

論文内容の要旨

Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells

—新規 SCRG1/BST1 軸は間葉系幹細胞の自己複製、遊走、骨分化能を調節する—
(Scientific Reports、平成 26 年 1 月)

あおまつ えみこ
青松 恵美子

I. 研究目的

間葉系幹細胞 (MSC) は自己複製や多分化能を有し、再生医療への期待が高い。しかし MSC を *in vitro* で長期培養すると、自己複製能や分化能が著しく低下することが報告されている。本研究では MSC の自己複製・遊走・骨分化能といった潜在的な能力を維持する因子を同定し、それに起因する細胞内シグナル伝達経路を解析することを目的とした。

II. 研究方法

1. ヒト初代培養 MSC (hMSC) を骨芽細胞へと分化誘導させ、DNA マイクロアレイで遺伝子発現の変動を網羅的に解析した。この過程で発現が減少する遺伝子を詳細に検討し、骨分化能を維持する可能性が高い因子として Scrapie responsive gene 1 (SCRG1) を同定し、その性状について解析した。
2. MSC 培養株 UE7T-13 にアデノウイルスベクター-pAdSCRG1-FLAG を感染させて SCRG1-FLAG を過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた IP-Western 法により SCRG1 の受容体を検索した。
3. UE7T-13 を組換えヒト SCRG1 ペプチド (rhSCRG1) 処理、または pAdSCRG1-FLAG を用いて SCRG1 を過剰発現させた。SCRG1 誘導性の細胞内シグナル伝達経路について mitogen-activated protein kinases (MAP キナーゼ) ならびに phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt 経路を中心に、抗リン酸化抗体を用いた Western Blot 法で検索した。
4. UE7T-13 における SCRG1 誘導性の遊走活性を Trans-Well Migration Assay 法で評価した。この遊走活性を調節する細胞内シグナル伝達経路について抗リン酸化抗体を用いた Western Blot 法で調査した。
5. UE7T-13 における骨分化能への SCRG1 の影響を Alizarin Red 染色で評価した。さらに骨分化能を調節する細胞内シグナル伝達経路について特異的阻害剤を用いて検索した。
6. 5 継代の経過した hMSC に rhSCRG1 を添加してさらに 10 継代培養した。長期間培養後の hMSC における自己複製、遊走、骨分化能を評価した。

III. 研究成績

1. SCRG1 の性状を評価したところ、約 9 kDa の分泌性ペプチドであることが示された。
2. SCRG1 は膜タンパク Bone marrow stromal cell antigen 1 (BST1) を受容体とし、integrin $\beta 1$ と複合体を形成した。
3. SCRG1 は extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), Akt のリン酸化を増強した。
4. SCRG1 は UE7T-13 の遊走を濃度依存的に促進した。その促進効果は PI3K ならびに focal adhesion

kinase (FAK)阻害剤処理で抑制された。

5. SCRG1 は UE7T-13 の骨芽細胞への分化を濃度依存的に抑制した。その抑制効果は PI3K ならびに FAK 阻害剤処理で解除された。
6. rhSCRG1 を添加して長期間培養された hMSC は CD271 と Oct-4 の発現を維持した。さらに長期間培養前の hMSC と同様に自己複製、遊走さらには骨分化能が維持された。

IV. 考察及び結論

本研究では MSC の自己複製・遊走・骨分化能といった潜在的な能力を維持する因子として、SCRG1 を同定した。SCRG1 は哺乳動物において高度に保存された遺伝子であるにも関わらず、その性状や機能は明らかになっていない。MSC における rhSCRG1 処理は MAP キナーゼと PI3K/Akt 経路を活性化した。また SCRG1 の性状を詳細に解析した結果、細胞外に分泌されるペプチドであることが示された。すなわち、SCRG1 の未知の受容体は細胞膜に存在することを示唆している。本研究において、SCRG1 が受容体 BST1 を介して integrin β 1 と複合体を形成することが初めて明らかにされた。BST1/integrin β 1 複合体は FAK/PI3K/Akt の活性化を介して単球の血管外遊走を促進することが報告されている。そこで MSC における遊走能への影響を検討した結果、SCRG1 は FAK/PI3K/Akt 経路を活性化し MSC の遊走能を促進した。さらに SCRG1 は FAK/PI3K/Akt 経路を活性化することによって MSC の骨芽細胞への分化を停止することも示された。一方、rhSCRG1 を添加して長期培養された hMSC は MSC マーカーである CD271 の発現、自己複製能、さらには骨分化能も長期培養前と遜色なく維持された。CD271⁺/CD90⁺/CD106^{high}を示す MSC は高い自己複製能と多分化能を有することが報告されている。興味深いことに、rhSCRG1 添加によって胚性幹細胞 (embryonic stem cell (ES 細胞)) やより未分化な MSC で発現する Oct-4 の発現も維持された。

