Flow Lab., Maclean, VA, U.S.A.) に、10%牛胎児血清 (FBS, Hyclone Lab., Inc., Logan, UT, U. S. A.) を添加し、37°C、5%炭酸ガス気相下で維持し、4日ごとに0.01%プロナーゼEと0.02% EDTA を含むリン酸緩衝液にて細胞を分散し、継代した。

2. TGF- β と抗 TGF- β 抗体

ヒト血小板由来 TGF- β 1 (宝酒造, 大阪) および、ウサギ抗ヒト TGF- β 1 IgG 抗体 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, U. S. A.) を使用した。

3. NRK-49F 細胞コロニー形成能による TGF 活性の測定

TGF 活性は、NRK-49F 細胞の軟寒天中でのコロニー形成能より測定した^{15,16)}。すなわち、24穴平底プレート (NUNK, Kamstrup, Denmark) に500 μl の0.5%アガロース (Marine Colloids, Co., Rockland, ME, U. S. A.) を注ぎ単層を形成し、この単層上に、10% FBS を含む α -MEM に最終濃度 0.33% のアガロースと 3×10^5 個の細胞を懸濁したアガロース溶液500 μl を重層した。この上に、マウス epidermal growth factor (2.5 ng/ml, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MI, U. S. A.) を含む200 μl の各種濃度の試料を添加し、37°C、5%炭酸ガス気相下で、10-14日間培養した後、直径100 μm 以上のコロニーを計測した。コロニー形成率は、一視野中の全コロニー数に対する、直径100 μm 以上のコロニー数を百分率で表した。

4. MC3T3-E1 細胞培養上清中の活性型および非活性型 TGF の検索

90 mm プラスチックシャーレ (Falcon, Cat. No. 3003, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, U. S. A.) に 3×10^5 個の細胞を播き

込み、10% FBS を添加した α -MEM にて8日間培養した。この培養上清を採取し、酸処理群と非処理群に分けた。酸処理群は 1N 塩酸にて pH 2 まで培地 pH を低下させ、4°C で2時間酸処理した後、1N 水酸化ナトリウムにて pH 7 とした。その後、酸処理群、非処理群共にリン酸緩衝液に対して透析し、濾過滅菌後 NRK-49F 細胞のコロニー形成能について測定した。

5. MC3T3-E1 細胞培養上清中の TGF 活性の動態測定

35 mm プラスチックシャーレ (Falcon, Cat. No. 3001) に 5×10^4 個の細胞を播き込み、10% FBS を添加した α -MEM にて所定の日時まで培養した。すなわち、0日目、3日目、6日目、9日目、12日目まで培養したグループに分け、その後、おのおの α -MEM にて3回洗浄し、さらに、FBS 非添加条件下で2日間培養した培養上清を採取した。それぞれ採取した培養上清は800×g で15分間遠心した後、1N 塩酸にて pH 2 まで pH を低下させ、4°C で2時間、酸処理した。さらに、1N 水酸化ナトリウムにて pH 7 とした後、リン酸緩衝液に対して透析し、濾過滅菌後 NRK-49F 細胞のコロニー形成能について測定した。

6. MC3T3-E1 細胞の conditioned medium (CM) からの TGF 活性画分の部分精製

90 mm プラスチックシャーレ (Falcon, Cat. No. 3003) に 3×10^5 個の MC3T3-E1 細胞を播き込み、10% FBS を添加した α -MEM にて、confluent monolayer になるまで培養した。その後 α -MEM にて、この monolayer を3回洗浄した後、FBS 非添加条件下で2日間培養し、その培養上清を conditioned medium (CM) として実験に供試した。この CM 400ml を、800×g で15分間遠心した後、1N HCl にて pH 2 まで CM の pH を低下させ、4°C で2時間、酸処理した。その後、この CM をポリエチレングリコール20,000 にて 2ml まで濃縮し、Bio-Gel P-60 カラム (Bio-Rad Japan, 東京, 22×1,000mm) にて分画を試みた。溶出緩衝液には、50mM の酢酸ナトリウムを添加した 0.1M 酢酸溶液 (pH 7.5) を用い、溶出量12ml/hr にて溶出させた。得られた各フラクションは、リン酸緩衝液に対して透析し、

濾過滅菌後、NRK-49F 細胞のコロニー形成能について測定した。その結果、この細胞のコロニー形成の活性は、分子量 25,000 の位置に単一ピークとして検知された。このようにして得た TGF 活性画分を部分精製 TGF- β として、再度 α -MEM に対して透析し、以下の実験に使用した。

7. 部分精製 TGF- β の TGF 活性に対する抗ヒト TGF- β 1 抗体の中和反応

部分精製 TGF- β (5 μ g protein/ml) にウサギ抗ヒト TGF- β 1 IgG 抗体 (50 μ g/ml) を添加し、37°C で2時間反応させた。その後、この試料を NRK-49F 細胞の軟寒天中でのコロニー形成能測定に供試した。実験は三連培養にて行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差にて表した。

