

氏 名 塩路 傑

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士乙第434号

学位授与の要件 学位規則第4条第2項

学位授与年月日 平成29年 9月13日

学位論文題目 Extracellular and Intracellular Mechanisms of  
Mechanotransduction in Three-Dimensionally Embedded Rat  
Chondrocytes

(ラット関節軟骨細胞 3次元培養モデルにおける細胞内外でのメカニカルストレスの作用機序についての検討)

審査委員 主査 教授 宇田川 潤

副査 教授 依馬 正次

副査 教授 扇田 久和

## 論文内容要旨

*整理番号	<b>438</b>	(ふりがな) 氏名	しおじ すぐる 塩路 傑
学位論文題目	Extracellular and Intracellular Mechanisms of Mechanotransduction in Three-Dimensionally Embedded Rat Chondrocyte (ラット関節軟骨細胞 3次元培養モデルにおける細胞内外でのメカニカルストレスの作用機序についての検討)		
<p>【目的】                      関節軟骨は一度損傷を受けると再生困難と考えられている。その関節軟骨の変性と破壊が引き起こす変形性関節症が不可逆性の疾患となっている理由に、軟骨細胞の再生や基質産生のメカニズムが未だ不明であることが挙げられる。損傷軟骨の治療に必要な軟骨細胞の基質産生にメカニカルストレスとサイトカインが関与するとされている。適度なメカニカルストレスが関節軟骨細胞の恒常性維持や基質産生において有用であることされているが、メカニカルストレスによるその作用機序における軟骨細胞内のシグナル経路やセカンドメッセンジャーの働きについて明らかにされていない部分が多い。メカニカルストレスと軟骨細胞における細胞内シグナル伝達経路で、mitogen-activated protein kinase (MAPK、MAPキナーゼ)が様々な外的刺激を伝達する重要なシグナル分子の1つとされている。また、サイトカイン・インターロイキン4 (IL-4) に、メカニカルストレスの関節軟骨への作用における関与が指摘されている。今回、細胞内シグナル分子であるMAPKファミリー分子のうち extracellular-regulated kinase (ERK) と c-Jun N-terminal kinase (JNK) と p38 に、並びにサイトカインのうち IL-4 に注目した。軟骨修復において臨床応用されている軟骨細胞3次元培養モデルを用いてメカニカルストレスの軟骨基質産生における IL-4 と MAPK の作用機序について調べた。</p> <p>【方法】                      ラット (5週齢、雄、Wistar rat) から関節軟骨細胞を採取し単離した。単層培養にて増殖後、Type I コラーゲン内に包埋して3次元培養モデルを作製した。</p> <p>(評価)                      リアルタイム PCR (RT-PCR) を用い、追跡遺伝子 Aggrecan (AGC) と Type II collagen (Col2) の遺伝子発現測定を行った。統計学的解析は、one-factor analysis of variance (OVA) with Bonferroni / Dunn <i>post hoc</i> tests (p-values &lt; 0.05) を用いた。</p> <p>(実験 1)                      機械的刺激 (Mechanical stimulation, MS) の負荷 (0.33Hz, 5% cyclic compression, 1 時間) を 3次元培養モデルに加えた。負荷開始 1, 7, 13, 25 時間後 (1h, 7h, 13h, 25h) に評価し、MS 負荷直前と比較した。また各時間で IL-4 の遺伝子発現を RT-PCR にて測定した。</p> <p>(実験 2)                      IL-4 (10 ng/ml) を 3次元培養モデルに添加した。IL-4 負荷後の評価を負荷開始 1, 7, 13, 25 時間後で行い、負荷直前と比較した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。  
 2. ※印の欄には記入しないこと。

別紙様式 3 の 2 (課程博士・論文博士共用)

(続紙)