これらの結果から、SCRG1 は MSC の自己複製・遊走・骨分化能といった潜在的な能力を維持することが示された。本研究の結果は、*in vitro*における MSC の長期培養において rhSCRG1 を添加することでその潜在的な能力を維持しつつ、長期培養が可能となることを強く示唆している。将来的に本研究で作製された rhSCRG1 を利用することで、骨再生を目指した細胞治療への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

- 主査 教授 加藤 裕久 (薬理学講座 病態制御学分野)
副査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 教授 三浦 廣行 (口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野)

骨髓等から採取可能な成体幹細胞としての MSC を用いた骨形成療法を実現させるためには、十分な MSC 細胞数を確保することが必要とされる。このためには、生体外に取り出した MSC を細胞培養にて骨形成に必要な細胞数まで増殖させてから、骨形成予定域に移植する必要がある。しかし、一般的に、MSC では細胞培養による増殖に伴って幹細胞能力としての分化能力や遊走性は低下することが判明している。青松らは、間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) が骨芽細胞 osteoblast (OB) へ分化する際にその発現が減少する分子について網羅的に調査することにより、MSC の OB 分化能力に係る新規分泌性シグナル伝達分子として SCRG1 を発見した。興味深いことに、SCRG1 を添加して長期培養された MSC は、自己複製能、さらには骨分化能も長期培養前と遜色なく維持された。また SCRG1 は、膜タンパク BST1 を受容体とし、integrin β 1 と複合体を形成することを見出した。BST1/integrin β 1 複合体は単球の血管外

遊走を促進することが報告されているため、SCRG1がMSCの遊走能に及ぼす影響について調査したところ、SCRG1を添加して長期培養されたMSCは、その遊走能が長期培養前と遜色なく維持された。これらの研究成果により、青松らは、SCRG1/BST1によるシグナルがMSCの*in vitro*における増殖時に認められる幹細胞能力の低下を抑止する働きがあることを見出して学位審査論文として発表した。一方、青松らは、これらの研究成果に加え、MSCのN-cadherinを介した細胞間接着はSrcならびにPDGF受容体 β をリガンド非依存的に活性化し、CD106の発現を誘導することを明らかとした。CD106の発現は潜在的な能力を維持するMSCの重要な指標とされていることから、MSCとしての能力を維持するためには、MSCどうしの細胞間接着が重要な要素であることが判明し、この研究成果を学位審査のための参考論文として発表している。

今回の青松らの発見によれば、細胞間接着が保持された環境でSCRG1を作用させてMSCを増殖させることで、OB分化能力や遊走性が維持された骨形成能力の高いMSCを十分数獲得できることが示された。これらの発見は、顎骨再生を目指した細胞治療への応用、さらには歯根膜中のMSCの潜在的な能力を高める治療法開発への応用等、新規歯科治療法への貢献が大いに期待されるものであり、学位に値すると評価した。

試験・試問結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究方法、結果や考察に対する試問に適切な回答がなされていた。よって、学位に値する学識と研究能力を有すると判断した。

参考論文

Cell-cell adhesion through N-cadherin to enhance the expression of VCAM-1 via PDGFR β by ligand-independent manner in mesenchymal stem cells
(Emiko Aomatsu, 他4名と共著)

International Journal
of Molecular Medicine

平成26年
掲載予定