HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	軟骨細胞の力学的ストレス応答におけるGlycosphingolipidsの機能解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	松原, 新史
Description	配架番号：2410
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13031号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70835
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shinji_Matsubara_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　松原　新史

学 位 論 文 題 名

軟骨細胞の力学的ストレス応答における Glycosphingolipids の機能解析
（Functional analysis of glycosphingolipids in response of chondrocytes under mechanical stress condition）

【背景と目的】

変形性関節症（Osteoarthritis、以下 OA）は最も一般的な関節疾患であり、炎症とそれに付随する関節構造の変化が疼痛と運動機能低下を引き起こす。OA の病態は様々な要因が重なり合っているとされており、その中でも力学ストレスは関節変性を引き起こす最も重要な要因の 1 つである。

スフィンゴ糖脂質（Glycosphingolipids; 以下 GSLs）は脊椎動物の細胞膜に広く存在し、セラミドアンカーと共に細胞膜外葉に組み込まれている。ラフト構造を構成する脂質の性質が細胞膜の力学的性質に影響を及ぼすとする報告や GSLs が細胞骨格の 1 つである中間径フィラメントに影響を及ぼすとする報告より、細胞膜上に存在する GSLs が細胞骨格のおける構造変化を介して軟骨細胞の力学的性質に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。さらに GSLs は細胞内シグナルのトリガーとなる細胞膜上の受容体と相互に作用し、ストレス応答の重要な調節因子であると報告されている。我々は GSLs のノックアウトマウスを作成し、GSLs を欠損させることで加齢による OA 進行が助長されることを、そして IL-1α 刺激による軟骨細胞の MMP-13 の発現上昇やアポトーシスが促進され OA 進行が助長されることを報告した。また GSLs が欠損すると過度な力学ストレスによる OA 進行が助長されることを示し、力学ストレスによる OA 発症に GSLs が関与しているのではないかと考えた。

以上より本研究の仮説を GSLs が軟骨細胞の力学的性質と力学ストレスに対する生理的応答を調節しているとし、目的を軟骨細胞の力学的性質と力学ストレス応答における GSLs の機能的役割を明らかにすることとした。

【対象と方法】

軟骨特異的 GSLs を欠損させたマウス(Ugcg 群; Col2-Cre Ugcg-/-)と、そのコントロールとして Flox マウス（Flox 群; $Ugcg^{loxP/loxP}$）を用いた。各マウス由来の軟骨細胞に対してアクチン染色により細胞骨格を、Micropipette Aspiration 法により弾性率を評価した。また Wild Type（WT）マウス軟骨細胞をコラーゲンタイプ 1 ゲル内に包埋し、伸展負荷装置（ST-140）を用いて Cyclic Tensile Strain（CTS）を負荷する三次元培養下力学負荷モデルを作成した。CTS の頻度を 1 Hz、強度を 5%、10%、16%、時間を 3 h、24 h に設定した。伸展負荷に伴う細胞変形を顕微鏡下に観察し縦横比で評価し、CTS 負荷後に Col2a1,

Aggrecan, ADAMTS5, MMP13 の遺伝子発現を調査した。次に本モデルを用いて Flox 群と Ugcg 群に対して同じ条件の CTS を負荷し、同様に遺伝子発現を評価した。また、time lapse imaging を用いて、力学負荷前後での細胞内 Ca シグナル（Ca^{2+} oscillation ratio）を評価した。

【結果】

アクチン染色による細胞骨格と Micropipette Aspiration 法による弾性率の評価において、Flox 群と Ugcg 群の間で有意な差を認めなかった。WT マウス軟骨細胞に用いて行った伸張負荷の際の細胞変形を表す縦横比は、0%と比較して 10%以上の伸張負荷により有意に増大した。また、遺伝子発現では、5%CTS 負荷により Col2a1 の発現が上昇し、ADAMTS-5 と MMP-13 の発現が低下した。一方、10% CTS 負荷により Col2a1、MMP-13 の発現が低下した。さらに 16% CTS 負荷により Aggrecan の発現が低下し、ADAMTS-5 と MMP-13 の発現が上昇した。上記モデルを用いた Flox 群と Ugcg 群の遺伝子発現評価では、10%CTS 負荷において Ugcg 群で ADAMTS-5 と MMP13 の発現が上昇した。さらに 16%負荷において Ugcg 群で Col2a1 と Aggrecan の発現が減少する傾向を示した（P=0.0765、P=0.057）。また、Ca シグナル（Ca^{2+} oscillation ratio）評価では、10%以上の負荷において Ugcg 群で有意に増加した。

【考察】

アクチン染色による細胞骨格と軟骨細胞の弾性率の結果より GSLs は軟骨細胞の力学特性に影響を及ぼさないことが示された。一般的に生体内において適度な力学ストレスは軟骨保護作用を、過度な力学ストレスは軟骨変性作用を示すと言われている。本実験で作製した 3 次元培養下力学負荷モデルにおいて、5%CTS 負荷条件では軟骨保護作用を、10%CTS 負荷条件では軟骨保護作用と変性作用と双方を、16%CTS 負荷条件では軟骨変性作用を示した。従って、我々の 3 次元培養モデルが軟骨保護作用を示す適度な力学ストレス環境と軟骨変性作用を示す過度な力学ストレス環境という異なった 2 つの環境における軟骨細胞の応答性を評価できることが示唆された。静置培養環境において GSLs 欠損は軟骨細胞の力学特性だけでなく遺伝子発現や Ca シグナルにも影響を及ぼさなかった。一方、力学ストレス環境において GSLs 欠損は 10%と 16% CTS 負荷によりそれぞれ catabolic factor が上昇し、anabolic factor が低下し、10%以上の負荷で Ca シグナル（Ca^{2+} oscillation）が増加した。以上の結果より GSLs が欠損すると、強度の強い力学ストレスに対して Ca シグナルを介して過剰に応答し、軟骨変性作用が増強することが示唆され、この過剰応答性が OA 進行を助長させるのではないかと考えられた。言い換えると、細胞膜上に存在する GSLs は Ca シグナルを介して軟骨細胞の力学ストレス応答を制御し、軟骨組織の恒常性を維持していると考えられた。

【結論】

スフィンゴ糖脂質が Ca シグナルを介して軟骨細胞の過度な力学ストレスに対する生理的な応答を制御することに深く関わっていることが示唆された。このスフィンゴ糖脂質による制御機構は軟骨組織の恒常性維持に重要であると考えられ、スフィンゴ糖脂質が OA 治療における標的分子となり得ることを示している。今後は Ca シグナルを介した制御機構の詳細なメカニズムについてさらに研究を進めいきたいと考えている。