

(別紙様式第3号)

医研第296号

論 文 要 旨

論 文 題 目

Mechanical stress regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral bone formation

(内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖、分化に対する機械的刺激の影響)

氏 名 堀 野 菜 寛



【 目的 】 機 械 的 刺 激 は 、 内 軟 骨 性 骨 化 に お け
る 軟 骨 細 胞 の 増 殖 と 分 化 を 制 御 す る 重 要 な 因
子 の 1 つ で あ る が 、 そ の メ カ ニ ズ ム は 未 だ 不
明 な 点 が 多 い 。 本 研 究 の 目 的 は 、 軟 骨 細 胞 が
未 分 化 な 細 胞 か ら 肥 大 型 細 胞 へ 分 化 す る 過 程
で の 機 械 的 刺 激 の 効 果 を 明 ら か に す る こ と で
あ る 。 軟 骨 前 駆 細 胞 株 ATDC5 細 胞 は 、 イ ン ス リ
ン 存 在 下 で 軟 骨 前 駆 細 胞 か ら 肥 大 型 細 胞 へ と
分 化 す る 。 今 回 、 私 た ち は 、 分 化 段 階 の 異 な
る ATDC5 細 胞 に 機 械 的 刺 激 を 加 え て 、 各 分 化 段
階 で 特 徴 的 な mRNA の 発 現 量 が ど の よ う に 変 化
す る か を 検 討 し た 。
【 材 料 と 方 法 】 ATDC5 細 胞 を イ ン ス リ ン 存 在
(I + 群) ま た は 非 存 在 下 (I - 群) で 培 養
し た 。 培 養 開 始 後 4 、 7 、 14 、 21 、 28 日 目 に
形 態 観 察 と プ ロ テ オ グ リ カ ン 産 生 量 の 変 化 を
確 認 す る た め 、 ト ル イ ジ ン ブ ル ー 、 ア ル シ ア
ン ブ ル ー 染 色 を 行 っ た 。 同 時 期 に 4 点 曲 げ 装
置 を 用 い て 0.5 Hz 、 2800 μ strain の 機 械 的 刺 激 を 24 時
間 負 荷 し 、 細 胞 増 殖 の 指 標 と 考 え ら れ る ヒ ス

トン H4、増殖期軟骨細胞のマーカーと考えられる II 型コラーゲン、アグリカン、肥大型軟骨細胞のマーカーと考えられる X 型コラーゲン、それぞれの mRNA の発現量を確認した。

【結果】 I + 群では凝集領域を経て、軟骨結節を形成し、培養後期に肥大型細胞が認められた。一方、I - 群では上記の形態変化は認めず、細胞外基質の産生は僅かだった。ヒストン H4 mRNA は、培養開始後 4 日目に I + 群、I - 群ともに、機械的刺激により発現が増加したが、4 日目以降では機械的刺激の効果は認められなかった。II 型コラーゲン mRNA は、I + 群では、4 日目より増加し、21 日目でプラトーとなった。機械的刺激により 21、28 日目に発現が増加した。I - 群では、7 日目まで軽度の増加を認めたが、それ以降は変化無く、また、機械的刺激の効果も認められなかった。X 型コラーゲン mRNA は、I + 群では 7 - 28 日目まで徐々に発現が増加した。機械的刺激はその発現を増加させ、特に培養後期に




その効果がより強く認められた。I-群でも培養期間が長くなるとI+群と同様の傾向を認めたが、機械的刺激による発現量増加はI+群より少なかった。アグリカン mRNA は、I+群では7日目より発現が増加し、以後はほぼプラトーであった。機械的刺激により7日目のみ有意な発現の増加が認められた。I-群でもI+群と同様の傾向を認めたが、その発現はI+群より少なかった。

【考察】 ATDC5 細胞は、未分化細胞から肥大型細胞へと分化する過程において、機械的刺激に反応し、ヒストン H4、II 型、X 型コラーゲン、アグリカン mRNA の発現を増加させた。その反応性は細胞の分化段階により異なり、ATDC5 細胞が未分化な段階では増殖を刺激し、分化が進んだ段階では分化をより促進する方向に働くことが示唆された。