8. RNA の抽出と Northern blot hybridization

MC3T3-E1 細胞を90mm プラスチックシャーレ (Falcon, Cat. No. 3003) に播き込み、confluent monolayer になるまで、10% FBS 添加 α -MEM にて培養した。この細胞を FBS 非添加 α -MEM にて4回洗浄した後、FBS 非添加 α -MEM にて48時間培養した。その後、全 RNA を Glisin らの方法¹⁷⁾により抽出した。RNA は1% アガロースゲル電気泳動にて分画後、ナイロンフィルター (Micron Separation, Westboro, MA, U. S. A.) に転写した。このフィルターに ³²S-dCTP (Amersham Japan, 東京) にてラベルしたヒト TGF- β cDNA (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U. S. A.) をハイブリダイズさせた。フィルターは SSC にて洗浄後、20% (w/v) の 2, 5-ジフェニルオキサゾール (PPO) を含むトルエンに浸漬して増感させ、-70°C で X線フィルム (X-OMAT AR, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, U. S. A.) に感光させた。

9. 免疫沈降反応とポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

5×10^4 個の細胞を 35 mm プラスチックシャーレ (Falcon, Cat. No. 3001) に播き込み、10% FBS を含むシスチン不含の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, 極東製薬工業, 東京) にて3日間培養した。その後、細胞を3回洗浄し、100 μ Ci の ³⁵S-シスチン (sp. activity,

1300Ci/mM; New England Nuclear, Boston, MA, U. S. A.) を含んだシステイン不含の D-MEM にて24時間培養した。この培養上清のうちの500 μ l を、100 μ g の抗ヒト TGF- β 1 抗体と共に4°C で2時間静置した後、20mg のプロテイン A-セファロース CL-4B (Pharmacia Japan, 東京) を添加し、さらに、4°C にて2時間静置した。その後、この混合液を、500 $\times$ g で20分間遠心し、得られた沈渣を Laemmli らの方法¹⁸⁾ に従い、12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルは乾燥後フルオログラフィーを行い、X線フィルム (X-OMAT AR, Eastman Kodak Co.) に感光させた。

10. MC3T3-E1 細胞の DNA 合成能の測定
MC3T3-E1 細胞を96穴平底マイクロカルチャープレート (NUNK, Kamstrup, Denmark) に5 $\times$ 10³個/well の割合で播き込み、10% FBS を含む α -MEM 200 μ l と共に培養した。3日間37°C、5%炭酸ガス気相下で培養した後、FBS 非添加 α -MEM にて十分洗浄し、200 μ l の各種試料を添加した後、さらに、FBS 非添加条件下で24時間培養した。培養終了3時間前に0.5 μ Ci の ³H-チミジン (sp. activity, 6.02Ci/mM; New England Nuclear) にてラベルした。細胞の放射活性の測定は Hanazawa ら^{19,20)} の方法に従った。すなわち、培養終了後の各ウエルの細胞をマルチセルハーベスター (ラボ・サイエンス, 東京) を用いてガラスフィルター上に採取してバイアルに入れ、これにトルエンを溶媒として加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-900, Aloka, 東京) にて測定した。実験は三連培養にて行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差にて表した。

11. 部分精製 TGF- β による MC3T3-E1 細胞の形態変化の観察

細胞を10% FBS 添加 α -MEM にて subconfluent monolayer になるまで培養した。その後、FBS 非添加 α -MEM にて3回洗浄し、これに各種試料を添加して、FBS 非添加条件下でさらに24時間培養した細胞の形態を位相差顕微鏡にて観察した。

12. MC3T3-E1 細胞の alkaline phosphatase (ALP) 活性の測定

35 mm プラスチックシャーレ (Falcon, Cat. No. 3001) に5 $\times$ 10⁴個の細胞を播き込み、10% FBS 添加 α -MEM にて24時間培養した。その後、血清非添加 α -MEM で3回洗浄し、各種濃度の試料を含む1% FBS 添加 α -MEM (1.5ml) にて3日間培養した。ALP 活性の測定のための試料の調製は、Ohmori らの方法²⁰⁾ に従った。すなわち、培養した細胞をリン酸緩衝液で2回洗浄した後、0.2%ノニデート P-40 にて回収し、超音波破碎装置 (Model 200, Branson Ultrasonic Co., Danbury, CO, U. S. A.) で破碎した。その後、1,500 $\times$ g、10分間の遠心を行い、その上清を酵素液とした。また、上清の一部を蛋白質量の測定に用いた。ALP 活性は Lowry らの方法²¹⁾ に準じて行った。

13. MC3T3-E1 細胞のコラーゲンおよび非コラーゲン蛋白質の測定

細胞は、前述の ALP 活性の測定と同様の条件で培養した。試料を添加し、72時間培養した後、3回洗浄した。その後、50 μ g/ml のアスコルビン酸と50 μ g/ml の β -アミノプロピオニトリル、5 μ Ci の L-[2, 3-³H] プロリン (sp. activity, 30.01 Ci/mM, New England Nuclear) を含む1 ml の α -MEM に交換し、さらに、5時間培養した。この培養上清を採取し、培養上清中の蛋白質を、10%トリクロロ酢酸と、1%タンニン酸混合液にて沈殿させ、これを、氷冷アセトンとジエチルエタノールにて洗浄した後乾燥させ、得られた沈渣を細菌性コラゲナーゼ (Type III, Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.) で消化した。消化後、collagenase digestible protein (CDP) と non-collagen protein (NCP) とに分けて、それぞれに取り込まれた放射活性を、Petrokofsky と Diegelman^{22,23)} の方法に従って測定した。

結 果

1. MC3T3-E1 細胞培養上清中の活性型および非活性型 TGF の検索

まず、MC3T3-E1 細胞が培養上清中に活性型のTGF を産生するか否かを検討した。同細胞培養8日後、confluent monolayer に達した培養上清を酸処理群と非処理群とに分け、TGF- β の特

Fig. 1 MC3T3-E1 cells secrete both active and latent forms of TGF into their culture medium.

