HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Disease Modifying Osteoarthritic Drug, Pentosan Polysulfate Sodium Modulates Cytokine-Induced Osteoarthritic Changes and Promotes Articular Cartilage Tissue Regeneration in vitro [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	BWALYA, EUGENE CHISELA
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12848号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67871
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	EUGENE_CHISELA_BWALYA_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（獣医学）　　氏名：EUGENE CHISELA BWALYA

審査委員

主査	教　授	奥　村　　正　裕
副査	教　授	大　橋　　和　彦
副査	准教授	細　谷　　謙　次
副査	講　師	長谷部　　理　絵

学位論文題名

Disease Modifying Osteoarthritic Drug, Pentosan Polysulfate Sodium Modulates Cytokine-Induced Osteoarthritic Changes and Promotes Articular Cartilage Tissue Regeneration *in vitro*
(変形性関節症病態修飾薬である多硫酸ペントサンは、関節軟骨におけるサイトカイン誘導性関節症病態を変化させ、培養関節軟骨の再生を刺激する)

多硫酸ペントサン（Pentosan polysulfate；PPS)は、ヨーロッパ・ブナ *Fagus sylvatica* から抽出された半合成多硫酸化多糖であり、ヒトでは抗凝固剤や間質性膀胱炎の治療薬として、犬および馬では変形性関節症(osteoarthritis；OA）の治療薬として使用されている。PPS の抗炎症作用発現機序や OA における治療標的については不明な部分が多い。本研究の目的は、犬培養関節軟骨細胞（CACs）におけるサイトカイン誘導性 iNOS, c-Jun および HIF-α アイソ型発現における PPS の効果、平板培養により脱分化した CACs の再分化を誘導する PPS の軟骨保護効果、および犬骨髄由来間葉系幹細胞（cBMSCs）の *in vitro* 軟骨分化誘導における PPS の効果を分析し、PPS の変形性関節症病態修飾薬としての効果発現機序の一部を明らかにすることである。

まず、OA 発症関節軟骨の病態発現に関わる IL-1β 誘導性 iNOS, c-Jun および HIF-1α の mRNA 発現効果および iNOS タンパク発現における PPS の阻害効果を検討した。CACs は、IL-1β, TNF-α あるいは LPS 単独、IL-1β+TNF-α、IL-1β+LPS の iNOS タンパク誘導には抵抗性を示し、TNF-α+LPS および IL-1β+TNF-α+LPS には抵抗性を示さなかった。前者は iNOS の OA 継続効果に対する CACs の保護機構の存在を示唆している。PPS は、それらによって制限を受けなかった IL-1β+TNF-α+LPS 誘導性 iNOS タンパク発現を有意に減少させた。

次に、軟骨細胞自家移植を軟骨組織再生および OA による軟骨欠損部修復に適用できるようにするために、*in vitro* 平面培養時に脱分化された軟骨細胞を再分化させうることが長年期待されてきた。ここでは、平面培養された初代 CACs を初回継代時にアルギン酸ビーズ内に埋没し、20%PPS 添加 DMEM 培養液で 18 日間培養したところ、II 型コラーゲン、アグリカン、プロテオグリカン蓄積が確認され、それらでは、I 型および X 型コラーゲンの発現が抑制された。また、酸素存在下で HIF-1α および HIF-2α のタンパク発現が初めて証明され、アルギン酸ビーズ内で培養された軟骨細胞は HIF-α アイソ型発現がタンパクレベルで安定していることが示唆された。以上の結果から、PPS は硝子軟骨としての phenotype 維持に貢献し、これは OA 発症関節における軟骨保護効果誘導と関連していると考えられた。

最後に、アルギン酸ビーズ内培養および micromass 培養（MMC）cBMSCs の軟骨分化における PPS と多硫酸化グリコサミノグリカン（polysulfated glycosaminoglycan; PSGAG)の効果について検討した。PPS と PSGAG のアルギン酸ビーズ内培養において cBMSCs の軟骨分化誘導における相乗効果はみられず、PSGAG は I 型コラーゲンの遺伝子発現を誘導した。PSGAG が MMC 内の cBMSCs の線維芽細胞様細胞への分化を増強したのに対し、PPS は同様の cBMSCs の軟骨分化を増強した。これらの結果は、類似の多硫酸化多糖の中で PPS の特性、特に硝子軟骨誘導効果を特異的に有する可能性を示唆している。

以上の所見から、PPS は OA の新しい治療標的である iNOS に対して有効に抑制的に作用し、CACs や cBMSCs に対して軟骨分化を促進させる効果を有することから、困難であった OA の軟骨再生に対して将来的に有効に活用されうることが示唆された。よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者 EUGENE CHISELA BWALYA 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。