

論文内容要旨

軟骨細胞における Semaphorin 3A の役割

主指導教員：谷本 幸太郎 教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：里田 隆博 教授

(医歯薬保健学研究科 生体構造・機能修復学)

副指導教員：國松 亮 講師

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

角 千佳子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

Semaphorin 3A (Sema3A) は、神経軸索の方向性を決める神経ガイダンス因子として同定された分子群である。セマフォリンは、現在までに 20 種類を超えるメンバーが同定されており、Sema ドメインに続く C 末端の構造の違いから 8 つのサブグループに分類される。Sema3A は、代表的な分泌型セマフォリンのひとつで、Neuropilin-1 (NRP-1) を介して Plexin-A1 (PLXA1) へ結合し、相互作用によりシグナル伝達を行うことが知られている。また、機能については、神経系だけでなく、免疫系、心血管系および呼吸器系、器官形成、腫瘍形成および骨代謝においても重要な役割を果たすことが認められている。さらに近年、軟骨細胞における NRP-1 および PLXA1 の存在が明らかとなったが、その報告数は少なく、機能については不明な点が多い。本研究では、培養軟骨細胞 ATDC5 (マウス胚性腫瘍細胞由来クローン化細胞株) を用い、軟骨分化に対する Sema3A の役割および過度な周期的伸張刺激 (CTS: cyclic tensile strain) により生じる炎症に対する Sema3A の役割について検討した。

1. 培養軟骨細胞における Sema3A の影響についての検証

ATDC5 における、軟骨分化マーカー Type II collagen、Aggrecan、Type X collagen の経時的な遺伝子発現の変化について、real-time PCR 解析を行った。また、Sema3A の発現について Western blot 解析を行い、経時変化について real-time PCR 解析を行った。次に、Sema3A ノックダウンの影響について検討するため、分化誘導 14 日後の ATDC5 に対し、Sema3A siRNA を添加し、24 時間後の軟骨分化マーカーの遺伝子発現について real-time PCR 解析を行った。また、Sema3A 添加についての影響を検討するため、分化誘導 14 日後の ATDC5 に対し Sema3A を、1, 10, 100 ng/ml の濃度となるよう添加し 24 時間後の軟骨分化マーカーの遺伝子発現について real-time PCR 解析を行った。

2. 培養軟骨細胞における過度な周期的伸張刺激 (CTS) 時の Sema3A の影響についての検証

Flexcell Strain Unit® (FX-2000, Flexcell Corp) を用い、0.5 Hz、10% の CTS を分化誘導 14 日後の ATDC5 に負荷した。CTS に対する Sema3A とその受容体および炎症関連因子の遺伝子発現の経時変化について、real-time PCR 解析を行った。次に、CTS 負荷時の Sema3A の影響について検討するため、分化誘導 14 日後の ATDC5 に対し、Sema3A を 1, 10, 100 ng/ml の濃度となるよう添加し、0.5 Hz、10% の CTS を負荷した。添加後 3 時間の炎症関連因子の遺伝子発現について real-time PCR 解析を行った。また、添加後 24 時間の IL-18 のタンパク発現について、Western blot 解析を行った。また、添加後 1 時間の ERK、NF- κ B、AKT のリン酸化について Western blot 解析を行い、シグナル伝達経路について検証した。

これらの実験より、以下のことが明らかとなった。

1. ATDC5 は分化開始 14 日後に増殖期へ、20 日後に肥大型へ移行していることが確認された。ATDC5 において、Sema3A、NRP-1、PLXA1 の遺伝子およびタンパク発現が確認された。Sema3A ノックダウンにより、軟骨分化マーカーの遺伝子発現量は有意に抑制されたが、

その他の分化制御因子の発現量に有意な差は認められなかった。**Sema3A** 添加により、軟骨分化マーカーおよび分化制御因子の遺伝子発現量は有意に亢進した。

2. CTS により、**Sema3A** とその受容体の遺伝子発現量に経時的変化がみられた。また、炎症関連因子の遺伝子発現量は、有意に亢進した。CTS により亢進した炎症関連因子、**Rnd1** の遺伝子発現量および **IL-1 β** 、**MMP13** のタンパク発現は、**Sema3A** の添加により抑制された。CTS により亢進した **ERK**、**NF- κ B**、**AKT** のリン酸化は、**Sema3A** の添加により濃度依存的に抑制された。

以上より、ATDC5 において、**Sema3A** は軟骨分化に関与している可能性が示唆された。さらに **Sema3A** は、**MAPK**、**AKT** および **NF- κ B** シグナル伝達経路を介して炎症関連因子の産生を抑制する可能性が示唆された。今後、**Sema3A** の軟骨における分化の制御および炎症関連因子の抑制作用の関節疾患治療への応用が期待される。