

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
上岡 寛 印	研究内容の指導、総括
岡村 裕彦 印	研究内容の指導、総括
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 歯科矯正学分野	身分 大学院生	氏名 住谷 友佑
論文題名 Inhibitory effect of retinoic acid receptor agonists on in vitro chondrogenic differentiation In vitro における軟骨細胞分化に対するレチノイン酸受容体アゴニストの阻害効果の検討		
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【目的】 ビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸（RA）は、胎生期における胚の形成や器官の形態決定、身体の形成や発達、細胞の分化・増殖といった、さまざまな生物学的プロセスにおいて極めて重要な役割を果たしている。RA によるシグナル伝達は、核内受容体であるレチノイン酸受容体（RAR）により媒介される。RAR には RARα、RARβ、RARγ の 3 つのサブタイプが存在し、それぞれ異なる発現パターンと機能を有することが知られている。 RA シグナルは骨格の形成においても重要な役割を担い、特に RA は軟骨形成の強力な阻害因子として報告されている。しかし、その細胞レベルでの具体的な機能や、受容体サブタイプごとの違いについては未だ不明な点が多く残されている。 そこで本研究では、各受容体サブタイプに特異的なアゴニストを使用し、in vitro での軟骨細胞分化に対する影響を検討することを目的とした。</p> <p>【試料および方法】 実験には、理化学研究所より購入培養した軟骨細胞前駆細胞である ATDC5 および、間葉系幹細胞である C3H10T1/2 を使用した。これらの細胞に対し軟骨細胞への分化を誘導し、すべての RAR サブタイプに結合し活性化する RA、各受容体サブタイプに特異的なアゴニスト（RARα アゴニスト、RARβ アゴニスト、RARγ アゴニスト）、全ての RAR サブタイプに結合しその働きを積極的に抑制するインバースアゴニスト(INV)を添加した。対照群（CONT）と各アゴニスト投与群を比較し、細胞の形態的变化を位相差顕微鏡にて、軟骨基質の産生をアルシアンブルー染色にて検討した。また、軟骨細胞分化マーカー発現を qPCR および免疫組織化学にて比較検討し、各アゴニストが細胞の生存に与える影響を CCK-8 アッセイキットを用いて解析した。</p>		

【結果および考察】

分化誘導およびアゴニスト投与後 5 日目に細胞の形態的变化を観察したところ、CONT では軟骨細胞分化の初期に見られる円形の細胞が凝集した像が見られた。これと比較し、RA および各受容体サブタイプ特異的アゴニストで処理した細胞では、紡錘形を呈する細胞が多数見られた。またその変化は、RAR α 、 γ アゴニスト投与群で顕著であり、RAR β アゴニスト投与群では比較的軽微であった。次に、各群による軟骨基質の産生を観察するため、C3H10T1/2 細胞をマイクロマスカルチャーにて培養し、各アゴニスト投与後 15 日目にアルシアンブルー染色を行った。その結果、すべての RAR アゴニスト投与群において染色が減弱し、軟骨基質産生の低下が示唆された。この変化においても、RAR α 、 γ アゴニスト投与群では RAR β アゴニスト投与群と比較して顕著であった。次に、各群における軟骨細胞関連遺伝子の発現を qPCR にて解析した。CONT と比較して RA、RAR α 、RAR γ アゴニスト投与群において、軟骨細胞分化マーカーである Sox9、Col2a1 の発現レベルが有意に低下した。RAR β アゴニスト投与群では Col2a1 の発現レベルが有意に低下したものの、RAR α 、RAR γ アゴニスト投与群と比較するとその変化は小さく、Sox9 の発現レベルは CONT と同等であった。INV 投与群では、Col2a1、Sox9 ともに発現レベルの上昇が確認された。成熟軟骨細胞マーカーである Mmp13 の発現レベルは、全てのアゴニスト投与群において CONT と比較して有意に上昇した。また、免疫組織化学により Aggrecan タンパクの染色を行ったところ、CONT および INV 投与群では陽性細胞が確認できるのに対して、各アゴニスト投与群では検出できなかった。各アゴニストが細胞生存に与える影響を検討したところ、RA、RAR α アゴニスト、RAR γ アゴニスト投与群において生細胞数が有意に減少していることが確認された。RAR β アゴニスト投与群では CONT と差が見られなかった。反対に、INV 投与群では有意に生細胞数の増加が確認された。

以上の結果から、RAR α および RAR γ は軟骨細胞分化における RA シグナル伝達において、RAR β と比較し支配的であり、細胞の分化および生存に対して負の調節を行うことが示唆された。一方で、成熟期マーカーである Mmp13 の発現は促進させることから、未分化細胞の軟骨細胞分化は抑制し、分化した軟骨細胞の成熟は促進させる可能性が示された。