

論文内容の要旨

VEGF-C and TGF- β reciprocally regulate commitment of mesenchymal stem cells to differentiation into lymphatic endothelial or osteoblastic phenotypes.

間葉系幹細胞の骨芽細胞ならびにリンパ管内皮細胞への分化は VEGF-C と TGF- β によって相互に調節される

(International Journal of Molecular Medicine 平成 28 年掲載予定)

いがらし やすゆき
五十嵐 靖之

I. 研究目的

骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の増殖や分化は様々な成長因子やサイトカインによって調節されている。最近の我々の研究では、green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウス骨髄由来 MSC 株 (SG-2, SG-3, SG-5) を樹立し、これら MSC 株の特性について報告した。各 MSC 株の遺伝子発現を比較し、SG-2 のみにみられる特異的な遺伝子発現を解析するために DNA マイクロアレイ分析を行った。SG-2 で高発現された遺伝子の中から、Flt4 遺伝子産物として知られる血管内皮細胞増殖因子受容体 3 (VEGFR3) に焦点を当てた。本研究では GFP トランスジェニックマウス骨髄由来 MSC における TGF- β 受容体ならびに VEGF 受容体に特異的なリガンドが MSC の細胞動態に与える影響について解析した。

II. 研究方法

最も効率良く骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を示した SG-2 において特異的に発現する遺伝子を網羅的に検索したところ、Flt4 (VEGF 受容体 3、VEGFR3) が同定された。この結果は、フローサイトメトリー分析を用いて確認した。また、SG-2 を VEGFR3 の特異的なリガンドである VEGF-C で処理し、シグナル伝達経路ならびに増殖能、遊走能、分化能をそれぞれ評価した。

III. 研究成績

SG-2 を VEGFR3 の特異的なリガンドである VEGF-C により処理したところ、細胞増殖能、細胞遊走能、および ERK1/2 のリン酸化が有意に促進された。加えて、VEGF-C が、リンパ管内皮細胞マーカーである PROX1 と Lyve1 の発現を促進させただけでなく、骨形成分化マーカーの発現を抑制した。対照的に、TGF- β は骨芽細胞の分化初期に発現する Runx2 と Alpl の発現を促進し、リンパ管内皮細胞マーカーだけでなく骨芽細胞分化の後期に発現する Ibsp と Bglap の発現をも抑制した。

IV. 考察及び結論

VEGF-C は Flt4 陽性 MSC におけるリンパ管内皮細胞マーカーの発現を促進するとともに、骨芽細胞マーカーの発現を抑制した。一方、TGF- β は骨芽細胞分化初期マーカーの発現を促進するとともに、リンパ管内皮細胞マーカーの発現を抑制した。したがって、MSC の骨芽細胞ならびにリンパ管内皮細胞への分化は VEGF-C と TGF- β によって相互に調節されることが示された。一方、VEGF-C と TGF- β はともに骨芽細胞分化の後期を抑制する可能性が示唆された。加えて、VEGF-C は MSC の特徴としての増殖や遊走を促進することから、VEGF-C は、MSC の特性を決定する上で重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 杉山 芳樹 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)

副査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)

副査 教授 近藤 尚知 (補綴・インプラント学講座)

抜歯後の歯槽骨の吸収が著しい場合、インプラントによる治療は困難となるため、骨造成手術が適用される。失われた歯槽骨または顎骨の骨量回復におけるゴールドスタンダードは自家骨移植とされているが、術後疼痛や腫脹など、侵襲が大きいという短所もある。抜歯後の骨量維持または骨再生を促す目的で、新規生体材料の開発や成長因子の制御等、自家骨移植に代わる骨造成法が試みられており、なかでも、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は、種々の成長因子やサイトカインによって増殖や分化が調節されており、骨芽細胞にも分化することが可能であることから、MSC を応用した組織再生療法が注目されている。

