

Title	Evidence that TD-198946 enhances the chondrogenic potential of human synovium-derived stem cells through the NOTCH3 signaling pathway
Author(s)	小林, 雅人
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85265
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	小林 雅人
論文題名 Title	Evidence that TD-198946 enhances the chondrogenic potential of human synovium-derived stem cells through the <i>NOTCH3</i> signaling pathway (TD-198946は <i>Notch3</i> シグナルを介してヒト滑膜幹細胞の軟骨分化能を高める)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕 軟骨組織は主に緻密な細胞外基質で構成された無血管組織であり、外傷や加齢により生じた軟骨損傷は自然修復が起きない難治性組織である。近年、幹細胞を用いた再生医療への期待が高まっている。間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療が期待されている中で、高い軟骨分化能と増殖能を有することが知られている滑膜幹細胞を用いた臨床試験が現在行われている。低分子化合物であるTD-198946は、ヒト滑膜幹細胞を軟骨分化誘導する際に使用することでヒト滑膜幹細胞の軟骨分化を促進させることを報告してきたが、その他の応用方法による軟骨分化への影響は不明である。本研究では、ヒト滑膜幹細胞の維持培養期間にTD-198946刺激を行うことによる軟骨分化能への影響を評価し、その機構の解明を行うこととした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 関節鏡視下手術時に廃棄される余剰滑膜組織から単離・培養したヒト滑膜幹細胞を使用した。ヒト滑膜幹細胞をTD-198946添加条件下で7日間培養した後、軟骨分化誘導因子のBMP2、TGFβ3を用いて28日間の軟骨分化培養を行った。軟骨分化の評価方法として、糖基質および軟骨特異的コラーゲンの産生量測定、軟骨分化関連遺伝子の発現解析を行った。TD-198946での前処理過程では細胞間の結合が促進する様子が捉えられた。軟骨分化誘導を行うと、TD-198946で前処理したヒト滑膜幹細胞は未処理のヒト滑膜幹細胞と比較して糖基質や2型コラーゲンなどが遺伝子レベル、基質レベルで発現上昇しており、TD-198946が滑膜幹細胞の軟骨分化を高めることが示唆された。TD-198946処理後の細胞の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、NOTCH関連遺伝子の発現上昇を認め、pathway解析からもNOTCH signalの関与が示唆された。NOTCH経路の中でもTD-198946処理群で<i>NOTCH3</i>レセプターのタンパク質レベルでの発現上昇がWBにて確認された。蛍光免疫染色では、細胞間接着が亢進している細胞内でHEY2の核内移行が認められた。NOTCH signalは、隣接する細胞同士が直接結合することで細胞間の情報伝達を担っていると言われていたが、NOTCH signal阻害剤のDAPTはTD-198946による細胞間接着および<i>NOTCH3</i>のタンパク質発現を阻害し、ひいてはTD-198946による軟骨分化能の向上もキャンセルしたことからも、TD-198946はNOTCH経路を介して滑膜幹細胞に影響していることが示唆された。 さらに、ヒト滑膜幹細胞の軟骨分化過程において、軟骨分化が進むにつれて<i>NOTCH3</i>が発現上昇することが明らかとなった。TD-198946の前処理は軟骨分化誘導初期から<i>NOTCH3</i>発現を獲得させた上に、軟骨分化期間においても未処理群と比較し常に高く維持していた。このことから、<i>NOTCH3</i>経路が滑膜幹細胞の軟骨分化能を制御するための新たな標的となり得る可能性が示唆された。	
〔総括(Conclusion)〕 TD-198946は<i>NOTCH3</i>シグナルを介してヒト滑膜幹細胞の軟骨分化能を高めることが明らかになり、ヒト滑膜幹細胞の軟骨分化能制御における新しい知見となった。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 小林 雅人		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学寄附講座教授 菅本 一臣
	副 査	大阪大学教授 中田 研
	副 査	大阪大学特任教授 田中 啓之

論文審査の結果の要旨

現在、滑膜幹細胞を用いた軟骨再生治療の研究、臨床試験が行われている。低分子化合物であるTD-198946は、軟骨分化誘導する際に使用することで軟骨分化を促進させることを報告してきたが、その他の応用方法は不明である。本研究では、ヒト滑膜幹細胞の維持培養期間にTD-198946刺激を行うことによる軟骨分化能への影響を評価した。ヒト滑膜幹細胞をTD-198946添加条件下で7日間培養した後、軟骨分化培養を行った。TD-198946を前処理した細胞は、糖基質や2型コラーゲンなどが遺伝子レベル、基質レベルで亢進しており、TD-198946の前処理が軟骨分化を高めることが示唆された。TD-198946処理後の細胞の網羅的遺伝子発現解析では、pathway解析からNOTCH signalの関与が示唆された。NOTCH signal阻害剤のDAPTはTD-198946による軟骨分化能の向上を阻害したことから、TD-198946はNOTCH経路を介して滑膜幹細胞に影響していることが示唆された。このことから、NOTCH経路が滑膜幹細胞の軟骨分化能を制御するための新たな標的となり得る可能性が示唆され、学位の授与に値すると考えられる。