

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	矢野下 真
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 軟骨に対する過度な機械的負荷時の FAK・MAPKs カスケードによる炎症反応メカニズムの解明			
論文審査担当者			
主査	教授	吉子 裕二	印
審査委員	教授	二川 浩樹	
審査委員	准教授	武知 正晃	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>軟骨細胞において適度な力学的負荷は細胞外マトリックス（ECM）の恒常性維持に必要であるが、生理的許容を超える過度な機械的負荷は炎症反応とこれに続く ECM の破壊を引き起こすことで関節炎などの軟骨疾患の一因となる。</p> <p>我々は、これまでに軟骨細胞において過度な機械的負荷時に、メカノレセプターの一つであるインテグリンを介したシグナル伝達により炎症反応が惹起される可能性について報告した。また、インテグリンの活性化に伴い、インテグリンの Focal adhesion kinase（FAK）への結合がトリガーとなり細胞内のシグナル伝達が生じることが明らかとなっている。しかしながら、軟骨細胞における機械的負荷受容時の FAK の機能と炎症反応との関係については不明である。そこで本研究では、過度な機械的負荷受容時のシグナル伝達における FAK の機能と炎症反応誘発メカニズムを解明することを目的とした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 器官培養による下顎頭高負荷モデルを作製し、下顎頭軟骨細胞における高負荷受容時の FAK 阻害剤の役割を検討した。 13週齢 Wistar 系雄性ラットの下顎頭軟骨を採取し、20g の分銅を用いて機械的負荷を付与した状態で 10 <math>\mu</math>M の FAK 阻害剤添加群と非添加群において器官培養を行った。24時間後に下顎頭表層より下顎頭軟骨を採取し、COX-2、IL-1<math>\beta</math>、TNF-<math>\alpha</math>、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現についてリアルタイム PCR 解析を行い FAK 阻害剤の作用を検討した。</li> <li>2. EC 細胞株 AT805 から樹立されたマウス胚性腫瘍性細胞由来のクローン化細胞株 ATDC5 を軟骨分化誘導後、Flexcell Strain Unit<sup>®</sup>（FX-2000, Flexcell Corp）を用いて 10% の細胞伸展、毎分 30 サイクル（1秒伸長/1秒弛緩）の過度な周期的伸張刺激（CTS）を ATDC5 に負荷した。COX-2、IL-1<math>\beta</math>、TNF-<math>\alpha</math>、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現についてリアルタイム PCR 解析を行った。</li> <li>3. CTS 時の FAK 機能の解明のため、2. と同様に軟骨細胞に対して CTS 付与 0, 5, 10, 30, 60, 180 分後の FAK のリン酸化タンパク質について Western blot 解析を行った。また、FAK 阻害剤を添加後、CTS を付与 3 時間後の COX-2、IL-1<math>\beta</math>、TNF-<math>\alpha</math>、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現についてリアルタイム定量 PCR 解析を行い FAK 阻害剤添加群（0.1 <math>\mu</math>M、1 <math>\mu</math>M および 10 <math>\mu</math>M）、負荷・非添加群および非負荷・非添加群について比較検討した。</li> <li>4. CTS 時の FAK と MAPKs との関係性を解明するため 2. と同様に FAK 阻害剤添加後、CTS を負荷し、p-38、ERK、JNK のリン酸化タンパク質について Western blot 解析により FAK 阻害剤添加群（0.1 <math>\mu</math>M、1 <math>\mu</math>M および 10 <math>\mu</math>M）と非添加群との比較検討を行った。また、FAK、p-38、ERK および JNK の各リン酸化阻害剤による CTS 時の COX-2、IL-1<math>\beta</math>、MMP-13 のタンパク質について Western blot 解析による比較検討した。</li> </ol>			

これらの実験により、以下のことが明らかとなった。

1. 器官培養下顎頭高負荷モデルにおいて、20g の分銅による機械的負荷により亢進した COX-2、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現は 10  $\mu$ M の FAK 阻害剤の添加により有意に低下した。下顎頭軟骨細胞において FAK が炎症反応と関連していることが示唆された。
2. 培養軟骨細胞 に対する 10% の CTS 付与後 1 時間で、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現が有意に亢進し、3 時間で COX-2 の発現が有意に亢進した。
3. 培養軟骨細胞 に対する 10% の CTS 付与後、5 分で FAK のリン酸化が最大に達し、その後リン酸化レベルは 180 分まで継続した。また、CTS により有意に亢進した COX-2、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現は、FAK 阻害剤の添加により、濃度依存性に抑制された。培養軟骨細胞において FAK を介して炎症反応が惹起されている可能性が示唆された。
4. CTS により亢進した p-38、ERK および JNK のリン酸化は、FAK 阻害剤の添加により濃度依存性に抑制された。FAK、p-38、ERK および JNK の各阻害剤による IL-1 $\beta$ 、COX-2、MMP-13 のタンパク発現レベルの比較では、各阻害剤添加により同様に抑制された。

以上のように、本論文は、軟骨細胞の機械的負荷受容時の FAK-MAPK シグナルの役割を初めて明らかにした。このことは変形性関節症などの新たな治療標的を示唆するものである。よって、審査委員会全員は、本論文が博士（歯学）の学位を授与に十分に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	矢野下 真
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 軟骨に対する過度な機械的負荷時の FAK・MAPKs カスケードによる炎症反応メカニズムの解明			
最終試験担当者			
主査	教授	吉子 裕二	印
審査委員	教授	二川 浩樹	
審査委員	准教授	武知 正晃	
〔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12月20日の第8回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成30年2月13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"> <li>1) 変形性関節症のメカニズムについて</li> <li>2) インテグリン-FAK-MAPK シグナルを標的とした臨床応用について</li> <li>3) 軟骨疾患、その他の疾患における FAK の役割について</li> <li>4) 臨床症所見に対応した実験モデルについて</li> <li>5) 異なる機械的負荷時の細胞応答についての考察</li> <li>6) 想定される検証実験と今後の課題について</li> </ol> <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>			