

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 後藤佳子

### 学位論文題名

Synthetic PAMPS gel activates BMP/Smad signaling pathway in ATDC5 cells, which plays a significant role in the chondrogenic differentiation independent of insulin  
(合成 PAMPS ゲルは ATDC5 細胞における BMP/Smad シグナル伝達経路を活性化し、それはインスリン非依存性軟骨分化において重要な役割を果たす)

#### 【背景と目的】

現在の関節軟骨治療には様々な限界があり、より優れた軟骨再生法の開発は急務である。申請者の属する研究グループは、PAMPS/PDMAAm DN ゲル(以下 DN ゲル)を兔膝関節の軟骨欠損部の基底部に埋植すると、空隙に硝子軟骨が自然再生することを発見した。この事実は、人工ゲルの移植という簡便な手術による、細胞培養を要しない関節軟骨再生治療法を開発できる可能性を示唆した。しかし、これまでの研究では DN ゲルによる関節軟骨の自然再生誘導に関する分子メカニズムは不明であり、この新しい治療法の開発のためには、このメカニズムの解明が待たれてきた。これまでの研究では、DN ゲルの構成ゲルである PAMPS ゲルが *in vivo* においては硝子軟骨再生誘導能を有し、また *in vitro* においてはマウス胚性腫瘍性クローン化細胞株 ATDC5 細胞を軟骨細胞へ分化させることが解っている。そこで申請者は、PAMPS ゲルが *in vitro* において ATDC5 細胞の軟骨へ分化させる過程において特異的に活性化されるシグナル伝達経路とその意義を明らかにすることを目的として本研究を行った。

#### 【材料と方法】

第一の実験(研究 1)では、PAMPS ゲルとインスリンによる軟骨分化誘導能を比較するために、ATDC5 細胞を①インスリン非添加培地(M 培地)にて PAMPS ゲル上で培養した条件(PAMPS ゲル培養条件)、②インスリン添加培地にてポリスチレン上で培養した条件(PS-I 培養条件)、及び③M 培地にてポリスチレン上で培養した条件(PS 培養条件)の 3 条件において 15 日間培養し、細胞形態とリアルタイム PCR 法による 2 型コラーゲンとアグリカンの発現量を経時的に観察した。

第二の実験(研究 2)では、PAMPS ゲルにより誘導される細胞内シグナル経路を同定するために、DNA マイクロアレイ解析を行い 1-3 日目の網羅的遺伝子発現変動から PS 及び PS-I 培養条件と比較して PAMPS ゲル培養条件において有意に高発現しているシグナルを Gene Set Enrichment analysis (GSEA)により抽出した。抽出されたシグナルを含む主要な軟骨分化関連シグナル 28 分子の発現とリン酸化量をウェスタンブロット法を用いて解析し、候補シグナルについて ConPath ソフトウェアでパスウェイ解析を行った。このうち TGF- $\beta$  /BMP シグナルにおいて特に重要な BMP-4 に着目し、PAMPS ゲル培養条件における 1、3 日目の発現量をリアルタイム PCR 法によって半定量解析した。さらに、PAMPS ゲル培養条件において高いリン酸化を示した Smad1/5 について、培養 72 時間におけるリン酸化率の経時変化をウェスタンブロット解析と NIH Image J による定量解析により確認した。

第三の実験(研究 3)では、研究 2 より候補となった BMP4/Smad1/5 経路に対し BMP type I 受容体の阻害剤であるトルソモルフィン 10 $\mu$ M を Smad1/5 の活性がみられる培養 24-72 時間に投与し、培養 72 時間の Smad1/5 のリン酸化状態と培養 13 日目の軟骨分化マーカーの発現をリアルタイム PCR 法により解析した。

統計解析は3群以上の比較については分散分析を用い、2群の比較についてはt-testを用いた。また、GSEAではFisher's exact testを用いた。有意水準は5%とした。