The cultured medium of the cells was harvested on day 8 after initiation of the culture. Untreated and acid-treated cultured medium were diluted 5 fold as a final concentration, and then were assayed for NRK-49F cell colony formation. The experiment was carried out with triplicate cultures. Data are expressed as a percentage of cloning efficiency (%) as described in Materials and Methods.

* Significantly different from control ($p < 0.01$) by Student's t test.

異的な indicator cell である NRK-49F 細胞による軟寒天中でのコロニー形成能を指標として TGF 活性を測定した。その結果, Fig. 1 に示すように, 酸処理群および非処理群の培養上清中に, 対照と比べ有意に高いコロニー形成が認められた。これらの結果は, MC3T3-E1 細胞がその培養上清中に, 非活性型のみならず活性型の TGF をも産生していることを示唆するものである。

2. MC3T3-E1 細胞培養上清中の TGF 活性の動態

次に, MC3T3-E1 細胞培養上清中の TGF 活

Fig. 2 Kinetics of TGF production by MC3T3-E1 cells.

MC3T3-E1 cell-derived cultured medium was harvested at selected intervals after initiation of the culture. The acid-treated cultured medium was diluted 5-(●) or 10-(○) fold as a final concentration, and assayed for NRK-49F cell colony formation. The experiment was carried out with triplicate cultures. Data are expressed as a percentage of cloning efficiency as described in Materials and Methods.

性の動態について, NRK-49F 細胞のコロニー形成能を指標として調べた。すなわち, 細胞を 10% FBS 添加 α -MEM で培養後, FBS 非添加 α -MEM で 2 日間培養し, その培養上清を酸処理後, 中性条件に戻し, TGF 活性を測定した。Fig. 2 に示すように TGF 活性のピークは培養 9-11 日目, すなわち, 同細胞が confluent monolayer の状態の培養上清中に認められ, これ以降は細胞数が増加するにもかかわらず, 培養上清中の TGF 活性に大きな差は認められなかった。

3. Bio-Gel P-60 による TGF 活性画分の分画

そこで, MC3T3-E1 細胞の培養 9-11 日目の CM より TGF 活性画分の分画を試みた。まず, 400 ml の CM を採取し酸処理, 濃縮後, 酸性条件下で Bio-Gel P-60 を用いてゲル濾過を行い, 各画

Fig. 3 Fractionation by Bio-Gel P-60 of MC3T3-E1 cell-derived CM. Acid-treated CM was applied to a Bio-Gel P-60 packed column and then eluted with 0.1 M acetic acid supplemented with 50 mM sodiumacetate. NRK-49F cell colony formation was assayed for each fraction. The fractionation pattern was obtained by determination of the percentage of cloning efficiency as described in Materials and Methods. The colony assay was carried out with triplicate cultures.

分について、NRK-49F 細胞の軟寒天中でのコロニー形成能を指標として TGF 活性を測定した。その結果、同細胞のコロニー形成能を促進する単一のピークが、分子量25 K-dalton の位置に分画された (Fig. 3)。

4. TGF 活性画分に対する抗ヒト TGF- β 1 抗体の効果

Bio-Gel P-60 により分画した TGF 活性画分を抗ヒト TGF- β 1 抗体と反応させ、NRK-49F 細胞の軟寒天中でのコロニー形成能を指標として TGF 活性を測定したところ、同画分の TGF 活性は有意に抑制された (Fig. 4)。ゲル濾過の結果と抗ヒト TGF- β 1 抗体による TGF 活性抑制の結果は、MC3T3-E1 細胞が CM 中に産生する TGF が β -type であることを示唆するものである。

5. MC3T3-E1 細胞における TGF- β の遺伝子発現と培養上清中への同因子の分泌の確認

MC3T3-E1 細胞の CM 中に存在する TGF が

β -type であることの可能性は、ヒト TGF- β 1 cDNA を用いた Northern blot hybridization や、抗ヒト TGF- β 1 抗体を用いた、免疫沈降反応の結果からも示唆された。すなわち、Northern blot hybridization においては、2.5kb の位置に TGF- β 1 mRNA の発現が単一バンドとして認められ (Fig. 5 A)、免疫沈降反応においても、抗ヒト TGF- β 1 抗体に非特異的の反応は認められるものの、25Kd の位置に明らかな TGF- β のバンドが確認された (Fig. 5B)。これらの結果は、MC3T3-E1 細胞が TGF- β 1 の遺伝子を発現し、さらに、同因子を培養上清中に分泌していることを示唆するものである。

6. MC3T3-E1 細胞由来の部分精製 TGF- β による同細胞の DNA 合成促進作用

MC3T3-E1 細胞の産生した TGF- β が、autocrine 的に同細胞の増殖に影響を与えるのか否かを検討するため、subconfluent monolayer の

Fig. 4 Neutralization of TGF activity in CM of MC3T3-E1 cells by TGF- β antibody. Semipurified TGF (5 μ g protein/ml) was treated with anti-human TGF- β antibody for 2 hr at 37°C. The treated factor, as well as untreated factor as a control was assayed for NRK-49F cell colony formation. Data are expressed as a percentage of cloning efficiency as described in Materials and Methods.

