



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 河 村 太 介

主査 教授 生 駒 一 憲
審査担当者 副査 教授 山 本 有 平
副査 教授 岩 崎 倫 政

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）

コンドロイチン硫酸 (CS) はグリコサミノグリカンの一種で結合組織中に普遍的に存在する多糖である。CSを構成する二糖は様々な部位に硫酸基による修飾を受ける。多くは一硫酸化された構造であるが中には二硫酸化構造をとるものも存在し、CS多糖中に含まれる2糖の硫酸化の様式や度合いは生物種や組織によって異なることが報告されている。CSの硫酸化構造の違いによって生理活性作用が異なることが神経細胞において明らかとなった。しかしCSが大量に存在する軟骨組織においてCSの硫酸化構造の違いがおよぼす影響はこれまで注目されていない。そこで本研究ではCSの硫酸化構造が軟骨分化の過程で変化し、かつ硫酸化構造の違うCSを外因性に投与することで軟骨分化に影響がでるとの仮説が立てられた。本研究の目的は軟骨前駆細胞株ATDC5が産生するCSの硫酸化構造を分化段階ごとに評価すること、外因性に投与されたCSの硫酸化構造の違いがATDC5の増殖・分化に及ぼす影響を調査することとされた。ATDC5を分化誘導し各分化段階の細胞から糖鎖を抽出し陰イオン交換HPLCにより二糖構造の評価が行われた。その結果、ATDC5が産生するCSには4種類の異なる二糖構造が含まれることが分かった。その内硫酸化された構造は4位あるいは6位が一硫酸化された構造と、4位、6位が二硫酸化された構造の3つであった。続いてそれらの各構造を多く含むCS-A、CS-C、CS-Eという3種類のCSを培養液中に添加しATDC5の増殖、分化に及ぼす影響が調べられた。増殖性は分化が進むにつれCS-Eにより有意に低下した。分化について、細胞外基質産生をしめすアルシアンブルー染色、リアルタイムRT-PCR法による軟骨分化関連遺伝子（II型コラーゲン、アグリカン、sox9）発現の評価、II型コラーゲンタンパクのELISAによる定量では、いずれもCS-E群のみで有意に増強される結果が示された。一方で軟骨分化の後期分化を示すアルカリフォスファターゼ活性はCS-E群ではむしろ抑制されていた。以上の結果から、軟骨分化過程においてATDC5が産生する硫酸化構造は変化すること、外因性に投与した硫酸化構造の違うCSはATDC5の分化、増殖に影響を与え、中でも二硫酸化構造を多く含むCS-Eがその分化を有意に増強させる効果を持つことが確認された。

審査にあたり、まず副査の山本有平教授から、1. 高い生理活性を示した二硫酸化構造が存在比としては極めて低い割合を占めた点について、2. CS-Eが細胞増殖を抑制したことについて、3. CS-Eを再生医療に応用するとした場合、どういう位置づけになるかについて質問があ

った。申請者は各質問に対し、1. わずかにしか存在しないためこれまで注目されていなかったが、その構造に生理活性があることが軟骨以外の組織で明らかになってきた経緯を説明し、高い活性を持つがゆえにその産生が低い割合にとどめられている可能性を述べた。2. 軟骨細胞は分化が進むにつれ増殖を停止する傾向を示すことから、細胞増殖の低下はむしろ分化が強く促進されている結果として肯定的にとらえていると回答した。3. CS-Eは成長因子の効果を促進する能力を持つことが推察されるため、scaffoldとsignalの二面性を備えた位置づけであると回答した。次に副査の岩崎倫政教授からは、CSの硫酸化障害が生じた場合に起こる影響として現在明らかになっている知見について質問があり、申請者は代表的な例として硫酸化酵素の遺伝子異常が骨軟骨異形成症を引き起こすことが報告されていると回答した。最後に主査の生駒一憲教授から、1. CS-Eを再生医療に応用していくに辺りどういった課題があるか、2. 細胞培養段階において力学的負荷をかけるなどの試みは行われているかについて質問があり、申請者は1. 再生医療にかかわる細胞腫やscaffoldの最良の条件を見出すことが重要であること、CS-Eの役割はそれらの上で成り立つものであると回答した。また、2. 本研究においては行われていないが、軟骨再生領域での試みとして、様々な力学的負荷の影響や酸素濃度などの至適な培養条件を探る研究についての報告があると回答した。

この論文は、Journal of Orthopaedic Scienceにおいて高く評価され、今後の作用機序の解明に向けた基礎的な研究成果と軟骨再生医療分野への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、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。