

氏 名	畚野 里紗
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7454号
学位授与の日付	令和 8年 3月 25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Yes 関連タンパク質1を介したペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ による軟骨細胞死の制御
論文審査委員	岡元 邦彰 教授 池亀 美華 准教授 大野 充昭 准教授

学位論文内容の要旨

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ)は、脂肪分化や代謝制御、細胞死や炎症など多様な細胞機能を調節する核内受容体である。軟骨組織では、PPAR γ が細胞外マトリックス産生を抑制し軟骨細胞分化を阻害するとの報告がある一方、PPAR γ 欠損マウスでは軟骨形成不全や変形性関節症(OA)の悪化がみられることから、その作用は一義的でなく、詳細な分子メカニズムは不明なままである。本研究は、PPAR γ の軟骨細胞における機能を明らかにすることを目的とした。

まず、ヒト間葉系幹細胞(MSC)のRNA-seq データおよびATDC5細胞の分化誘導系を用いて解析したところ、Ppargは分化初期と終末成熟期の二つの段階で発現が上昇することが明らかとなった。この二相性発現から、PPAR γ が双方で異なる役割を持つ可能性が考えられる。そこで本研究では、CRISPR/Cas9によってPpargノックアウト(Δ PPAR γ) ATDC5細胞を樹立し機能解析を行った。 Δ PPAR γ ATDC5細胞では、PPAR γ は消失し、mRNAレベルも著しく低下していた。これらの細胞では増殖速度が低下し、CCK-8アッセイでも有意な細胞生存率の減少が認められた。一方、PPAR γ アゴニストGW1929添加により細胞生存率は上昇した。続いてPPAR γ の軟骨細胞分化初期段階での機能に焦点を当て、既報に基づきPPAR γ がフェロトーシス抑制作用を持つことに着目し、フェロトーシス指標である細胞内鉄イオン濃度を測定した結果、 Δ PPAR γ 細胞では有意な鉄イオンの蓄積が認められ、GW1929はこれを減少させた。また、パイロトーシスの指標GSDME

は、 Δ PPAR γ ATDC5細胞でむしろ低下しており、PPAR γ 欠損による細胞死亢進はパイロトーシスではなくフェロトーシスに起因する可能性が示された。さらに、フェロトーシス抑制遺伝子Fth1やパイロトーシス促進遺伝子Nlrc4の発現を解析したところ、 Δ PPAR γ ATDC5細胞ではこれらの発現が低下していた。これらの遺伝子は転写共役因子YAP1の標的であることが知られているため、YAP1の核移行を評価したところ、 Δ PPAR γ ATDC5細胞およびGW1929添加細胞の双方で核移行率が低下しており、PPAR γ 活性の変化とYAP1核移行との複雑な関係が示唆された。免疫蛍光解析ではPPAR γ が主に細胞質に局在し、YAP1と核周囲で部分的に共局在することが観察された。このことからPPAR γ はYAP1と直接複合体を形成してYAP1を核へ輸送するのではなく、細胞質においてYAP1の修飾や安定性を介して間接的に核移行を調節している可能性が考えられる。

以上より、PPAR γ は軟骨細胞分化の初期段階では細胞生存を支持する役割を持つことが明らかになった。この過程にはYAP1が関与し、PPAR γ は細胞質におけるYAP1制御を介して細胞死関連遺伝子発現を調節していると考えられる。

論文審査結果の要旨

【緒言】ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) は、核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、脂質代謝、細胞分化、炎症制御など多彩な生理機能を担う。近年、PPAR γ がフェロトーシスやパイロトーシスなどのプログラム細胞死を制御することが報告されている。軟骨の細胞や組織においては、PPAR γ が軟骨細胞分化を抑制する報告がある一方で、PPAR γ 欠損マウスによる解析では、軟骨形成不全に関与するという報告もあり、軟骨に関するPPAR γ の分子機構はまだ十分には解明されていない。そこで本研究では、軟骨細胞死制御機構に着目し、PPAR γ の機能を分子細胞生物学的に解析することを目的とした。

【方法】NCBI GEOの公共データのRNAシーケンスをもとに、ヒト間葉系間質細胞 (MSC) の軟骨細胞分化に伴う遺伝子発現量変化を確認した。マウス軟骨前駆細胞ATDC5細胞を用い、軟骨細胞分化に伴う遺伝子発現変化をRT-qPCRにより解析した。CRISPR/Cas9システムにより *Pparg* ノックアウト (KO) ATDC5細胞を樹立し、DNAシーケンス、RT-qPCR、ウェスタンブロッティングにより、実際にPPAR γ がノックアウトされているかを確認した。細胞生存率はCCK-8法で、フェロトーシスは細胞内鉄イオン濃度により、パイロトーシスは抗GSDME抗体に対するウェスタンブロッティングにより評価した。YAP1の核移行は免疫蛍光染色およびArrey scanにより解析した。YAP1とPPAR γ の細胞内局在は共焦点顕微鏡で観察した。

【結果】MSCおよびATDC5細胞の軟骨細胞分化過程において、PPAR γ は分化初期および後期で発現が二相性に上昇する傾向を示した。*Pparg* KO ATDC5細胞では細胞増殖および生存率が有意に低下し、反対にPPAR γ アゴニスト添加によりそれは増加した。さらに*Pparg* KO ATDC5細胞では細胞内鉄イオン濃度が上昇する一方、GSDME発現は低下しており、PPAR γ によってフェロトーシスは抑制されるが、パイロトーシスは促進されることが示唆された。また、PPAR γ KOによりYAP1の核移行率が低下し、YAP1標的遺伝子である、フェロトーシス抑制遺伝子 *Fth1*、パイロトーシス促進遺伝子 *Nlrc4* の発現も減少した。免疫蛍光染色により、PPAR γ とYAP1が細胞質の核周囲領域で部分的に共局在することが観察された。

【考察】本研究より、PPAR γ は軟骨細胞分化初期において細胞生存維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。その主たる機構は、フェロトーシス抑制を介するものであり、細胞内鉄代謝制御が関与すると考えられる。さらに、軟骨細胞において、PPAR γ は細胞質でYAP1の核移行を調節する非典型的機能を有する可能性が示唆された。

本研究では、PPAR γ が軟骨細胞分化初期における細胞死制御を担う可能性を示唆している。得られた成果は新規性に富んでおり、また軟骨疾患における新規治療薬を開発する上での基礎となる研究である。今後、PPAR γ とYAP1との詳細な関連性の解明が期待される。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。