* Significantly different from control ($p < 0.005$) by Student's *t* test.

MC3T3-E1 細胞に 0.1–5 μ g protein/ml の部分精製 TGF- β を添加した。その結果、部分精製 TGF- β は、同細胞の DNA 合成を、濃度依存的に促進させ、5 μ g protein/ml の部分精製 TGF- β 添加時には対照群の 2.4 倍にまで同細胞の DNA 合成を促進させた (Fig. 6A)。さらに、Fig. 6B に示すように、この促進作用は抗ヒト TGF- β 1 抗体の前処理により、ほぼ完全に中和された。したがって、部分精製 TGF- β による MC3T3-E1 細胞の DNA 合成促進作用は、TGF- β によるものであることが示唆された。

7. 部分精製 TGF- β 添加による MC3T3-E1 細胞の形態変化の観察

TGF- β は正常細胞をトランスフォーム化させることが知られている²⁴⁾。そこで、subconfluent monolayer の MC3T3-E1 細胞に部分精製 TGF- β と血小板由来 TGF- β を添加し、24時間培養し

Fig. 5 TGF- β gene expression in MC3T3-E1 cells and detection of TGF- β in the culture medium by immunoprecipitation. TGF- β gene expression of the cells was analyzed by Northern blot with human TGF- β cDNA probe (A). TGF- β in the cell culture medium was detected by immunoprecipitation assay with anti-human TGF- β antibody (B). Experimental conditions and procedures were described in Materials and Methods.

たところ、Fig. 7 (A–D) に示すように部分精製 TGF- β 添加群、血小板由来 TGF- β 添加群ともに、処理した細胞は敷石状の形態から線維芽細胞様の形態へと変化することが示された。これらの結果は、部分精製 TGF- β が MC3T3-E1 細胞の増殖を促進し、同細胞を分化した状態から、脱分化の状態へ転換させたことの可能性を示唆するものである。

8. MC3T3-E1 細胞の蛋白質合成能と ALP 活性に対する部分精製 TGF- β の影響

次に、部分精製 TGF- β が骨芽細胞の機能発現に対してどのような影響を与えるかを検討するため、蛋白質合成能と骨芽細胞の分化マーカーとして重要な ALP 活性に対する影響を調べた。Fig. 8 に示すように subconfluent の状態の MC3T3-E1 細胞において、0.1–5 μ g protein/ml の部分精製 TGF- β は、濃度依存的に蛋白質合成量を増加させ、逆に、ALP 活性を減少させた。その ALP 活性抑制効果は、5 μ g protein/ml の部分精製 TGF- β の添加群において、対照群の 63% にま

Fig. 6 Stimulatory effect of semipurified TGF- β on DNA synthesis of MC3T3-E1 cells and neutralization of the effect by anti-human TGF- β antibody.

The cells (5×10^3 cells) were plated in each well of a microculture plate with 10% FBS-containing α -MEM, and incubated for 3 days. Then, they were washed and incubated alone or with various concentrations of semipurified TGF- β (A) or with the human TGF- β (1 $\mu\text{g/ml}$) and with or without anti-human TGF- β antibody (B). DNA synthesis of the cells was assayed after a 24 hr culture. Data are expressed as means $\pm$ S.D. of triplicate cultures.

* Significantly different from control ($p < 0.001$) by Student's t test.

で活性を抑制した。これらの結果は、前述のDNA合成促進効果に関する結果とも併せ、部分精製TGF- β がMC3T3-E1細胞に対してautocrine的にこの脱分化に作用していることを示唆するものである。

9. MC3T3-E1細胞のコラーゲン合成能に対

Fig. 7 Morphological changes of untreated, semipurified and human TGF- β -treated MC3T3-E1 cells. Control MC3T3-E1 cells (A), the cells treated with semipurified TGF- β at 1 μg protein/ml (B) or 5 μg protein/ml (C), or with human TGF- β at 1 ng/ml (D). The cells were cultured as described in the legend of Fig. 6 (A).

Fig. 8 Inhibitory effect of semipurified TGF- β on ALP activity of MC3T3-E1 cells.

The cells (5×10^4 cells) were plated in 35 mm plastic dishes, and incubated for 3 days in 10% FBS supplemented- α -MEM. Then they were washed, further incubated for 3 days in 1% FBS supplemented- α -MEM containing various concentrations of the semipurified factor, and then assayed for ALP activity and total protein. Data are expressed as means $\pm$ S.D. of triplicate cultures.

* Significantly different from control ($p < 0.01$) by Student's t test

Table 1 Effect of semipurified TGF- β on collagen synthesis of MC3T3-E1 cells

Semipurified TGF- β (μ g protein/mm)	CDP (dpm $\times 10^{-2}$)	NCP (dpm $\times 10^{-2}$)	% collagen synthesis
Control	84.9 $\pm$ 13.0	203.6 $\pm$ 19.6	7.1 $\pm$ 0.6
0.1	97.3 $\pm$ 2.3	202.7 $\pm$ 12.4	8.2 $\pm$ 0.6
1	102.8 $\pm$ 5.4	226.8 $\pm$ 13.1	7.8 $\pm$ 0.3
5	99.9 $\pm$ 5.4	189.0 $\pm$ 10.3	9.0 $\pm$ 0.9*
10	125.9 $\pm$ 7.4	207.4 $\pm$ 16.0	10.1 $\pm$ 0.4*

The cells were cultured as described in the legend of Fig. 8. After the cultivation, the cells were pulsed for 5 hr with [3 H] proline. And collagen synthesis was measured as described in Materials and Methods. Data are expressed as means $\pm$ S.D. of triplicate cultures.

