

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	角 千佳子
学位授与の条件	学位規則第4条(第1)・2項該当		
論文題目 軟骨細胞における Semaphorin 3A の役割			
論文審査担当者			
主 査	教授 兼松 隆	印	
審査委員	教授 杉山 勝		
審査委員	教授 津賀 一弘		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>Semaphorin 3A (Sema3A) は、神経軸索の方向性を決める神経ガイダンス因子として同定された分子群である。Sema3A は、代表的な分泌型セマフォリンのひとつで、Neuropilin-1 (NRP-1) を介して Plexin-A1 (PLXA1) へ結合し、相互作用により細胞内シグナル伝達系を活性化することが明らかとなっている。Sema3A の機能は、神経系のみならず、これまでに免疫系、心血管系、呼吸器系、さらに、器官形成や腫瘍形成、骨代謝においても重要な役割を果たすことが認められている。近年、軟骨細胞において NRP-1 と PLXA1 の存在が明らかとなったが報告数は少なく、Sema3A の機能的役割との関連においても不明な点が多い。そこで、本研究では、培養軟骨細胞 ATDC5 (マウス胚性腫瘍細胞由来クローン化細胞株) を用い、軟骨分化に対する Sema3A の役割と過度な周期的伸張刺激 (CTS: cyclic tensile strain) により生じる炎症に対する Sema3A の役割について検討を行った。</p> <p>培養軟骨細胞 ATDC5 の分化に対する Sema3A の影響についての検討では、まず ATDC5 における軟骨分化マーカー Type II collagen、Aggrecan、Type X collagen の経時的な遺伝子発現変化を real-time PCR 解析を行って、ATDC5 軟骨細胞分化過程を検討した。そして、分化誘導開始 7 日後に基質形成期へ、17 日後には肥大型へ移行することを示した。また、Sema3A、NRP-1、PLXA1 の発現の経時的変化を遺伝子解析および western blot 解析を行って、これらタンパク質が協調的な発現変化を示すことを明らかにした。次に、Sema3A 添加についての影響を検討するために、分化誘導 14 日後の ATDC5 に対し Sema3A を、1, 10, 100 ng/ml の濃度となるよう添加し、24 時間後の軟骨分化マーカーの遺伝子発現について real-time PCR 解析を行った。Sema3A 添加により、軟骨分化マーカーおよび分化制御因子の遺伝子発現量は有意に亢進した。引き続き、Sema3A 遺伝子ノックダウンの影響について検討するために、分化誘導 14 日後の ATDC5 に対し、Sema3A siRNA を導入し、24 時間後の軟骨分化マーカーの遺伝子発現について real-time PCR 解析を行った。Sema3A ノックダウンにより、軟骨分化マーカーの遺伝子発現量は有意に抑制されたが、その他の分化制御因子の発現量に有意な差を認めなかった。</p> <p>ATDC5 における過度な周期的伸張刺激 (CTS) 時の Sema3A の影響についての検討では、Flexcell Strain Unit® (FX-2000, Flexcell Corp) を用い、0.5 Hz、10% の CTS を分化誘導 14 日後の ATDC5 に負荷して解析を行った。CTS に対する Sema3A とその受容体および炎症関連因子の遺伝子発現の経時的変化について、real-time PCR 解析を行ったところ、Sema3A とその受容体の遺伝子発現量および炎症関連因子の遺伝子発現量に経時的変化を認めた。次に、CTS 負荷時の Sema3A の影響について検討するため、分化誘導 14 日後の ATDC5 に対し、Sema3A を 1, 10, 100 ng/ml の濃度となるよう添加し、0.5 Hz、10% の CTS を負荷した。添加後 3 時間の炎症関連因子の遺伝子発現について real-time</p>			

PCR 解析を行った。また、添加後 24 時間の IL-1 β および MMP13 のタンパク質発現について、western blot 解析を行った。CTS により亢進した炎症関連因子の遺伝子発現および IL-1 β 、MMP13 のタンパク質発現は、Sema3A の添加により抑制された。また、添加後 1 時間の ERK、NF- κ B、AKT のリン酸化について western blot 解析を行い、シグナル伝達経路について解析したところ、CTS により亢進した ERK、NF- κ B、AKT のリン酸化は、Sema3A の添加により濃度依存的に抑制された。

以上の結果より、本論文は、ATDC5 を用いた軟骨細胞分化モデルにおいて Sema3A が軟骨分化過程を制御している可能性を示した。さらに Sema3A は、ERK、NF- κ B および AKT シグナル伝達経路を介する炎症関連因子の産生を抑制することから、伸展刺激で軟骨細胞に惹起される炎症反応に対し、Sema3A が抗炎症作用を持つという新たな知見を示した。

よって審査委員会委員全員は、本論文が角千佳子に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	角 千佳子
学位授与の条件	学位規則第4条(第1)・2項該当		
論文題目 軟骨細胞における Semaphorin 3A の役割			
最終試験担当者			
主 査	教授 兼松 隆	印	
審査委員	教授 杉山 勝		
審査委員	教授 津賀 一弘		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年11月15日の第5回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成30年2月6日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 ATDC5 に対して行った過度な伸展刺激の定義と根拠について 2 ATDC5 における適切な伸展刺激負荷時の基質形成に対する Sema3A の関与について 3 軟骨細胞分化における Sema3A の役割について 4 軟骨細胞分化における Sema3A 添加による分化速度への関与について 5 炎症反応惹起のシグナル伝達経路における Sema3A の作用について 6 変形性関節症患者や他の全身疾患に対する Sema3A の作用について <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			