

氏名	住谷 友佑
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6165号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	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)
論文審査委員	沢 楨彦 教授      窪木 拓男 教授      岡田 正弘 准教授

### 学位論文内容の要旨

#### 【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 RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$  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。

#### 【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 (RAR $\alpha$  アゴニスト、RAR $\beta$  アゴニスト、RAR $\gamma$  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サアゴニスト (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。

#### 【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な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

$\alpha$ 、 $\gamma$ アゴニスト投与群で顕著であり、RAR $\beta$ 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 $\alpha$ 、 $\gamma$ アゴニスト投与群ではRAR $\beta$ 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 $\alpha$ 、RAR $\gamma$ 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 $\beta$ 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 $\alpha$ 、RAR $\gamma$ 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 $\alpha$ アゴニスト、RAR $\gamma$ 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 $\beta$ 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 $\alpha$ およびRAR $\gamma$ は軟骨細胞分化におけるRAシグナル伝達において、RAR $\beta$ 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。

## 論文審査結果の要旨

【緒言】ビタミン A 代謝産物レチノイン酸 (RA) は、胚の形成や器官の形態決定、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重要な役割を果たしている。RA シグナルを伝達する核内受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR) には、RAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  のサブタイプが存在し、異なる機能を示すと考えられている。RA は軟骨形成の強力な阻害因子として知られるが、軟骨形成阻害のシグナル伝達における RAR サブタイプ間の差異については不明な点が多い。本研究は、軟骨細胞分化に対する RAR サブタイプ特異的アゴニストの効果を *in vitro* で検討することを目的とした。

【材料および方法】実験には、理化学研究所より購入し培養した軟骨細胞前駆細胞 (ATDC5、C3H10T1/2) を用いた。軟骨細胞に分化を誘導し、RA、RAR サブタイプ特異的アゴニスト (RAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  アゴニスト)、およびインバースアゴニスト (INV) を添加した。アゴニスト投与の形態的变化を位相差顕微鏡で、また軟骨基質産生をアルシアンブルー染色で観察した。軟骨細胞分化マーカー発現を定量 PCR と免疫組織染色で、また、アゴニストが細胞増殖活性に与える影響を CCK8 アッセイキットで解析した。

【結果および考察】RA と RAR アゴニスト投与細胞は形態が紡錘形で軟骨基質検出の弱まることが観察された。特に、RAR $\alpha$ 、 $\gamma$  アゴニスト投与で顕著であり、RAR $\beta$  アゴニスト投与で軽微だった。従って、RAR アゴニストは形態分化と軟骨基質産生を抑制し、特に RAR $\alpha$  と  $\gamma$  のアゴニストで効果が高い可能性が示された。定量 PCR では、RAR $\alpha$ 、 $\gamma$  アゴニスト投与群において Sox9 と Col2a1 の発現が有意に低下した。RAR $\beta$  アゴニスト投与群では Col2a1 の発現が有意に低下したものの、RAR $\alpha$ 、RAR $\gamma$  アゴニスト投与群と比較するとその変化は小さく、Sox9 は変化しなかった。従って RAR アゴニストのうち、特に RAR $\alpha$ 、 $\gamma$  アゴニストは、軟骨細胞への分化必須で Col2a1 のマスターレギュレーターである転写因子 Sox9 の活性化を弱める可能性が示された。さらに、全てのアゴニスト投与細胞で Mmp13 発現が上昇し、aggrecan が検出されず、また特に RAR $\alpha$ 、 $\gamma$  アゴニスト投与で生細胞数が減少した。INV 投与では、Col2a1 と Sox9 の発現が上昇し、aggrecan が検出され、生細胞数が増加した。以上のことから、INV が RAR $\alpha$ 、 $\gamma$  アゴニストによる軟骨細胞分化抑制を解除し、細胞増殖をもたらすこと、全てのアゴニストが軟骨細胞の軟骨基質産生を抑制し、変性を誘導すること、特に RAR $\alpha$ 、 $\gamma$  アゴニストは分化と増殖の両者を抑制する可能性が示唆された。

【結語】本論文は、軟骨細胞におけるレチノイン酸受容体の機能がサブタイプで異なること、特に受容体  $\alpha$  と  $\gamma$  のシグナルは、軟骨細胞の分化および基質産生のみならず前駆細胞の増殖抑制の二面性をもつ可能性を示唆したもので、本論文はすでに *Anatomical Science International* に受理され国際的にも評価されていることから、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。