* Significantly different from control ($p < 0.001$) by Student's t test.

する部分精製 TGF- β の効果

TGF- β は多くの細胞において細胞外マトリックスの合成を著明に促進することが知られている^{3,4)}。そこで、骨芽細胞が産生するマトリックスの中でも最も重要であると思われるコラーゲンの合成能に対する部分精製 TGF- β の効果を検討した。すなわち、subconfluent の MC3T3-E1 細胞に、部分精製 TGF- β 0.1 - 10 μ g protein/ml を添加し、72時間培養した後、 3 H-プロリンにてパルスラベルした。その後、CDP と NCP とに取り込まれた放射活性を測定した結果、Table 1 に示すように部分精製 TGF- β は、10 μ g protein/ml 添加で MC3T3-E1 細胞の CDP 量を有意に増加させた。また、同細胞のコラーゲン合成率を、部分精製 TGF- β 5 μ g/ml と 10 μ g/ml 添加において、有意に増加させた。

考 察

生理活性物質の応答細胞に対する作用機構には、endocrine, paracrine, autocrine が存在すること、autocrine は生理活性物質の産生細胞自身が、同時にその活性物質に対する応答細胞として反応するため、微小環境下における代謝調節を考察するうえで重要な機構であり、種々の生理活性物質がこの様式に従って、細胞の機能を発現することが知られている。このような生理活性物質の中で、TGF- β は個体あたりの総量を比較した場合、骨組織に最も多量に含まれていることから、骨代謝における局所の調節因子として特に注

目されているサイトカインの一つである。さらに、いくつかの知見は、TGF- β が骨形成⁶⁾と骨吸収⁵⁾との両方に関わる、共役因子であることを示している。したがって、骨芽細胞が骨形成のみならず、破骨細胞による骨吸収にも密接に関与しているという最近の知見^{25,26)}を考察すると、骨芽細胞の機能に対する TGF- β の autoregulatory 効果を明らかにすることは、意義あるものと考えられる。

現在までに、骨芽細胞の機能発現に対する TGF- β の効果に関しては、コラーゲン合成の促進など、いくつかの報告^{3,4,7,8)}があるが、これらの知見の多くは血小板由来の TGF- β を用いて行われている。しかしながら、骨代謝における骨芽細胞の autocrine 機構を考察するためには、骨芽細胞由来の TGF- β を用いなければ、真の意味での autocrine を証明したことにはならないと考える。そこで、著者は本研究において、株化骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞を用い、同細胞が活性型および非活性型の TGF- β をその培養上清中に分泌し、この骨芽細胞由来の TGF- β が autocrine 的に同細胞の増殖と機能の発現を調節することを明らかにした。まず、MC3T3-E1 細胞が生理的に機能し得る活性型の TGF- β を産生しているか否かについて検討した。TGF- β は生体内では通常、高分子の蛋白質が結合した非活性型として存在し²⁷⁻³⁰⁾、この高分子蛋白質が解離しなければ活性型として生理活性を示さないことが知られている。また、培養細胞においても非活性型として分泌される場合が多い^{16,31)}。しかし、いくつかの腫

瘍細胞がそれら培養上清中に活性型の TGF- β を分泌するという知見が報告されており³²⁾、本研究においても MC3T3-E1 細胞の培養上清中には非活性型と共に、活性型の TGF の存在が認められた。そこで、同細胞の CM を酸性条件下で Bio-Gel P-60 にてゲル濾過したところ、分子量 25K-dalton の画分に一致して NRK-49F 細胞の軟寒天中でのコロニー形成を促進するピークが認められた。さらに、このコロニー形成能を指標とした TGF 活性は、抗ヒト TGF- β 1 抗体によりほぼ完全に中和された。TGF- β 1 は、ヒト³³⁾、ブタ³⁴⁾、マウス³⁵⁾など、種を越えて高いアミノ酸配列の相同性を有していることが知られている。ことに、ヒトとマウスでは TGF- β 1 をコードする 112 個のアミノ酸残基のうち、わずか 1 個にしか違いが見られない程、高い相同性を有している。ゆえに今回、著者のゲル濾過による MC3T3-E1 細胞の CM の分画、およびヒト TGF- β 1 cDNA を用いた Northern blot hybridization と、抗ヒト TGF- β 1 抗体を用いた免疫沈降反応の結果は、MC3T3-E1 細胞が TGF- β 1 の遺伝子を発現し、同因子をその培養上清中へ分泌していることを示唆するものである。