著者らは、green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウス骨髄由来 MSC 株 (SG-2, SG-3, SG-5) を樹立し、これら MSC 株の骨芽細胞分化能について報告してきた。樹立された細胞株の中から線維芽細胞様細胞の形態を示し、かつ増殖能に優れた 4 細胞株、SG-2、SG-3、SG-5、SG-6 を選択して、本研究に用いた。樹立した細胞株については MSC マーカーの発現を確認するとともに、各種成長因子ならびに受容体の発現を検索した。その結果、最も効率良く骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を示したのは SG-2 であり、TGF- β を作用させることによって骨芽細胞へ分化することを確認した。さらに他の MSC 株と比較して、SG-2 にのみ発現する特異的な遺伝子を同定するため、DNA マイクロアレイ分析を行い、高発現された遺伝子の中に、Flt4 遺伝子産物として知られる血管内皮細胞増殖因子受容体 3

(VEGFR3) を認めた。そして VEGFR3 に結合するリガンドである VEGF-C を選択し、マウス骨髄由来 MSC (SG2 株) 培養系における、TGF- β 受容体ならびに VEGF 受容体の特異的リガンドの細胞動態に与える影響について解析した。SG-2 株に VEGF-C を作用させ、細胞増殖能、遊走能、分化能ならびに細胞内シグナル伝達経路を検索したところ、細胞増殖能、遊走能および ERK1/2 のリン酸化が有意に促進された。加えて、VEGF-C が、リンパ管内皮細胞マーカーである PROX1 と Lyve1 の発現を促進させただけでなく、骨形成分化マーカーの発現を抑制した。対照的に、TGF- β は骨芽細胞の分化初期に発現する *Runx2* と *Alpl* の発現を促進し、リンパ管内皮細胞マーカーだけでなく骨芽細胞分化の後期に発現する *Ibsp* と *Bglap* の発現をも抑制した。

以上の結果から、VEGF-C は Flt4 陽性 MSC におけるリンパ管内皮細胞マーカーの発現を促進するとともに、骨芽細胞マーカーの発現を抑制することが明らかとなった。一方、TGF- β は骨芽細胞分化初期を示唆するマーカーの発現を促進したが、リンパ管内皮細胞マーカーの発現を抑制した。さらに VEGF-C と TGF- β はともに骨芽細胞分化課程の後期における骨分化能を抑制する可能性が示唆された。上記より、VEGF-C は MSC の特徴としての増殖や遊走を促進することから、VEGF-C は、MSC の細胞増殖の制御に関わる重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、MSC の骨芽細胞ならびにリンパ管内皮細胞への分化は VEGF-C と TGF- β によって拮抗的に調節されることが示唆された。すなわち MSC の各組織への分化方向が決定していない未成熟なステージでは VEGF-C によって増殖活性を高め、その後に TGF- β によって骨芽細胞へ分化誘導することも可能と考えられ、本研究の成果が MSC による効率的な骨造成術の開発につながることも期待できる。

以上の結果から、MSC の分化過程における VEGF-C と TGF- β の作用の特徴が明らかとなり、低侵襲な骨

造成法の開発ならびにインプラント治療に貢献するものと考えられ、学位論文に値すると評価した。

備考：主査・副査から五十嵐に対して、多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

杉山 教授より

問：本研究の背景は何か。

答：歯科インプラント等の欠損補綴の成否は顎骨の骨量によって左右されるため、生体材料の開発や各種成長因子の影響、体性幹細胞の利用など骨組織再生に関する様々な試みがなされている。とくに骨芽細胞への分化能の高いMSCは骨組織再生療法への応用が期待されている。本研究では、移植後のMSC株の体内動態をトレース可能にするため、GFPトランスジェニックマウス骨髄由来MSC株(SG-2, SG-3, SG-5)を樹立し、*in vivo*移植することにより効率的な骨組織形成を可能とする細胞治療の樹立を目指す。

問：MSC株樹立の際、SG-2、SG-3、SG-5以外の細胞はなぜ選択されなかったのか。

答：GFPマウス骨髄からMSC様細胞を採取し、不死化遺伝子の導入、薬剤耐性選択、さらには限界希釈法により単一細胞由来細胞株を樹立した。樹立された細胞株の中から線維芽細胞様細胞の形態を示し、かつ増殖能に優れた4細胞株、SG-2、SG-3、SG-5、SG-6を選択した。4細胞株をflow cytometryを用いてマウスMSCマーカーの発現を調査した結果、SG-6ではMSCマーカーが殆ど検出されなかったため除外した。

