

氏名	堀 綾花
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5928号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Regulatory mechanism of CCN2 production by serotonin (5-HT) via 5-HT _{2A} and 5-HT _{2B} receptors in chondrocytes. (軟骨細胞における 5-HT _{2A} および 5-HT _{2B} 受容体を介したセロトニン (5-HT) による CCN2 産生の調節機構)
論文審査委員	佐々木 朗 教授 池亀 美華 准教授 岡田 正弘 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨 (2000字程度)

Serotonin (5-hydroxytryptamine: 5-HT) is recognized as a neurotransmitter in the central nerve system and as a regulator of systemic blood pressure in the peripheral tissues. Recently, it was reported that 5-HT₂ receptors (5-HT₂Rs) were expressed in cartilage tissues lacking both vessels and neurons, suggesting possible novel functions of 5-HT during cartilage development and regeneration. Our previous data indicated that CCN family protein 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) plays a central role in cartilage development and regeneration. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of 5-HT on the production of CCN2 in chondrocytes. Firstly, we showed that the mRNAs of 5-HT₂R subtypes 5-HT_{2A}R and 5-HT_{2B}R, were expressed in a human chondrocytic cell line, HCS-2/8; however, 5-HT_{2C}R mRNA was not detected. In addition, exogenously added 5-HT did not affect the 5-HT_{2A}R and 5-HT_{2B}R expressions. Next, we demonstrated that CCN2 production was increased by treatment with a 5-HT_{2A}R agonist and the combination of 5-HT and 5-HT_{2B}R antagonist. In contrast, treatment with a 5-HT_{2B}R agonist and the combination of 5-HT and 5-HT_{2A}R antagonist decreased CCN2 production. Furthermore, we showed that phosphorylation of Akt and p38 MAPK were increased by treatment with 5-HT_{2A}R agonist, and that

phosphorylation of PKC ϵ , PKC ζ , ERK1/2 and JNK were increased by treatment with 5-HT_{2B}R agonist. Finally, we found that 5-HT_{2A}R was localized in the growth plate, whereas 5-HT_{2B}R was localized in the articular cartilage. These findings suggest that 5-HT promotes CCN2 production through the 5-HT_{2A}R in growth plates, and that it represses CCN2 production through the 5-HT_{2B}R in articular cartilage for harmonized development of long bones.

論文審査結果の要旨

セロトニン (5-HT) は、必須アミノ酸であるトリプトファンから生合成される生体内アミンであり、脳血液関門を通過できない。それ故、中枢神経系と末梢組織では、その役割が異なっており、中枢神経系では主に神経伝達物質として、末梢組織では血圧調節因子として作用することが知られている。また2004年にマウス肢芽形成予定域の軟骨原基に5-HT受容体の2型 (5-HT₂R) が発現していることが報告されている。以上の背景を踏まえて、申請者は5-HTが軟骨細胞分化に何らかの役割を果たしているとの仮説を立て、培養軟骨細胞を用いて5-HTの軟骨細胞分化における役割を解析した。ヒト由来軟骨細胞株であるHCS-2/8細胞で5-HT₂Rの3つサブタイプのうち、5-HT_{2A}R及び5-HT_{2B}Rの遺伝子発現を確認したが、5-HT_{2C}Rの遺伝子発現は検出できなかった。そこで、5-HT_{2A}R及び5-HT_{2B}Rに着目して、軟骨細胞分化に重要な役割を持つCCN family protein 2/結合組織成長因子 (CCN2/CTGF) の遺伝子発現とタンパク質産生における作用を中心に解析した。HCS-2/8細胞に5-HT_{2A}RのagonistであるNBOH-2C-CN (NBOH) を添加すると、CCN2の産生レベルは亢進し、逆に、antagonistであるritanserinと5-HTを添加するとCCN2の産生レベルは減少した。また、5-HT_{2B}RのagonistであるBW723C86 (BW) を添加すると、CCN2の産生レベルは減少し、5-HT_{2B}RのantagonistであるSB204741 (SB) と5-HTの添加でCCN2の産生レベルは亢進した。この時の軟骨細胞内でのシグナル伝達機構について解析したところ、HCS-2/8細胞にNBOHを添加すると、AKTのリン酸化とp38 MAPKのリン酸化の亢進が見られ、BWを添加すると、AKTのリン酸化の亢進は見られず、protein kinase Cε (PKCε) のリン酸化の亢進と、その下流のERK1/2及びJNKのリン酸化の亢進が見られた。さらに、5-HT_{2A}R及び5-HT_{2B}Rの局在を生後60日齢のマウス脛骨の骨端部の組織切片を免疫染色法で解析すると、5-HT_{2A}Rは成長板に、5-HT_{2B}Rは関節軟骨の表層部に局在することを明らかにした。これらの結果から、成長板では5-HTは5-HT_{2A}Rを介してCCN2の産生を促進し、関節軟骨では5-HT_{2B}Rを介してCCN2の産生を抑制することを示した。

以上のように、本申請論文は、軟骨細胞分化に重要なCCN2の産生機構における5-HTの役割を初めて明らかにしたものであり、査読付きの欧文雑誌PLoS ONE (IF: 2.806) に掲載済みである。実験手法は遺伝子レベルとタンパク質レベルの両面から検証され、その結果に対して妥当な考察も行われている。

よって、本審査委員会は、本申請論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。