しかしながら、培養上清中の TGF- β の多くは、非活性型として存在すると考えられるため、その活性化機構を考察することは重要である。現在、*in vitro* において非活性型の TGF- β は、glucosidase³⁶⁾、plasmin^{37,38)}、低 pH³⁹⁾ 処理により、また、chaotropic 因子^{24,30)}などの処理により活性型へ変換されるものと考えられている。骨組織における、その活性化の機構がいかなるものかは未だ不明な点が多いが、ごく最近、骨髓中より分離された破骨細胞が、培養骨細胞から分泌された非活性型 TGF- β を活性型に変換することが報告⁴⁰⁾されたことは大変興味深い。現在のところ、*in vivo* において骨芽細胞から産生された非活性型の TGF- β が、どのような機構で活性化されるのかについては十分には説明できないが、一度、活性化されれば、同因子が autocrine 調節因子としてその産生細胞の機能発現に作用するものと思われる。

血小板由来 TGF- β を用い、骨芽細胞の増殖に

関する効果を検討したいつかの知見が報告されている。すなわち、その TGF- β は骨芽細胞の増殖に対し、促進的に作用するという報告が多いが、抑制的に作用するとの報告⁴¹⁻⁴³⁾も散見され、一定でない。このように逆の結果が得られるのは、細胞の種類や細胞密度、さらに、培養条件の違い、ことに血清濃度の違いが影響しているものと考えられる。Noda ら⁴¹⁾はブタ血小板由来 TGF- β が preconfluent の状態の MC3T3-E1 細胞の DNA 合成を抑制し、ALP 活性を促進するという結果を報告しているが、この結果と今回の著者の結果との差異は、培地中の血清濃度の影響と、著者の実験より細胞密度がやや粗であることによる細胞の分化段階の違いによるものと思われる。逆に、Centrella ら⁴⁴⁾は confluent monolayer となったラット頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞を、24時間血清非添加状態におき、その後23時間血清非添加条件下で TGF- β を作用させると、同細胞の DNA 合成を促進すると報告している。TGF- β の autoregulatory 効果を検討する場合、血清の影響を除外した実験系の方が TGF- β の作用をより明確に説明できるものと考えられ、その意味で、Centrella らの報告は、細胞種の違いを考慮に入れても、より正確に骨芽細胞に対する TGF- β の作用を反映しているものと思われる。本実験においても、部分精製した MC3T3-E1 細胞由来の TGF- β は、confluent monolayer の状態の同細胞の DNA 合成を血清非添加条件下で促進し、この促進効果は抗ヒト TGF- β 1 抗体により中和された。

TGF- β は、細胞の分化の状態により細胞増殖に対し促進的にも抑制的にも作用する。そこで、骨芽細胞の分化マーカーとして重要な ALP 活性に対する部分精製 TGF- β の効果を測定することは意義あるものと考えられる。今回、MC3T3-E1 細胞由来の部分精製 TGF- β は、同細胞の ALP 活性を、その DNA 合成促進効果とは逆に、抑制することが分かった。さらに、部分精製 TGF- β の添加により MC3T3-E1 細胞は、敷石状の形態から線維芽細胞様の形態へと変化することが認められた。これらの結果は、部分精製 TGF- β が細胞を分化した状態から脱分化の状態へと転換させたものと考えられる。また、骨芽細胞や線維芽細

胞において、TGF- β はコラーゲン、オステオネクチン、ファイブロネクチン等の細胞外マトリックス蛋白質の合成を著明に促進することが知られており^{3,4)}、これらの促進効果は mRNA レベルにおいても観察されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。Centrella ら⁴⁴⁾や Ignatz ら⁴⁵⁾は NRK-49F 線維芽細胞と骨芽細胞様細胞における TGF- β によるコラーゲン mRNA レベルの増加は、転写レベルの促進によるものであると報告している。また最近、TGF- β によるコラーゲン遺伝子発現の促進作用は、同遺伝子プロモーターに存在する転写調節蛋白質 NF-1 の結合領域を介して行われること⁴⁷⁾が明らかにされた。本実験においても、部分精製 TGF- β は MC3T3-E1 細胞のコラーゲン合成を有意に増加させたが、同因子による MC3T3-E1 細胞のコラーゲン合成の増加が、転写レベルでの促進によるものであるのかは今現在明らかではない。しかしながら、ALP とコラーゲンという、2つの表現型に対して、部分精製 TGF- β が全く逆の結果を示したということは、これら2つの蛋白質をコードする遺伝子が TGF- β に対してそれぞれ別々の調節領域を有している可能性がある。ALP 遺伝子の発現調節にどのような核内調節因子が関与しているか、さらに、これら骨芽細胞の機能発現に重要な遺伝子群が相互にどのように調節されているのかは不明であり、今後、これらの点を解明することは bifunctional regulator としての TGF- β の作用を明らかにするうえで、意義あることと思われる。

結 論

本研究は、骨形態調節機構における transforming growth factor- β (TGF- β) の骨芽細胞に対する機能的役割を解明する目的で、株化骨芽細胞 MC3T3-E1 の培養上清から TGF- β を部分精製し、同因子による MC3T3-E1 細胞に対する autoregulatory 効果について検討し、以下の知見を得た。

1. 株化骨芽細胞 MC3T3-E1 はその培養上清中に、活性型と非活性型の TGF を自発的に産生した。

2. MC3T3-E1 細胞を培養し経日的に培養上

清を採取し、その培養上清中の TGF 活性の動態を検討した結果、同活性のピークは、培養後9-11日目の培養上清に認められた。

3. MC3T3-E1 細胞の培養後 9-11 日目の培養上清から conditioned medium (CM) を採取し、酸性条件下で Bio-Gel P-60 カラムにて分画した結果、TGF 活性は分子量25 K-dalton をピークとするフラクションに分画された。

