



Title	Chondrocyte-like cells in nucleus pulposus and articular chondrocytes have similar transcriptomic profiles and are paracrine-regulated by hedgehog from notochordal cells and subchondral bone
Author(s)	萩澤, 宏樹
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/92916">https://hdl.handle.net/11094/92916</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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	萩澤 宏樹
論文題名 Title	Chondrocyte-like cells in nucleus pulposus and articular chondrocytes have similar transcriptomic profiles and are paracrine-regulated by hedgehog from notochordal cells and subchondral bone (髄核における軟骨様髄核細胞と関節軟骨細胞は遺伝子発現プロファイルが類似しており、脊索様髄核細胞および軟骨下骨からのヘッジホッグによってパラクライン制御されている)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
<p>椎間板髄核は脊索様髄核細胞 (NCs) と軟骨細胞様髄核細胞 (CLCs) から構成されており、NCsは加齢に伴い消失する。CLCsと軟骨細胞は細胞形態が似ていると報告されている。しかしながら、CLCsとNCsの細胞間相互作用は不明である。本研究の目的は髄核細胞や軟骨細胞がどのように制御されているかを明らかにすることである。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>NCsが存在している3歳のカニクイザルの髄核および関節軟骨を採取し、scRNA-seq解析を行った。その結果、8つのclusterに分けられ、髄核から主に構成される細胞群をNP-dominant cluster、関節軟骨から主に構成される細胞群をAC-dominant cluster、関節軟骨と髄核の両者から構成される細胞群をcommon clusterと定義した。NP-dominant clusterのマーカー遺伝子にはNCsのマーカー遺伝子であるKRT19が同定され、common clusterではCLCsのマーカー遺伝子であるMGPが高発現していたため、髄核内ではNP-dominant clusterがNCsであり、common clusterがCLCsであると考えられた。つまり、CLCsと関節軟骨細胞の一部において遺伝子発現プロファイルが類似していることが示唆された。これらの遺伝子発現プロファイルが類似している細胞群におけるupstream regulatorを調べるために、common clusterとそれ以外のclusterでの発現変動遺伝子を用いてIngenuity pathway analysisを行ったところ、hedgehog pathwayの核内メディエーターであるGLI1が関連していた。細胞間相互作用を調べるためにCellChatを用いて髄核内でのcell-cell interaction analysisを行うとSonic hedgehog (SHH)が発現しているNCsからCLCsへとhedgehog signalingが伝達されていることがわかった。タンパク質レベルで確認するため、ラットの椎間板の免疫染色を行い、脊索様髄核細胞のマーカーであるCK19が陽性である細胞においてSHH陽性である細胞が存在することを認めた。一方で、関節軟骨内ではhedgehogリガンドが発現しておらず、cell-cell interaction analysisでhedgehog signalingが同定されなかった。カニクイザルの大腿骨遠位の免疫染色によりscRNA-seq解析では採取していなかった軟骨下骨周囲にSHHとIndian hedgehogが発現していることがわかった。Hedgehog signalingの効果を調べるために、scRNA-seq解析データからhedgehog signalingを伝達されているクラスターと伝達されていないクラスターの発現変動遺伝子を用いてpathway analysisを行うと、髄核と関節軟骨において共通してHIF-1<math>\alpha</math> signalingが同定された。マウスのprimary chondrocytesを用いて、recombinant SHHを加えた培養実験を行い、western blottingにてHIF-1<math>\alpha</math>のタンパク質発現量を調べると、controlと比較して330 ng/ml投与群においてタンパク質発現レベルを有意に上昇させることがわかった(p &lt; 0.05)。</p>	
〔総 括(Conclusion)〕	
<p>CLCsと関節軟骨細胞の一部は遺伝子発現プロファイルが類似している。これらの細胞は髄核においてはNCsから、関節軟骨においては軟骨下骨から分泌されるhedgehog タンパク質によりparacrine regulationされており、HIF-1<math>\alpha</math> pathwayを亢進させる。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 萩澤 宏樹	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 岡田 誠司
	副 査 大阪大学特任教授 田中 啓之
	副 査 大阪大学教授 中田 研

## 論文審査の結果の要旨

過去には椎間板髄核と軟骨性終板のsingle-cell RNA sequencing (scRNA-seq) 解析により軟骨細胞様髄核細胞と軟骨性終板の軟骨細胞の遺伝子発現プロファイルの類似性について報告されていたが、脊索様髄核細胞と軟骨細胞様髄核細胞の細胞間interactionについて報告されていなかった。本研究において、正常カニクイザルの椎間板髄核と関節軟骨を用いたscRNA-seq解析により関節軟骨細胞の一部と軟骨細胞様髄核細胞は遺伝子発現プロファイルが類似しているということが示された。これらの細胞は髄核においては脊索様髄核細胞から、関節軟骨においては軟骨下骨から分泌されるヘッジホッグタンパク質によりparacrine regulationされており、HIF-1 $\alpha$  pathwayを亢進させるということが、cell-cell interaction analysisとingenuity pathway analysis、ラット尾椎椎間板とカニクイザルの椎間板・大腿骨遠位の免疫染色、マウスprimary chondrocytesを用いたSHHを加えた培養実験によりわかった。

これらの結果を報告した本論文は学位論文に値する。