



Title	The cellular physiology of canine chondrocytes: An in-vitro study on phenotype regulation and characteristics of cell death [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Ekkapol, AKARAPHUTIPORN
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第14270号
Issue Date	2020-09-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/79720">http://hdl.handle.net/2115/79720</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Ekkapol_Akaraphutiporn_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：エカプル アカラプティポーン

審査委員	主査 教授	奥村 正裕
	副査 教授	木村 享史
	副査 教授	木村 和弘
	副査 准教授	小林 篤史
	副査 助教	須永 隆文

### 学位論文題名

The cellular physiology of canine chondrocytes: An *in-vitro* study  
on phenotype regulation and characteristics of cell death

(犬軟骨細胞の細胞生物学的態度：培養環境における分化調節と細胞死に関する研究)

関節軟骨を構成する軟骨細胞は、細胞外基質の代謝を調節することで、硝子軟骨組織の恒常性を維持している。生理的な環境の軟骨細胞の活性は極めて低く、軟骨による細胞外基質の代謝は緩やかに行われている。関節症を発症した関節内では、軟骨細胞代謝は劇的に変化し、細胞外基質代謝のバランスは軟骨基質異化が優勢となる。そのような状況では、軟骨細胞の増殖活性が高くなり、間葉系細胞としての分化度も変化する。特に、そのような環境で軟骨細胞は肥大化し、硝子軟骨としての基質生成機能を失うと考えられている。本研究では、犬の関節軟骨細胞について、細胞代謝の調節や細胞環境の変化によって硝子軟骨としての分化を維持させること、さらに生物学的メディエーターによる軟骨細胞の細胞死を誘導する分子メカニズムを明らかにすることで新たな治療法開発の方向性を示すことを目的とした。

まず、軟骨細胞培養モデルを用いて、細胞増殖と分化調節について検討した。犬関節軟骨細胞を分離し、3種の異なる密度で長期間単層培養した。継代を行わないで長期間単層培養すると、軟骨細胞は早期に最大密度まで増殖し、その後細胞外基質を活発に生成した。最大密度になった培養軟骨細胞の分化度は、硝子軟骨内の細胞とほぼ同様の分化度を示した。これらの結果から、軟骨細胞を、硝子軟骨として最適な分化度にするためには、細胞環境の最適化が必要であることが示唆された。

次に、変形性関節症病態修飾薬（Disease modifying osteoarthritic drugs; DMOADs）として用いられている多硫酸ペントサン（Pentosan polysulfate; PPS）の培養軟骨細胞に対する分化調節と細胞増殖能における効果を評価した。PPSは濃度依存性および経時的に軟骨細胞増殖を抑制した。それらにおける細胞周期を分析した結果、G1期の細胞比が高く、S期の細胞比が低いことが明らかとなった。PPS

で処理された培養軟骨細胞では細胞周期調節遺伝子 *CDK-1* および *CDK-4* の発現が抑制されていたことから、PPS は細胞内のシグナル伝達系への作用を介してこれらの効果を発現していることが示唆された。さらに、PPS の細胞分化調節能や細胞への毒性が低いことも示された。

最後に、軟骨細胞のプログラム細胞死における一酸化窒素 (NO) の効果とその分子メカニズムを検索した。犬培養軟骨細胞をニトロプルシドで処理し、オートファジーとアポトーシスの誘導をそれぞれ検出した。その結果、NO はオートファジー誘導を阻害し、アポトーシスを誘導するが、その反応はカスパーゼ誘導性アポトーシスとは一部一致しなかった。また、NO の細胞障害性は、他の炎症性メディエーターの存在や特定の培養条件時に増強されることが示された。変形性関節症治療の標的として NO を阻害することにより、オートファジーを誘導し、軟骨細胞の生物活性維持に寄与できる可能性があることが示唆された。

以上の結果から、関節症発症の機序である関節軟骨細胞の分化変化状況の再現と態度が明らかとなり、DMOADs である PPS は軟骨細胞の周期を調節することでその軟骨保護効果の一部を誘導することが明らかとなった。また、軟骨における細胞分化状況の変化から誘導される細胞死に対して、その誘導因子の一つである NO を抑制することでオートファジーが誘導されることが示された。つまり、NO の抑制で細胞の生存性が維持される機構が示され、それが変形性関節症の新しい治療の標的となることが示唆された。

このように、本研究では、変形性関節症発症関節における軟骨細胞の態度およびそれに基づいた新しい治療標的が提示され、獣医療の進展に大きく寄与することが示された。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者エカブル アカラプティポーン氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。