

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	高野 真実
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 顎関節症におけるアンジオポエチン様因子 2（ANGPTL2）が有する炎症促進メカニズムの解明			
論文審査担当者			
主査	教授 加藤 功一	印	
審査委員	教授 吉子 裕二		
審査委員	教授 二川 浩樹		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>アンジオポエチン様因子(Angiopoietin-like protein：ANGPTL)は、脂質代謝、血管新生および炎症発現および増悪を含む多様な機能を有することが明らかとなっている。7つのANGPTLファミリーのうち、ANGPTL2は心臓、腎臓、肺、骨格筋および脂肪など様々な組織および細胞で発現しており、特に炎症性疾患においてその発現が上昇することにより、慢性炎症メディエーターと考えられている。ANGPTL2は低酸素状態、代謝異常および小胞体ストレスにより発現が誘導され、さらにANGPTL2の発現にはCalcineurin(CaN)/NFATcシグナルが関与することが報告されている。メカニカルストレス付与時にも同シグナルが活性化することが報告されている。しかし、軟骨の炎症におけるANGPTL2の機能および、軟骨における過度なメカニカルストレス付与時のCaN/NFATcシグナルの機能については不明な点が多い。そこで本研究では、軟骨細胞におけるANGPTL2の炎症メカニズムについて検証するとともに、過度な伸張刺激負荷時のCaN/NFATcシグナルの機能およびCaN阻害剤の効果を解明することを目的とした。</p> <p>1. マウス胚性腫瘍細胞由来細胞株ATDC5における軟骨分化マーカー、ANGPTL2およびANGPTL2の受容体の1つと考えられているIntegrin <math>\alpha_5\beta_1</math>の遺伝子発現を確認するため、軟骨分化誘導開始0、7、10、14、17、20、24、27日後にmRNAを抽出し、リアルタイム定量PCR解析を行った。また、ATDC5におけるANGPTL2およびIntegrin <math>\alpha_5\beta_1</math>のタンパク局在を確認するため、蛍光免疫染色を行った。</p> <p>2. ANGPTL2による炎症惹起メカニズムを検討するため、リコンビナントANGPTL2添加3時間後にmRNAを抽出し、ANGPTL2、IL-1<math>\beta</math>、TNF-<math>\alpha</math>、COX-2、ADAMTS-5、MMP-3、MMP-13、Integrin <math>\alpha_5</math>、Integrin <math>\beta_1</math>の遺伝子発現についてリアルタイム定量PCR解析を行った。また、リコンビナントANGPTL2添加後0、5、10、20、60、120分後のMAPKs、Akt、NF-<math>\kappa</math>Bのリン酸化タンパク質についてwestern blot解析を行った。</p> <p>3. ANGPTL2とIntegrin <math>\alpha_5\beta_1</math>との関係を解明するため、Integrin <math>\alpha_5\beta_1</math>中和抗体を添加12時間後に、2と同様にANGPTL2添加を行い、3時間後にmRNAを抽出し、ANGPTL2、IL-1<math>\beta</math>、TNF-<math>\alpha</math>、COX-2、ADAMTS-5、MMP-3、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、Integrin <math>\alpha_5\beta_1</math>中和抗体添加群・非添加群について各遺伝子発現量を比較した。また、Integrin <math>\alpha_5\beta_1</math>中和抗体を添加12時間後に、2と同様にANGPTL2添加を行い、0、10、20分後のMAPKs、Akt、NF-<math>\kappa</math>Bのリン酸化タンパク質をIntegrin <math>\alpha_5\beta_1</math>中和抗体添加群・非添加群についてwestern blot解析により比較した。</p>			

4. ATDC5 を軟骨分化誘導後、Flexcell Strain Unit<sup>®</sup>を用いて10%の細胞伸展、毎分30サイクル(1秒伸張/1秒弛緩)の過度な周期的伸張刺激(CTS)を負荷した。ANGPTL2の遺伝子発現についてリアルタイムPCR解析、およびANGPTL2、COX-2、MMP-13のタンパク質についてwestern blot解析を行った。