問：DNAマイクロアレイの結果、100種類以上のマーカーに差があるが、なぜFlt-4を選択したのか。

答：SG-2と比較した際、SG-3およびSG-5より10倍以上強く発現した105の遺伝子が明らかになった。様々な組織からMSCを採取した際、細胞表面抗原は、MSC識別のために有用であるため、我々は、これら遺伝子のうち、MSC識別に有用であり、分化に関与するFlt4遺伝子産物として知られるVEGFR3に焦点を当てた。他に細胞表面抗原は、Cd33やTlr8などがあるが、分化には関与せずMSC識別に有用ではないと判断し、除外した。

問：ERKの作用は何か。また、ERKのリン酸化が促進したことで何が言えるのか。

答：MAPキナーゼカスケードは、細胞の増殖、遊走、分化、生存の決定に最も重要なシグナル伝達経路である。MAPキナーゼカスケードにはERK経路、JNK経路、p38経路が存在し、ERK経路は細胞増殖や分化を制御する働きがある。ERK1/2のリン酸化が促進することで、分化を抑制し、細胞増殖を促進する。

石崎教授より

問：TGF-βとVEGFを用いた理由はなにか。

答：我々はTGF-βが骨髄由来MSCの骨芽細胞分化を促進することを報告し(Yokota et al., Int J Mol Med. 2014)、さらに骨芽細胞分化にはTGF-βが必須であることを報告してきた。さらにTGF-βとPDGFを同時添加した際、骨芽細胞への分化能が増強されることを明らかにした(Yokota et al., Int J Mol Med. 2014)。本研究で樹立したSG-2株においてもTGF-βに対する応答性がみられ(Sawada et al., Int J Mol Med. 2015)、TGF-βの骨芽細胞への分化促進作用が確認された。一方、マイクロアレイ解析の結果、SG2

株では、他の細胞株と比較して、VEGF 受容体 3 の高発現が確認できたため、そのリガンドである VEGF の効果に着目することとなった。VEGF は血管新生にも関与する因子であり、骨組織再生の場でも重要な役割を果たすものと考えられる。上記背景から、TGF- β と VEGF の骨形成促進作用およびそれらの相乗効果について検討を行った。

問： 発生の過程とは異なるのか。

答： 再生医療では様々な成長因子を制御することで、発生における現象と近い経路で分化を促進させるものであり、必ずしも発生の過程と同様でないを考える。発生過程では未分化な細胞が様々な成長因子の作用を受け、形態形成遺伝子の発現を制御し分化を起こすが、再生医療はこれら成長因子と形態形成遺伝子を人為的にコントロールし、分化を引き起こすものである。

近藤教授より

問： 定量的 RT-PCR は Taq Man、SYBR どちらを使ったのか。また、その理由は。

答： リアルタイム PCR の検出法にはインターカレーター (SYBR[®] Green I) を用いる方法と蛍光標識プローブ (Taq Man) を用いる方法の 2 種類がある。インターカレーターを用いる方法は、2 本鎖 DNA をすべて検出するため、各遺伝子に特異的なプローブを用意する必要がなく、安価であり、反応系の構築も容易である。一方、蛍光標識プローブを用いる方法は、高価ではあるが、検出特異性が高いので相同性の高い配列同士も区別して検出できる。本研究においては、目的とする遺伝子が相同性の高い配列ではないので、安価で構築の容易なインターカレーター (SYBR[®] Green I) を用いる方法である SYBR[®] Premix Ex Taq II (Takara) を用いた。

問： Alpl と ALP、Ibsp と BSP はどう違うのか。

答： alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (Alpl) はアルカリフォスファターゼ (ALP) を合成する遺伝子のことを意味し、骨芽細胞分化初期から中期に重要な役割を担っている。また、Ibsp は integrin-binding sialoprotein の略号であり、骨シアロタンパク質 (BSP) を合成する遺伝子を差し、骨芽細胞分化中期から後期に重要な役割を担っている。

試験・試問結果の要旨

本論文の審査においては、上記に示すように、主査・副査から多岐にわたる質問があり、それに対する的確な回答がなされたことから、本学の博士課程において十分な知識と主技を修得したものと考えられる。一連の学位審査の結果から、博士 (歯学) の学位を授与することを適当と認める。

参考論文 なし