平成 19 年 7 月 24 日

(別紙様式第 7 号)

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏 名	堀 苑 英 寛
論文審査委員	審査日	平成 19 年 7 月 23 日		
	主査教授	高山 千利		
	副査教授	須加原 一博		
	副査教授	新川 元		
(論 文 題 目)				
Mechanical stress regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral bone formation				
(内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖、分化に対する機械的刺激の影響)				
(論文審査結果の要旨)				
上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準につき慎重かつ公正に検討し、以下の審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
機械的刺激が、長管骨の骨成長や、骨折治癒における内軟骨性骨化を制御していることは広く知られている。内軟骨性骨化は軟骨未分化細胞の増殖と凝集期、増殖期を経て石灰化を行う肥大化軟骨細胞への分化、それに引き続く骨化で成り立っているが、それぞれの分化段階での機械的刺激の効果やメカニズムは、未だ不明な点が多い。これらを解明することは、骨成長不全や骨折の治療において重要な課題と考える。本研究の目的は、軟骨細胞が未分化な細胞から肥大型細胞へと分化する過程における機械的刺激の効果を明らかにすることである。				

- 備 考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。

論文審査結果の要旨

2. 研究内容

ATDC5 細胞はインスリン存在下で軟骨未分化細胞から肥大化細胞へと分化する。ATDC5 細胞をインスリン存在 (I+群) または非存在下 (I-群) で培養した。培養開始後 4、7、14、21、28 日目に形態観察とプロテオグリカン産生量の変化を確認するため、トルイジンブルー、アルシアンブルー染色を行った。同時期に 4 点曲げ装置を用いて 0.5 Hz、2800 μ strain の機械的刺激を 24 時間負荷し、細胞増殖の指標と考えられるヒストン H4、増殖期軟骨細胞のマーカーと考えられる II 型コラーゲン、アグリカン、肥大型軟骨細胞のマーカーと考えられる X 型コラーゲン、それぞれの mRNA の発現量を確認した。

その結果、I+群では凝集領域を経て、軟骨結節を形成し、培養後期に肥大型細胞が認められた。一方、I-群では上記の形態変化は認めず、細胞外基質の産生は僅かだった。ヒストン H4 mRNA は培養開始後 4 日目に I+群、I-群ともに機械的刺激により発現が増加したが、4 日目以降では機械的刺激の効果は、認められなかった。II 型コラーゲン mRNA は、I+群では、4 日目より増加し、21 日目でプラトーに達した。機械的刺激により 21、28 日目に発現が増加した。I-群では 7 日目まで軽度の増加を認めたが、それ以降は変化無く、また、機械的刺激の効果も認められなかった。X 型コラーゲン mRNA は I+群では 7-28 日目まで徐々に発現が増加し、機械的刺激はその発現を増加させ、特に培養後期にその効果がより強く認められた。I-群でも培養期間が長くなると I+群と同様の傾向を認めたが、機械的刺激による発現量増加は I+群より少なかった。アグリカン mRNA は I+群では 7 日目より発現が増加し、以後はほぼプラトーであった。機械的刺激により 7 日目のみ有意な発現の増加が認められた。I-群でも I+群と同様の傾向を認めたが、その発現は I+群より少なかった。

これらのことより、ATDC5 細胞はインスリン存在下に軟骨未分化細胞から肥大型細胞へと分化し、その過程において機械的刺激に反応しヒストン H4、II 型、X 型コラーゲン、アグリカン mRNA の発現を増加させた。その反応性は細胞の分化段階により異なり、ATDC5 細胞が未分化な段階では増殖を刺激し、分化が進んだ段階では分化をより促進する方向に働くことが示唆された。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖、分化に対する機械的刺激の影響を初めて明らかにした。内軟骨性骨化は骨成長過程、骨折治癒過程などさまざまな病態に関与し、その細胞学的な機序の解明は、それぞれの疾患の治療、再生医学に重要である。従って、本研究はこれからの骨折治療や骨・軟骨再生医療における重要な基礎的研究であり、その学術的意義は高いと考えられる。

以上により、本論文は学位授与に十分に値すると判断した。

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
3 *印は記入しないこと。