HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Sulfation patterns of exogenous chondroitin sulfate affect chondrogenic differentiation of ATDC5 cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	河村, 太介
Description	配架番号：2119
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11595号
Issue Date	2014-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57751
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Kawamura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　河村　太介

学 位 論 文 題 名

Sulfation patterns of exogenous chondroitin sulfate affect chondrogenic differentiation of ATDC5 cells

（コンドロイチン硫酸の硫酸化構造が軟骨前駆細胞株 ATDC5 の分化に及ぼす影響）

【背景と目的】関節軟骨は関節液により栄養されるため血流が乏しく、また組織中に含まれる細胞数が少ないという特徴を持つ。一度損傷された関節軟骨はそうした特徴により組織修復力に乏しく、軟骨の変性が進行し最終的には変形性関節症へと進展してしまう。そうした病態に対する治療法の一つとして組織工学による軟骨再生が挙げられ、これまでに多くの研究がなされている。理想的な軟骨再生を実現するためには使用する細胞（cell）、細胞の足場（scafflod）、効率的な分化を促すための分化増殖因子（signal）が重要な因子として挙げられる。Scaffold として種々の生体材料が開発され、細胞外基質を模倣することでより効率的に軟骨再生を促す試みがなされている。軟骨組織中に多く存在する糖鎖の一種であるコンドロイチン硫酸（CS）により scaffold を修飾し有効であったという報告がある。CS は硫酸化構造の異なる複数の二糖単位から構成された多糖で、その硫酸化の度合いと生理活性との間には密接な関係があり、とくに多硫酸化構造をもつ CS がヘパリン様の生理活性を持つことが分かってきた。しかし、これまで scaffold への導入が試みられた CS はモノ硫酸のみである。本研究の目的は、内軟骨性骨化を再現するモデルとして使用される軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞を用い、その軟骨分化過程における細胞自身が基質中に賛成する CS の硫酸化構造を調査すること、また、CS の硫酸化構造の違いが ATDC5 の軟骨分化に及ぼす影響を明らかにすることである。

【材料と方法】ATDC5 細胞をインスリン存在下に分化誘導後、0、7、21 日目に細胞から糖鎖を抽出、コンドロイチナーゼ ABC で二糖単位まで消化した。酵素消化物を蛍光試薬 2-アミノベンズアミドで標識した後、陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーを行い CS の二糖組成を分析した。次に、モノ硫酸が大部分を占める CS-A、CS-C、二硫酸化構造を多く含む CS-E、といった硫酸化構造の異なる 3 種類の CS を ATDC5 細胞の分化誘導培地へ添加し、増殖性・分化に及ぼす影響を調べた。CS を加えない群をコントロール群とし、CS-A、CS-C、CS-E 添加群と比較した。増殖性は分化誘導後 4、7、21 日目に Cell Counting Kit-8 を使用し評価した。分化に及ぼす影響として、細胞外基質産生をアルシアンブルー染色により分化誘導後 21 日目に評価した。分化が骨化まで進行している可能性を考慮し、骨分化の指標であるアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の評価を ALP 活性測定キットにより分化誘導後 21 日目に行った。また分化誘導後 4、14 日後の細胞から RNA を抽出し、real-time RT-PCR で軟骨分化に関する遺伝子（*col2a1, col10a1, aggrecan, sox9*）の発現を評価した。さらに軟骨分化の指標となる 2 型コラーゲンの細胞外基質中でのタンパク発現を、分化誘導後 14 日の細胞についてコラーゲン測定キットを用い ELISA で定量評価した。統計学的解析は Dunnet 法による分散分析で行った。

【結果】二糖組成解析の結果、ATDC5 細胞が発現する CS の総量は分化が進むにつれて増加した。硫酸化構造の構成比も分化に伴って変化したが、全過程を通じて *N*-アセチルガラクトサミンの 4 位が硫酸化されたモノ硫酸化構造が 76%から 89%と大部分を占めていた。4 位、6 位が硫酸化された二硫酸化構造も 0.7%から 1.7%とわずかではあるが存在した。増殖性試験では、分化誘導後 4 日では各群間で差を認めなかったが分化誘導後 7、14 日では CS-E 群で増殖性が有意に低下した。アルシアンブルーの染色性は CS-E 群で、CS を添加していないコントロール群に比べ有意に、濃度依存性に増加した。一方、ALP 活性は CS-E により有意に抑制された。軟骨分化関連遺伝子の発現は、CS-E 群で、分化誘導後 4、14 日ともに 10 型コラーゲンを除く全ての遺伝子の発現がコントロール群と比べ有意に増加した。ELISA では CS-E 群で 2 型コラーゲンの発現が他の群に比べ有意に増加していることが確認された。

【考察】内軟骨性骨化を再現するモデルである細胞株 ATDC5 はその分化が進むにつれより多くの CS を細胞外基質中に産生していた。その二糖組成はモノ硫酸が多くを占めたが二硫酸化構造もわずかに産生されており、それぞれの硫酸化構造の割合は分化に応じて変化していた。ヒトの軟骨組織中に含まれる二硫酸化構造は大部分が 4 位および 6 位が硫酸化されたモノ硫酸であるが､2 硫酸化あるいはそれ以上の多硫酸化構造も全体の 1%以下ではあるが産生されているという報告がある。しかしながらその高硫酸化された CS の軟骨組織中での役割については解明されていない。二硫酸化構造を多く含む CS-E は ATDC5 の細胞増殖を抑制し、軟骨分化を強く促進していた。一方で 10 型コラーゲン遺伝子の発現や ALP 活性は増加しておらず、軟骨としての特性を維持する作用を有していると考えられた。これらの結果から軟骨組織の細胞外基質に含まれる二硫酸化構造、なかでも CS-E に多く含まれる 4 位、6 位が硫酸化された構造は軟骨分化において重要な役割を果たしている可能性がある。

CS-E や CS-D といった二硫酸化構造はある種の成長因子との結合親和性が高いことが知られており、マウス海馬細胞の神経突起を伸長させる等、ヘパリン様の生理活性を示すとの報告がある。特に CS-E は軟骨分化においても必須の成長因子である BMP-4 と結合し骨芽細胞の分化を促進することが知られている。本研究で認められた CS-E が ATDC5 細胞の軟骨分化を促進する作用も、BMP-4 のような軟骨分化にかかわる成長因子の作用を CS-E が増強することで生じた可能性がある。作用機序の解明については今後さらなる研究を要する。

CS を scaffold に組み込むことで軟骨分化が促進されたという報告はあるが、それらはいずれもモノ硫酸を使用しており、二硫酸化構造を使用した例は無い。今回の研究から CS-E がもつ二硫酸化構造は軟骨再生を目指すうえで scaffold の有用な修飾因子となる可能性が示唆された。

【結論】ATDC5 細胞はその細胞外基質中に様々な硫酸化構造を持つ二糖を産生していた。外因性に添加した CS の硫酸化構造の違いは ATDC5 細胞の増殖・分化に異なる影響を及ぼしていた。なかでも、二硫酸化構造を多く含む CS-E は ATDC5 細胞の軟骨分化を有意に促進していた。CS-E に含まれる硫酸化構造は軟骨再生を目指す scaffold において有効な修飾因子となる可能性がある。