4. そのゲル濾過により部分精製された TGF 活性因子の活性は抗ヒト TGF- β 1 抗体によりほぼ完全に中和された。

5. また、MC3T3-E1 細胞の全 RNA による Northern blot hybridization と CM の免疫沈降反応の結果から、本活性は TGF- β によるものと考えられる。

6. 部分精製 TGF- β は、その産生細胞である MC3T3-E1 細胞の DNA 合成を濃度依存的に促進させた。

7. 部分精製 TGF- β は、MC3T3-E1 細胞の形態を敷石状の形態から線維芽細胞様の形態へと変化させた。すなわち、同細胞を分化した状態から脱分化の状態へ転換させたことを示唆した。

8. 部分精製 TGF- β は、MC3T3-E1 細胞の蛋白質合成を濃度依存的に増加させたが、逆に、ALP 活性を有意に減少した。

9. 部分精製 TGF- β は、MC3T3-E1 細胞のコラーゲン合成能を有意に増加させた。

以上の知見は、MC3T3-E1 細胞から産生された TGF- β が同細胞の機能を autocrine 的に調節する重要な因子であることを示唆するものである。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始御指導、御鞭撻賜りました明海大学歯学部口腔微生物学講座、北野繁雄教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究に種々の御教示を頂きました花澤重正助教授、大森喜弘講師、本研究に御協力下さった口腔微生物学講座の各位に深く感謝致します。さらに、MC3T3-E1 細胞を御分与頂きました小玉博明博士にお礼申し上げます。

本論文の要旨は第30回歯科基礎医学会（1988年10月）、第7回日本骨代謝学会（1989年7月）において発表した。

抄録：本研究は、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 の機能発現におよぼす transforming growth factor- β (TGF- β) の作用について検討したものである。本細胞は活性型、非活性型両者の TGF- β を培養上清中に分泌した。その培養上清を Bio-Gel P-60 により酸性条件下でゲル濾過したところ、分子量25K-daltone の画分に一致して TGF- β 活性の単一ピークが認められた。この TGF- β 活性は、抗ヒト TGF- β 抗体により中和された。Northern blot と免疫沈降反応の結果から、本細胞は TGF- β 遺伝子を発現していることが示された。ゲル濾過により部分精製された TGF- β は、MC3T3-E1 細胞の DNA 合成とコラーゲン合成を促進した。しかしながら、部分精製 TGF- β は同細胞の alkaline phosphatase 活性を濃度依存度的に抑制した。これらの結果は、骨芽細胞由来の TGF- β が autocrine 的に同細胞の機能発現を調節していることを示唆するものである。

文 献

- 1) Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bentz, H., Rosen, D. M., McPherson, J. M., Conti, A., Siegel, N. R., Galluppi, G. R. and Piez, K. A.: Cartilage-inducing factor-A: Apparent identity to transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.*, **261**: 5693-5695, 1986.
- 2) Seyedin, S. M., Thomas, T. C., Thompson, A. Y., Rosen, D. M. and Piez, K. A.: Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 2267-2271, 1985.
- 3) Ignatz, R. and Massague, J.: Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **261**: 4337-4345, 1987.
- 4) Wrana, J. L., Maeno, M., Hawrylyshyn, B., Yao, K. L., Domenicucci, C. and Sodek, J.: Differential effects of transforming growth factor- β on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J. Cell Biol.* **106**: 915-924, 1988.
- 5) Tashjian, A. H., Voelkel, E. F., Lassaro, M., Singer, F. R., Roberts, A. B., Derynck, R., Winkler, M. E. and Levine, L.: α and β transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in culture mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 4535-4538, 1985.
- 6) Robey, P. G., Young, M. F., Franders, K. C., Roche, N. S., Kondaiah, P., Reddi, A. H., Termine, J. D., Sporn, M. B. and Roberts, A. B.: Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) *in vitro*. *J. Cell Biol.*, **105**: 457-463, 1987.
- 7) Pfeilschifter, J. and Mundy, G. R.: Modulation of type β transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2024-2028, 1987.
- 8) Pfeilschifter, J., Souza, S. M. D. and Mundy, G. R.: Effect of transforming growth factor- β on osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology*, **121**: 212-218, 1987.
- 9) Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlen, S., Melchor, A., Derynck, R., Sporn, M. B. and Fauci, A. S.: Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.*, **163**: 1037-1050, 1986.
- 10) Lee, G., Ellingsworth, L. R., Gillis, S., Wall, R. and Kincaid, P. W.: β transforming growth factors are potential regulators of B lymphopoiesis. *J. Exp. Med.*, **166**: 1290-1299, 1987.
- 11) Nakamura, T., Sumita, Y., Hirai, R., Yamaoka, K., Kaji, K. and Ichihara, A.: Inhibitory effect of transforming growth factor- β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133**: 1042-1050, 1985.
- 12) Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F. and Sporn, M. B.: Type β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 119-123, 1985.
- 13) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Yamamoto, S. and Kasai, S.: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.*, **23**: 899-901, 1981.
- 14) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S.: *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.*, **96**: 191-198, 1983.
- 15) Morita, H., Noda, K., Umeda, M. and Ono, T.: Activities of transforming growth fa-