5. ATDC5におけるNFATc familyの遺伝子発現を調べるため、軟骨分化14日後のリアルタイムPCR解析を行い、4と同様に10%のCTS負荷後6、12時間後の遺伝子発現量の変化についてリアルタイムPCR解析を行った。

6. CTS負荷時の炎症反応に対するFK506の影響について検討するため、ATDC5を軟骨分化開始14日後にFK506(Sigma-Aldrich Japan; 50 mM)を添加し、12時間後よりCTSを6時間付与した。CTS非負荷群およびFK506添加・非添加群についてリアルタイムPCR解析にて比較した。

これらの実験結果より、以下のことが明らかとなった。

1. Type II collagenは分化開始14日後に、Aggrecanは17日後に、Type X collagenは20日後に、ANGPTL2は分化14日後に遺伝子発現量が極大となり、その後減少した。Integrin  $\alpha_5$  遺伝子の発現は分化期間を通じてほぼ一定であったが、Integrin  $\beta_1$  遺伝子の発現は分化20日以降減少傾向にあった。また、ANGPTL2はATDC5の細胞質に、Integrin  $\alpha_5\beta_1$ は細胞表面において強く発現していることがわかった。

2. ANGPTL2添加により、ANGPTL2、炎症関連因子およびIntegrin  $\alpha_5\beta_1$ の遺伝子発現は有意に亢進した。また、ANGPTL2の添加10分後よりMAPKおよびAktのリン酸化が亢進し、20分以降NF- $\kappa$ Bのリン酸化が亢進した。

3. Integrin  $\alpha_5\beta_1$ 中和抗体は、ANGPTL2添加によるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、COX-2、ADAMTS-5、MMP-3およびMMP-13の遺伝子発現の上昇を抑制した。また、Integrin  $\alpha_5\beta_1$ 中和抗体添加により、ANGPTL2添加によって亢進したERK、JNK、Aktのリン酸化は抑制され、NF- $\kappa$ B、p38のリン酸化はわずかに抑制された。

4. CTS負荷1時間でANGPTL2遺伝子発現の有意な亢進が認められ、12時間後まで持続した。また、CTS負荷24時間後にANGPTL2および炎症関連因子のタンパク発現の亢進が認められた。

5. ATDC5において、NFATc1、NFATc2およびNFATc4と比較して、NFATc3で有意に高い遺伝子発現を認めた。一方、NFATc1、NFATc3、NFATc4においてCTS刺激によって遺伝子発現は有意に亢進したが、NFATc2の遺伝子発現の変化は認められなかった。

6. CTS刺激受容によるANGPTL2および炎症関連因子の遺伝子発現の亢進は、FK506の添加により有意に抑制された。

以上の実験結果から、ANGPTL2は、ATDC5細胞において、Integrin  $\alpha_5\beta_1$ への結合を介して炎症を促進することが示唆された。また、軟骨細胞に過度なCTSを負荷するとCaN/NFATcシグナルが活性化されることがわかった。さらに、CaN阻害剤であるFK506には軟骨細胞のCTS負荷時の炎症反応を抑制する効果のあることがわかり、FK506が変形性関節症に対する新たな治療薬となり得る可能性が示唆された。

よって、審査委員会全員は、本論文が著者に博士(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	高野 真実
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 顎関節症におけるアンジオポエチン様因子2（ANGPTL2）が有する炎症促進メカニズムの解明			
最終試験担当者			
主査	教授 加藤 功一	印	
審査委員	教授 吉子 裕二		
審査委員	教授 二川 浩樹		
<p>〔最終試験の結果の要旨〕</p> <p style="text-align: center;">判 定 合 格</p> <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月21日の第4回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月1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) 緒言で述べている研究目的と総括の記述の整合性について</li> <li>2) 研究の新規性について</li> <li>3) 細胞伸展装置の改良の余地について</li> <li>4) インテグリン発現に対するANGPTL2のオートクライン効果について</li> <li>5) 関節リウマチに関する過去の報告との相違点について</li> <li>6) ANGPTL2の受容体であるIntegrin <math>\alpha_5\beta_1</math>の特異性について</li> <li>7) 軟骨細胞におけるIntegrin <math>\alpha_4\beta_2</math>の発現について</li> <li>8) 軟骨細胞株を用いた研究結果の普遍性と特殊性について</li> <li>9) Integrin <math>\alpha_5\beta_1</math>と細胞外マトリックスとの結合が及ぼす影響について</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>			