






氏 名	近藤 真弘
論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)	
<p>Contribution of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway to Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells (ヒト間葉系幹細胞の軟骨細胞分化における IL-6/STAT3 シグナルの関与)</p>	
論文要旨	
<p>【目的】間葉系幹細胞 (MSC) は、軟骨細胞に分化可能な多能性幹細胞である。近年、MSC 様の細胞は軟骨にも存在することが報告され、軟骨の恒常性維持に関与していると考えられる。Interleukin (IL)-6 は pro-inflammatory な作用が良く知られる一方で、標的となる細胞、臓器あるいは周囲の環境に応じて、多彩な生理機能を発揮するサイトカインである。MSC は、定常的かつ大量に IL-6 を産生するが、その生理的意義は不明な点が多い。本研究では、MSC の軟骨細胞分化過程における IL-6 シグナルの関与を検討した。</p>	
<p>【方法】ヒト骨髄由来 MSC を TGF-β3 含有培地でペレット培養する軟骨細胞分化誘導系を用いた。軟骨基質タンパクの蓄積および軟骨マーカー遺伝子の発現を指標に、MSC の軟骨細胞分化に対する影響を解析した。</p>	
<p>【結果・考察】まず、無刺激単層培養下の MSC が産生する液性因子を antibody-based protein array (80 因子) で調べたところ、IL-6 は最も大量に産生される因子であった。ペレット培養による軟骨細胞分化誘導過程の培養上清中においても、分化誘導 3 日目をピークに高濃度の IL-6 が検出された。IL-6 受容体 (IL-6Rα) の発現は、未分化 MSC では低レベルだが、軟骨細胞分化誘導 4 日目から発現が増加し、7 日目をピークに 21 日目まで高い発現レベルが維持された。下流のシグナル分子である STAT3 のリン酸化レベルは、IL-6Rα と同様のパターンで経時的に変動した。これらの結果は、MSC の軟骨細胞分化過程において、MSC が IL-6R を発現することにより、自身の産生する IL-6 の刺激を受容できるようになり STAT3 を活性化していることを示唆した。</p>	
<p>次に、軟骨細胞分化誘導培地中に IL-6 および可溶性 IL-6R (sIL-6R) を共添加することによる影響を検討した。軟骨細胞分化のマスター転写因子である SOX9 の発現とリン酸化レベルは、分化誘導 7 日目に増加したが、IL-6/sIL-6R を共添加すると、リン酸化レベルはさらに増加し、21 日目には軟骨マーカー遺伝子 (Type II collagen / Aggrecan / Type X collagen) の発現、および、軟骨基質の蓄積が亢進した。逆に、IL-6R 下流分子である STAT3 をノックダウンすると、軟骨基質と軟骨マーカー遺伝子発現は阻害された。これらの結果から、MSC の軟骨細胞分化促進メカニズムの一つとして、IL-6/STAT3 シグナルを介した SOX9 リン酸化亢進による軟骨基質遺伝子の転写活性化が考えられた。</p>	
<p>最後に、外側型の変形性膝関節症 (OA) 患者から採取した、大腿骨内側の非変性軟骨における、IL-6 と CD166/Nestin (MSC のマーカータンパク) の局在を調べた。その結果、IL-6 と MSC マーカーは、軟骨表層領域で共局在したことから、軟骨に存在する MSC 様細胞の近傍には IL-6 が存在し、MSC 様細胞自身が IL-6 を産生している可能性が考えられた。</p>	
<p>【結論】以上の結果より、MSC の軟骨細胞分化過程において、IL-6/STAT3 シグナルの活性化は、軟骨細胞分化を正に制御することが示唆された。また、ヒトの関節軟骨には MSC 様の軟骨細胞前駆細胞が存在し、その近傍には IL-6 が存在することから、IL-6 は MSC 様細胞の軟骨細胞分化を促進させることにより、軟骨組織の恒常性維持・自己修復に寄与する可能性が考えられた。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	近藤 真弘			
論文審査委員	主査 所属	障害機構系	災害外科部門	酒井 昭典 
	副査 所属	生体適応系	生体機構部門	岩井 佳子 
	副査 所属	生体情報系	病態情報部門	川崎 貴士 
		系	部門	
		系	部門	

論文題目

Contribution of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway to Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells.

(ヒト間葉系幹細胞の軟骨細胞分化における IL-6/STAT3 シグナルの関与)

学位論文審査結果要旨

【背景と目的】間葉系幹細胞 (MSC ; mesenchymal stem cell) 様の軟骨前駆細胞が損傷軟骨を自己修復し、関節軟骨の恒常性を維持していることが近年報告されている。無刺激で単層培養した MSC からは定常的に多量の Interleukin (IL) -6 が産生されることが知られている。著者らは、MSC の軟骨細胞への分化過程における IL-6 の関与を明らかにすることを目的に本研究を行った。

【方法と結果】健常ヒト骨髄由来 MSC を TGF-β 含有培地で最長 21 日間ペレット培養し、軟骨細胞分化誘導を行った。7 日目に軟骨基質タンパクの発現を調べるために Western blotting を、21 日目にペレットサイズの評価、組織染色、軟骨マーカー遺伝子の mRNA 発現を調べるために real-time PCR を行った。得られた結果は下記の通りである。

- 1) ペレット培養した MSC の培養上清中において高濃度の IL-6 を検出した。ペレットでは IL-6 受容体の発現と STAT3 のリン酸化促進を確認した。
- 2) IL-6 と可溶性 IL-6 受容体の共刺激は MSC から軟骨細胞への分化を促進した。
- 3) 可溶性 IL-6 受容体だけの刺激でも軟骨細胞分化を促進するが、共刺激のほうが強力に促進した。
- 4) IL-6 と可溶性 IL-6 受容体の共刺激は MSC における SOX9 のリン酸化を促進した。
- 5) STAT3 ノックダウンにより MSC から軟骨細胞への分化は阻害された。
- 6) 抗 IL-6 受容体抗体により MSC から軟骨細胞への分化は阻害された。
- 7) ヒト膝関節軟骨において MSC 様細胞と IL-6 は共局在していた。

これらの結果から、著者らは IL-6/STAT3 シグナルの活性化は SOX9 のリン酸化を介して MSC の軟骨細胞分化を正に制御すること、ヒト膝関節軟骨において MSC 様細胞と IL-6 は共局在することを明らかにした。

【結論】 IL-6/STAT3 シグナルはヒト間葉系幹細胞の軟骨細胞分化を促進することに関与している。

【審査結果】本研究は、IL-6/STAT-3 シグナルを介して MSC の軟骨細胞分化が促進されることを明らかにした点において新規性があり、今後、関節軟骨の外傷性欠損や変性疾患に対する新規治療法の開発においても重要な知見であると考えられ、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 28 年 7 月 28 日