#### 【結果】

研究1:PAMPS ゲル培養条件における ATDC5 細胞は PS-I 培養条件より早い培養 10 日目に軟骨分化形態として知られている細胞凝集体を呈した。PAMPS ゲル培養条件の 2 型コラーゲンの発現量は PS-I 培養条件と比較して培養 1-13 日目の全培養期間において有意に高く ( $p < 0.001$ )、アグリカンの発現量も培養 3 日目、9-11 日目、及び 13 日目に有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

研究 2 : DNA マイクロアレイ解析に基づいた GSEA の結果、PAMPS ゲル培養条件では培養 1-3 日目に PS 及び PS-I 培養条件と比較して TGF- $\beta$  /BMP シグナルの遺伝子セットの発現が有意に増加していた ( $p < 0.0001-0.0016$ )。また培養 2、3 日目では MAPK シグナルや Wnt シグナル分子も有意に増加していた ( $p < 0.0001-0.0017$ )。次いでウェスタンブロット法により TGF- $\beta$  /BMP、MAPK、Wnt/ $\beta$ -Catenin シグナルの他、軟骨分化誘導に関連する Jak/Stat、PI3K シグナルに関与する主要分子群の発現量及びリン酸化状態を比較した結果、PAMPS ゲル培養条件では PS 培養条件と比較して、培養 2、3 日目に Smad1/5、p38、Jak1、Jak2、Stat3 の発現およびリン酸化量が高く、この中でも Smad1/5 は PS-I 培養条件と比較して培養 2、3 日目に著明なリン酸化を示した。以上の結果より、TGF- $\beta$  /BMP シグナルに着目しパスウェイ解析を行ったところ、培養 2 日目における PAMPS ゲル培養条件での BMP-4、Inhba、Ltbp1、Fst、Thbs1、Smad6、および Serpin1 の発現は PS-I 培養条件と比較して 2 倍以上高かった。この中で TGF- $\beta$  /BMP シグナルに重要な BMP-4 の発現は、PAMPS ゲル培養条件では PS 及び PS-I 培養条件と比較して有意に高かった ( $p < 0.0001$ )。PAMPS ゲル培養条件では、BMP-4 の下流エフェクター分子である Smad1/5 のリン酸化は経時的に亢進し、36 時間から 72 時間で有意に高いリン酸化状態を示した ( $p = 0.0001-0.0034$ )。

研究 3:PAMPS ゲル培養条件では、ドルソモルフィン添加後 24 時間から 72 時間の Smad1/5 のリン酸化レベルが著明に減少した。また同条件においては、細胞凝集体が形成されず、培養 13 日目の軟骨分化マーカーの発現は PS 培養条件と比較し有意に抑制された (2 型コラーゲン :  $p = 0.0007$ 、アグリカン :  $p = 0.0007$ )。

#### 【考察】

マイクロアレイデータに基づいた GSEA、パスウェイ解析、ウェスタンブロット解析、及びリアルタイム PCR 解析の結果は、PAMPS ゲル培養条件の培養早期 (1 日目、2 日目、及び 3 日目) の ATDC5 細胞において TGF- $\beta$  /BMP シグナルが PS-I 培養条件と比較して有意に活性化していることを示した。さらに、ドルソモルフィンを用いて BMP type I 受容体を阻害すると、PAMPS ゲル培養条件で Smad1/5 のリン酸化が抑制され、また培養 13 日目においては ATDC5 細胞の凝集体形成の抑制および 2 型コラーゲン及びアグリカンの mRNA 発現量の抑制が起こることを明らかとした。これらの結果は TGF- $\beta$  /BMP シグナル経路の阻害が PAMPS ゲルに誘導される軟骨分化を有意に抑制することを示している。本研究は、特定の合成ゲル表面が特異的なシグナル経路によって細胞内遺伝子やタンパクの発現を直接的に調節しうることを示した最初の研究である。

#### 【結論】

本研究は、合成 PAMPS ゲルがインスリン非存在下で ATDC5 細胞の BMP/Smad シグナル経路を活性化し、そしてその経路が PAMPS ゲルによる軟骨分化誘導において重要な役割を果たすことを明らかに示した。