HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the chondrogenic differentiation independent of insulin [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	後藤, 佳子
Description	配架番号：2149
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11667号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59089
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Keiko_Goto_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　後　藤　佳　子

審査担当者
主査　教授　岩崎　倫政
副査　教授　佐邊　壽孝
副査　教授　三輪　聡一
副査　教授　藤田　博美

学 位 論 文 題 名

Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the chondrogenic differentiation independent of insulin
（合成 PAMPS ゲルは ATDC5 細胞における BMP/Smad シグナル伝達経路を活性化し、それはインスリン非依存性軟骨分化において重要な役割を果たす）

現在の関節軟骨治療には様々な限界があり、より優れた軟骨再生法の開発が望まれるが、申請者の属する研究グループは、独自に開発した PAMPS/PDMAAm DN ゲル（以下 DN ゲル）を兎膝関節の軟骨欠損部に埋植することにより、硝子軟骨が自然再生することを発見し、細胞培養を要しない新しい軟骨再生治療法の可能性を示した。このメカニズムとして、DN ゲルの 1 構成要素である PAMPS ゲルが in vitro においてインスリン非添加培養条件でも ATDC5 細胞を軟骨分化誘導させることから、軟骨分化誘導能を担う主体ゲルであることを明らかにしてきた。そこで申請者は、PAMPS ゲルによる ATDC5 細胞の軟骨分化誘導過程で特異的に活性化されるシグナル経路を、インスリン依存性軟骨分化誘導系と比較することによって明らかにすることを目的とし①PAMPS ゲル上で維持培地を用いた条件（PAMPS）、②ポリスチレン上でインスリン添加培地を用いた条件（PS-I）③ポリスチレン上で維持培地を用いた条件（PS）の 3 条件において ATDC5 細胞を培養し、PAMPS と PS-I の軟骨分化誘導能の違いを比較した。次いで PAMPS で有意に発現しているシグナルをマイクロアレイ解析結果に基づいた解析法により網羅的に探索した。さらにウェスタンブロット法を用いて軟骨分化誘導に関するシグナルの主要な分子の中から特異的にリン酸化している分子を抽出し、対象分子となった Smad1/5 のリン酸化阻害によって軟骨分化に与える影響を検討した。PAMPS では早期より、過去の報告から軟骨分化形態とされる細胞凝集体を形成し、2 型コラーゲンやアグリカンの有意に高い mRNA の発現を示した。遺伝子解析では、PAMPS では PS-I と比較して TGF-beta/BMP シグナルの遺伝子セットが有意に高く発現変動がみられるシグナルとして同定され、これに属する Smad1/5 のリン酸化や BMP4 mRNA の発現が高いことが明らかとなった。PAMPS における初期の Smad1/5 のリン酸化を阻害すると培養 13 日目の 2 型コラーゲンやアグリカンの mRNA の発現が有意に抑制されることが明らかとなり、PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導ではインスリン依存性シグナル機構と異なるシグナルが存在し、Smad1/5 のリン酸化を介した BMP/Smad シグナルの活性化が重要であることを示唆した。

審査にあたり、まず副査の佐邊壽孝教授から、PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導を検討する場合、骨髄系間葉系幹細胞を用いるなど、生体内で埋植した際の環境を模倣した研究デザインが重要であるとの指摘を受け、申請者は、本研究では過去の研究の検証とその現象

に対するメカニズムの解析を目的としたためATDC5細胞を用いたが、今後、他の細胞を用いた研究を検討すると答えた。副査の三輪聡一教授からは、PAMPSゲル上のATDC5細胞において、染色などによる組織学的軟骨分化形態の証明がなされているかとの指摘に対し、申請者は､染色法によってII型コラーゲンやグリコミノグリカンが発現していることが過去の研究によって明らかとなっていると回答した。また、軟骨に特異的な分化マーカー以外の組織マーカーの発現状況について問われ、申請者は、予備実験においてⅠ型コラーゲンやRUNX2の発現をリアルタイムPCRで確認した結果､これらのmRNAはPAMPSにおいて経時的な増加を認めず、RUNX2はPSと比較して低い発現量を示したと答えた。副査の藤田博美教授から、今回対象とした分子や遺伝子解析のなかで、time zeroや培養条件が修飾される前のATDC5細胞の発現レベルについて問われ、申請者は、今後継続される研究の中で細胞のベースラインとなる発現検討を行うと答えた。最後に、主査の岩崎倫政教授から、PAMPSゲル上の凝集体形態から特異的な細胞間シグナルが作用している可能性が示唆され、細胞間の刺激により軟骨分化を促進するマイクロマス培養法を比較対照とすることによって、より特異的なシグナルを検出できると考えるがその見解についての問いに申請者は、本研究では過去の実験に基づいた分子メカニズムの解明を目的としたため、過去の研究デザインと同様の比較対照を用いたが、細胞-基質間のみならず細胞-細胞間のシグナルがBMP/Smadシグナルより早期に活性している可能性があり､今後検討していきたいと答えた。

この論文はPAMPSゲルを構成要素とするDNゲルを軟骨欠損部に埋植することによって硝子軟骨の再生を誘導する、細胞培養を用いない新しい治療戦略の有効性を確立するための重要な情報となる。

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充分な資格を有するものと判定した。