- ctors on cell lines and their modification by other growth factors. *Gann*, **75** : 403-409, 1984.
- 16) Pircher, R., Lawrence, D. A. and Jullien, P.: Latent β -transforming growth factor in nontransformed and Kirstein sarcoma virus-transformed normal rat kidney cells, clone 49F. *Cancer Res.*, **44** : 5538-5543, 1984.
- 17) Glisin, V., Crkvenjakov, R. and Byus, C.: Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*, **13** : 2633-2637, 1974.
- 18) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680-685, 1970.
- 19) Hanazawa, S., Ohmori, Y., Amano, S., Hirose, K., Miyoshi, T., Kumegawa, M. and Kitano, S.: Human purified interleukin-1 inhibits DNA synthesis and cell growth of osteoblastic cell line (MC3T3-E1), but enhances alkaline phosphatase activity in the cells. *FEBS Lett.*, **203** : 279-284, 1986.
- 20) Ohmori, Y., Hanazawa, S., Amano, S., Hirose, K., Kumegawa, M. and Kitano, S.: Effect of recombinant interleukin-1 α and interleukin-1 β on cell growth and alkaline phosphatase of the osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Biochim. Biophys. Acta.*, **970** : 22-30, 1988.
- 21) Lowry, O. H., Roberts, N. R., Wu, M., Mixon, W. S. and Crawford, E. J.: The quantitative histochemistry of brain, II. Enzyme measurements. *J. Biol. Chem.*, **207** : 19-37, 1954.
- 22) Petrokofsky, B. and Diegelman, R.: Use of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry*, **10** : 988-994, 1971.
- 23) Petrokofsky, B.: The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **152** : 318-328, 1972.
- 24) De Larco, J. E. and Todaro G. J.: Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75** : 4001-4005, 1978.
- 25) McSheehy, P. M. J. and Chambers, T. J.: Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology*, **118** : 824-828, 1986.
- 26) Thomson, B. M., Saklatvala, J. and Chambers, T. J.: Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J. Exp. Med.*, **164** : 104-112, 1986.
- 27) Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. and Heldin, C. H.: Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β -1. *J. Biol. Chem.* **263** : 6407-6415, 1988.
- 28) Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C. and Sporn, M. B.: Latent transforming growth factor- β from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J. Biol. Chem.*, **263** : 7646-7654, 1988.
- 29) Okada, F., Yamaguchi, K., Ichihara, A. and Nakamura, T.: One of two subunits of masking protein in latent TGF- β is a part of pro-TGF- β . *FEBS Lett.*, **203** : 279-284, 1986.
- 30) Pircher, R., Jullien, P. and Lawrence, D. A.: β -transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136** : 30-37, 1986.
- 31) Lawrence, D., Pircher, R., Krycevmartinerie, C. and Jullien, P.: Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. *J. Cell. Physiol.*, **121** : 184-188, 1984.
- 32) Knabbes, C., Lippmann, M. E., Wakefield, L. M., Flanders, K. C., Kassid, A., Derynck, R. and Dickson, R. B.: Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*, **48** : 417-428, 1987.
- 33) Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assion, R. K., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Goeddel, D. V.: Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cell. *Nature*, **316** : 701-705, 1985.
- 34) Derynck, R. and Rhee, L.: Sequence of the porcine transforming growth factor- β precursor. *Nucleic Acids Res.*, **15** : 3187, 1987.
- 35) Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y. and Goeddel, D. V.: The murine transforming growth factor- β precursor. *J. Biol. Chem.*, **261** : 4377-4379, 1986.
- 36) Miyazono, K. and Heldin, C. H.: Role for carbohydrate structures in TGF- β 1 latency. *Nature*, **338** : 158-160, 1989.
- 37) Lyons, R. M., Oja, J. K. and Moses, H. L.: Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.*, **106** : 1659-1665, 1988.

- 38) Sato, Y. and Rifkin, D. B.: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of latent transforming growth factor- β 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* **109** : 309-315, 1989.
- 39) Lawrence, D. A., Pircher, R. and Jullien, P.: Conversion of a high molecular weight latent β -TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active β -TGF under acidic condition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **133** : 1026-1034, 1985.
- 40) Oreffo, R., Mundy, G. R., Seyedin, S. M. and Bonewald, L. F.: Activation of bone-derived latent TGF-beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158** : 817-823, 1989.
- 41) Noda, M. and Rodan, G.: Type- β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140** : 56-75, 1986.
- 42) Noda, M. and Rodan, G.: Type- β transforming growth factor (TGF- β) regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype-related mRNAs in osteoblastic rat osteosarcoma cells. *J. Cell. Physiol.*, **133** : 426-437, 1987.
- 43) Elford, R., Guenther, H. L., Cecchini, M. G. and Fleisch, H.: Transforming growth factor- β reduces the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells in monolayer culture. *Bone*, **8** : 259-262, 1987.
- 44) Centrella, M., McCarthy, T. L. and Canalis, E.: Transforming growth factor- β is a bi-functional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.*, **262** : 2869-2874, 1987.
- 45) Ignatz, R., Endo, T. and Massague, J.: Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* **262** : 6443-6446, 1986.
- 46) Penttinen, R. P., Kobayashi, S. Bornstein, P.: Transforming growth factor- β increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85** : 1105-1108, 1988.
- 47) Rossi, P., Karsenty, G., Roberts, A. B., Roche, N. S., Sporn, M. B. and Crombrughe, D.: A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor- β . *Cell*, **52** : 405-414, 1988.