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_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　松原 新史

主査　教授　大場雄介
審査担当者　副査　教授　岩永敏彦
副査　教授　畠山鎮次
副査　教授　田中真樹

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）

申請者は，GSLs が変形性関節症（osteoarthritis, OA）の軟骨変性過程において果たす役割の生物学的機序の解明を目指し，スフィンゴ糖脂質（glycosphingolipid, GSLs）合成酵素遺伝子欠損マウスの軟骨細胞の力学的性質と，力学負荷に対する細胞応答を評価した。軟骨特異的 GSLs 欠損マウス（Col2-Cre Ugcg$^{-/-}$; Ugcg 群）およびコントロールマウス（Ugcg$^{loxP/loxP}$; Flox 群）から単離した軟骨細胞に対し，ファロイジンによるアクチン染色を用いた細胞骨格の評価と，micropipette aspiration 法よるヤング率の評価を行い，両群で差を認めないことを示した。また，三次元培養下での力学負荷モデルを用い，各マウス由来軟骨細胞に cyclic tensile strain（頻度：1 Hz，強度：5%，10%，16%，時間：3 時間，24 時間）を加えた後，II 型コラーゲン α1 鎖（Col2a1）, Aggrecan, A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5（ADAMTS5）, matrix metalloprotease 13（MMP13）の mRNA 発現を評価した。その結果，10%負荷で軟骨 catabolic factor である ADAMTS5 と MMP13 の mRNA 発現が増強し，16%負荷では anabolic factor である Col2a1 と Aggrecan の mRNA 発現が抑制された。また，time-lapse imaging を用いて力学負荷後細胞内 Ca^{2+}濃度を評価した。Ugcg 群における力学負荷後の細胞内 Ca^{2+}濃度のオシレーションは，Flox 群と比べ 10%以上の負荷で有意に増加した。以上より，GSLs 欠損マウス由来軟骨細胞は，静止状態での細胞膜と細胞骨格の力学特性にはコントロールと差がないが，10%以上の力学負荷環境下においては catabolic factor の増強，anabolic factor の抑制，細胞内 Ca^{2+}濃度上昇を認めた。すなわち，GSLs 欠損マウスでは，力学負荷に対する軟骨細胞の過剰応答により軟骨変性が増悪すると考えられた。

審査にあたり副査の岩永教授より，緒言においてGSLsと中間系フィラメントの関連を報告した文献を引用しているにもかかわらず，なぜ実験においてはアクチンフィラメントを評価したのかとの質問があった。申請者は，細胞の力学的性質，いわゆる物性値を調査するには中間系フィラメントよりアクチンフィラメントの評価が適切であると回答した。また，軟骨細胞の主な中間系フィラメントは何かという質問に対し，ビメンチンと回答した。

次に副査の畠山教授より，GSLs欠損マウスの遺伝子欠損をサザンブロットで確認したか否かについて質問があり，評価はPCRとmRNA発現のみでサザンブロットは行っていないと回答した。Ca^{2+}濃度測定の実験で，Ca^{2+} influxはどの程度の時間で定常状態に戻るのかという質問があり，力学負荷後20分程度経過すると刺激前の状態に復帰すると回答した。

続いて副査の田中教授から，遺伝子発現とCa^{2+}濃度測定の実験系で力学負荷の時間が異なる理由について質問があった。申請者はCa^{2+}濃度測定の時間は過去の報告を参考に設定し，遺伝子発現実験の時間は，長い時間をかけて徐々に変性が進行するOAの病態を模倣する目的で，より長い時間に設定したと回答した。また，今後行う予定のin vivoでの補充実験について，細胞膜上のラフトに存在する糖脂質を関節中に補充しても，機能を発揮するとは思えず，実験を行う意義はあるのかと質問があった。申請者は，同じ研究グループに所属する他の研究者が行ったin vivoでのガングリオシド補充の予備実験で，欠損させた糖脂質を全て補充した時のみMMP13の発現が低下する結果が得られており，今後メカニズムの検討が必要であるものの，in vivoでの検証実験を行う意義はあると思われると回答した。

最後に主査の大場教授より，再度Ca^{2+}濃度測定実験の時間設定に関する質問があった。申請者は，過去の報告に基づき1秒間，10秒間，1分間，5分間などの異なる時間設定の結果を予備実験で検討しており，1秒間では他との違いがあるが，10秒以上では同様の結果が得られることが確認されたことから，10秒間に設定したと回答した。また，軟骨組織を考えるとcompressive loadの方が妥当と考えられるが，なぜ本研究ではtensile loadを採用したのか，との質問があった。申請者は，3次元培養下におけるポアソン比を考えると，計算上はtensile loadと同時にその50%程のcompressive loadも細胞へ負荷されること，加えてOAをmimicする目的でcompressive loadよりもcatabolicに作用するといわれるtensile loadを選択したと回答した。

この論文は軟骨細胞の力学的ストレス応答におけるGSLsの機能の一端を明らかにした有用な研究であり，GSLsが軟骨細胞の力学応答に関与することを示した。今後，メカニズムについての更なる詳細な研究が必要ではあるものの，本論文がGSLsをターゲットとしたOAの治療法確立の一助になりえると考えられた。

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。