## 【方法】

## (実験 3)

3次元培養モデルに、濃度調整を行った IL-4 阻害剤 (sIL-4R)、濃度調整を行った 3つの MAPK 阻害剤、ERK 阻害剤 (U0126)、JNK 阻害剤 (SP600125)、p38 阻害剤 (SB203580) を各々添加し同時に MS 負荷した。阻害剤と刺激負荷の評価を負荷開始から 1 時間後に行い、各負荷条件で比較した。

## 【結果】

## (実験 1)

MS 負荷前と比べて、AGC と Col2 の発現は 1h で有意に上昇を認めた。MS の効果は負荷直後のみに限定されていた。7h と 25h で IL-4 の遺伝子発現が確認できた。

## (実験 2)

IL-4 刺激負荷前と比べて、AGC の発現は 7h で有意に上昇を認めた。Col2 は 1h、7h、13h、25h において有意に上昇を認めた。IL-4 はより持続的に効果が現れていた。

## (実験 3)

濃度 100mg/ml より高濃度の IL-4 阻害剤もしくは P38 阻害剤の存在下で、MS 負荷で負荷前と比べ優位に上昇していた AGC と Col2 の発現は、共に有意に下降を認めた。ERK 阻害剤負荷と JNK 阻害剤負荷においては、Col2 の発現は有意な降下は認めず、AGC の発現で有意に下降を認めた。

## 【考察】

ラット関節軟骨細胞 3次元培養モデルにおいて、これまで軟骨細胞の基質合成に有用とされてきたメカニカルストレスによる分化能促進作用が確認できた。軟骨再生に応用した報告がなかったサイトカイン・IL-4 にもメカニカルストレスと同様に関節軟骨細胞の分化能や基質合成への関与が示唆された。メカニカルストレスにより IL-4 遺伝子が発現し、IL-4 阻害剤添加にてメカニカルストレスによる軟骨細胞の基質合成抑制が示されたことより、IL-4 のメカニカルストレスによる関節軟骨細胞の基質合成への関与が考えられた。今回使用した MAPK 阻害剤の中で p38 阻害剤のみが軟骨細胞遺伝子 AGC と Col2 の発現を共に抑制したことより、メカニカルストレスによる軟骨細胞の基質産生や恒常性維持に関与する細胞内伝達経路において p38 が関与と重要な働きを持つ可能性が示唆された。

## 【結論】

ラット関節軟骨細胞 3次元培養モデルにて、メカニカルストレスによる基質合成並びにその作用機序におけるインターロイキン 4 と p38 の関与を示した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	438	氏 名	塩路 傑
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>関節軟骨は一度損傷を受けると再生困難と考えられている。メカニカルストレス (MS) や成長因子は関節軟骨細胞の恒常性維持や基質産生に必要とされているが、詳細な作用機序は未だ明らかとなっていない。本論文では、ラット関節軟骨細胞の3次元培養モデルを用い、軟骨基質合成におけるMSと成長因子の1つであるIL-4の作用、およびその機序について以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) MSにより軟骨基質 Aggrecan (AGC) と Type II collagen (Col2) 遺伝子発現が上昇することから、軟骨細胞分化促進作用を確認した。</li><li>2) MSによりIL-4 遺伝子の発現が上昇した。また、IL-4 刺激によりAGCおよびCol2 遺伝子発現が上昇し、IL-4 阻害剤により本作用が抑制された。</li><li>3) ERK 阻害剤およびJNK 阻害剤はMSによるAGC 遺伝子発現を抑制し、p38 阻害剤はAGC およびCol2 遺伝子両者の発現を抑制した。</li></ol> <p>以上より、MSによる関節軟骨基質合成にはp38を介するシグナル伝達経路が重要と考えられ、さらにIL-4発現を介した経路も基質合成に関与していると考えられる。</p> <p>本論文は、メカニカルストレスによる関節軟骨細胞の軟骨基質合成とその作用機序について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数594字)</p> <p style="text-align: right;">(平成29年 8月28日)</p>			