

審査結果の要旨

氏名 藤川 由美子

軟骨再生医療において、われわれの目指すインプラント型の再生軟骨を作製する場合、組織から単離された軟骨細胞を必要数まで増殖させる必要がある。しかし、ヒト耳介軟骨細胞は継代培養に伴い、軟骨としての表現型である基質産生能の低下、増殖培地による培養における増殖能の低下、ストレス反応性の低下などを生じ、細胞の生存性も減少することが知られている。このことから、軟骨再生医療の細胞源としては、100-1000 倍増程度の軟骨細胞（第 2-3 継代、P2-3）が多用され、この場合使用できる細胞数に制限が生じている。本研究は継代培養に伴う軟骨形質変化の要因の原因となる遺伝子として、継代培養に伴い発現が減少する遺伝子を選択し、機能解析を行い以下の結果を得た。

1.軟骨再生医療の細胞源として多用される 100-1000 倍増程度の P2-3 と、過度の増殖により細胞増殖能または基質産生能が極端に低下している 1 億倍増程度の P7-8 を遺伝子発現によって マイクロアレイによって網羅的に解析を行い、P7 と比較し P2 で発現が高かった既知遺伝子のうち、発現量に 10 倍以上が差あり、6 検体において最も再現性が高かった既知の 3 つの遺伝子のうち、Real time PCR においても再現性が確認された遺伝子である WNT inhibitory factor 1 (WIF1) を選定した。

2.Real time PCR によって、WIF1 の遺伝子発現はヒト生体耳介軟骨組織において最も発現が高く、次いで組織から単離された細胞の継代培養に発現が減少する傾向を確認した。

3. WIF1 の遺伝子発現は、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、転写レベルで調節されていることを確認した。種々の癌細胞では DNA のプロモータ領域のメチル化により転写が抑制されているという報告があるが、発現の低い P8 で 3 検体解析を行ったところ DNA のメチル化は生じていなかった。

4. WIF1 のタンパク発現局在および細胞内タンパク発現量は免疫染色の結果において P3、P8 で差はなかったが、培地上清中のタンパク蓄積量は P8 と比較し P3 で高いことを ELISA によって確認した。さらに、ヒト耳介軟骨組織および

関節軟骨組織において、WIF1 のタンパク発現を確認した。また、ヒト耳介軟骨組織において、糖・脂質の細胞内蓄積を PAS 染色、oil red O 染色にて確認した。

5. 細胞高密度、低酸素下において細胞培養を行うと WIF1 の発現が上昇することが分かった。低酸素下において、グルコース消費量、乳酸蓄積量、脂質消費量、細胞内糖・脂質蓄積が増加し、他方細胞内 ATP 量に差はないことを、培地上清生化学検査、PAS 染色、oil red O 染色によって確認した。

6. WIF1 リコンビナントタンパクを添加した HFI 培地（5% Human Serum、100 ng/ml FGF-2、5 μ g/ml insulin を含む DMEM/F12 培地）においても糖・脂質消費量が増加した。WIF1 による糖の細胞内取り込みを蛍光標識グルコース試薬である 2-NBDG によって定量・可視化して確認した。

7. WIF1 を添加した HFI 培地において、細胞内の糖蓄積が増加したことを PAS 染色にて確認した。

8. Real time PCR によって、糖代謝関連遺伝子の発現を解析したところ、GLUT1,3,5 を介して糖を取り込むことが示唆された。さらに、グリコーゲン合成酵素 GYS1 の発現量が insulin と WIF1 の共存在下で増加した。

9. WIF1 のシグナル伝達をウェスタンブロット法で解析したところ、GSK3 β のリン酸化による不活化が WIF1 存在下で増強していたが、GYS の活性化に影響はなかった。また、wnt シグナルの canonical pathway を抑制しておらず、むしろ β -catenin の核内移行を促進していた。

10. WIF1 を添加した HFI 培地において、細胞内の脂質蓄積、細胞内脂質取り込みが増加し、細胞内脂質蓄積量も増加することを培地上清生化学検査、脂肪滴を構成する遊離脂肪酸であるオレイン酸の取り込み量を、oil red O 染色によって確認した。

11. insulin は脂肪酸合成を促進する一方、Real time PCR による解析の結果から、WIF1 は脂肪酸合成を促進することはなく、トリグリセリド合成律速酵素である DGAT2 の発現を上昇させたことから、細胞内の脂肪滴を構成するトリグリセリドの合成を促進することによって、細胞内脂質の蓄積を増加させることが示された。

12. 無血清培地によって13日間培養したところ、insulin+ WIF1、WIF1、insulin、control を添加したものの順に生細胞数が多く、さらに WIF1 で死細胞率が低いことが分かった。

13. WIF1 によって細胞内の糖・脂質蓄積量が増加した細胞は、無血清の細胞外液にさらされた場合、3 時間後、6 時間後において insulin(-/+)とともに、WIF1 存在下において、生存率が維持されることが分かった。

以上、本研究によって、ヒト培養軟骨細胞の継代培養に伴い発現が減少する WNT inhibitory factor (WIF1) は、培養軟骨細胞の糖・脂質同化に影響を及ぼすことが示された。これまでに詳細に分かっていなかった WIF1 の機能を明らかにしたことは、軟骨再生医療に対して重要な貢献をなすだけでなく、今後の生命科学の発展に寄与するものと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。

以 上