

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	伊 東 良 太
論文題目	Stimulatory actions of lysophosphatidic acid on mouse ATDC5 chondroprogenitor cells (リゾホスファチジン酸のマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 に対する促進作用)		
(論文内容の要旨)			
リゾホスファチジン酸(LPA)とスフィンゴシン1リン酸(S1P)はGタンパク質共役型受容体を介して様々な細胞過程に影響する生理活性リゾリン脂質である。胎生 10.5 日、11.5 日目のマウス胚を用いて in situ hybridization を行ったところ、LPA 受容体の一つである LPA₁ が II 型コラーゲン陽性、Sox9 陽性の軟骨前駆領域あるいは軟骨性骨原基、および周囲間葉系細胞と重なって強く発現していることを見いだした。しかし、リゾリン脂質は細胞増殖、細胞移動、細胞形態などに広範な作用を有するにもかかわらず、軟骨形成における役割については十分に解明されていない。そこで、マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 をモデルとして、前駆軟骨細胞に対する LPA の作用について詳細に検討した。即ち、ATDC5 細胞は 5%血清存在下に線維芽細胞様の形態をとりつつ旺盛に増殖してコンフルエントに達すると一旦増殖を停止する（未分化期）。さらにインスリン（10 μg/ml）の存在下に細胞凝集領域を形成する（細胞凝集期）。次いで凝集領域内に類円形の軟骨細胞が出現すると増殖が再開され、II 型コラーゲンやアグリカンを含む多量の軟骨細胞外基質を産生して軟骨結節が形成される（軟骨分化期）。増殖して軟骨結節を形成する（分化期）。その後、結節深層の細胞は肥大化し、X 型コラーゲンの発現とリン酸カルシウムの沈着が起こる（肥大化・石灰化期）。リゾリン脂質レセプターには3種類の LPA 受容体(LPA₁₋₃)と 5 種類の S1P 受容体（S1P₁₋₅）が知られているが、Northern blot の結果、LPA₁ が未分化期と凝集期で強く発現し、分化期に若干の低下を示したものの、肥大化・石灰化には再び発現亢進することが示唆された。この時、LPA₂ の発現もわずかに認められたが、LPA₃ の発現は認められなかった。S1P 受容体では S1P₂ が強く発現していたが、S1P₁ や S1P₃ の発現もわずかに認められた。 そこで、前駆軟骨細胞の形質を保持する未分化期の ATDC5 細胞に対するリゾリン脂質の作用を検討した。その結果、培養系に添加した LPA は用量依存性に ERK1/2 のリン酸化を促進すると共に DNA 合成を促進した。しかし、S1P はほとんど作用を示さなかった。次に、Boyden chamber 法により細胞遊走に対する作用を検討した。S1P が ATDC5 細胞の遊走に対して阻害的に作用するのに対して、LPA は 0.1 μM まで用量依存性に強い細胞遊走促進活性を示した。さらに、高濃度ではその作用は減弱して 10 μM で無刺激時と同等の細胞遊走活性に戻った（ベル型の用量反応曲線）。この細胞遊走促進活性は、LPA₁ および LPA₃ の受容体拮抗剤である Ki16425 ならびに LPA₁ に対する siRNA によって阻害された。また、PI3K 阻害剤である LY294002 によっても阻害されることが明らかとなった。次に、ATDC5 細胞の軟骨分化における血清中 LPA の作用を評価するために 5%血清と共に Ki16425 を加えてインスリン存在下に培養を行った。その結果、Ki16425 の用量依存性に Alcian blue 陽性の軟骨結節の形成は減少し、II 型コラーゲンおよびX型コラーゲン mRNA の発現も低下することが判明した。 以上の結果から、LPA が軟骨前駆細胞の活性化とそれに続く軟骨形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。			

（論文審査の結果の要旨） リゾホスファチジン酸(LPA)は G タンパク質共役型受容体を介して作用する生理活性リゾリン脂質である。本研究では、胎生 10.5 日、11.5 日目のマウス胚で LPA 受容体の一つである LPA₁ mRNA が軟骨形成予定領域あるいは軟骨性骨原基に強く発現することを見いだした。そこで、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞をモデルとして、LPA の作用について検討した。 即ち、ATDC5 細胞は軟骨前駆細胞の形質を保持する未分化期で LPA₁ mRNA を強く発現していた。未分化期の ATDC5 細胞に対して、LPA は用量依存性に DNA 合成および細胞増殖を促進した。また、LPA は 0.1 µM まで用量依存性に強い細胞遊走促進活性を示したが、高濃度ではその作用は減弱し 10 µM で無刺激時と同等の細胞遊走活性に戻った。この細胞遊走促進活性は、LPA 受容体拮抗剤である Ki16425 ならびに LPA₁ に対する siRNA によって阻害された。次に、Ki16425 と共に分化誘導培養を行ったところ、軟骨結節の形成は減少し、II 型コラーゲンおよびX型コラーゲン mRNA の発現も低下することが判明した。以上の結果から、LPA が軟骨前駆細胞の活性化とそれに続く軟骨形成に重要な役割を果たすことが示唆された。 以上の研究は軟骨前駆細胞の増殖・分化制御の解明に貢献し、軟骨形成・再生の細胞生物学的基盤の理解に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 9 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			