

岩手医科大学 学位審査報告

氏 名 よし だ まり こ
吉 田 茉莉子

学位の種類 博士（歯学）

学位授与番号 岩医大院歯博第 286 号

学位授与の日付 平成25年 3 月 8 日

学位論文題目 TGF- β -operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals.
- 歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞における TGF- β による Smad と p38 MAPK 経路を介した増殖抑制ならびに平滑筋細胞分化誘導 -

論文内容の要旨

I 研究目的

歯周靭帯 periodontal ligament (PDL) 由来細胞の増殖や血管構成細胞分化を制御する細胞内シグナル伝達経路の詳細は明らかにされていない。これまでに、大久保らは、ラット PDL 由来線維芽細胞様細胞 SCDC2 が、三次元培養下で血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cells (EPC) 様に血管内皮細胞 endothelial cell (EC) マーカー陽性の血管様構造物を形成することを明らかにして報告した。今回、我々は、血管内皮-間葉転換誘導作用を持つとされる transforming growth factor- β (TGF- β) が、SCDC2 細胞の増殖や EC および平滑筋細胞 smooth muscle cell (SMC) 分化に及ぼす影響について調査した。さらに、TGF- β 誘導性の Smad2/3 シグナルならびに p38-mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) シグナルが、この細胞の増殖・分化にどのように影響するかについて調査を進めた。

II 研究方法

細胞増殖活性の測定は AlamarBlue 代謝測定法により行い、EC ならびに SMC 分化の程度は定量的 RT-PCR 法と免疫蛍光細胞染色法とを用いた血管内皮細胞マーカー (Tie-2, VE-cadherin) と平滑筋細胞マーカー (alpha-smooth muscle actin (α -SMA), h1-calponin, ならびに SM22 α) の発現解析により調査した。TGF- β シグナル経路の解析は、シグナル分子のリン酸化部位認識抗体を用いたウエスタンブロット法と各種シグナル経路特異的阻害剤を用いて行った。また、特に Smad2/3 経路の阻害は抑制性 Smad (Smad7) の過剰発現系により行った。

III 研究成果

1. TGF- β は、濃度依存的に SCDC2 細胞の増殖を抑制した。また、TGF- β が濃度依存的に EC マーカー Tie-2 の発現を抑制することや、SMC マーカーの発現を誘導することが明らかになった。TGF- β によるこれらの効果は、TGF- β の I 型受容体キナーゼ阻害剤である SB-431542 の添加により抑制された。
2. TGF- β は、SCDC2 細胞における Smad2 と p38 MAPK のリン酸化を誘導することが判明した。次いで、SCDC2 細胞に Smad7 を過剰発現させて Smad2 シグナルを阻害したところ、TGF- β による増殖抑制効果は完全に解除された。しかし、p38 MAPK の特異的阻害剤 SB 203580 では、この TGF- β による増殖抑制効果は解除されなかった。
3. TGF- β による EC マーカー Tie-2 の発現抑制効果は SB 203580 により解除されたが、Smad7 では解除されなかった。これとは対照的に、TGF- β による SMC マーカーの発現誘導効果は Smad7 の過剰発現により抑制されたが、SB 203580 では解除されなかった。また、興味深いことに、この TGF- β 誘導性の SMC 分化は、その後の fibroblast growth factor (FGF) 処理により脱分化された。

IV 考察及び結論

1. 抑制型 Smad7 により、TGF- β で誘導される SCDC2 細胞の増殖抑制効果が解除されることから、この SCDC2

細胞の増殖抑制効果は Smad2 シグナル依存的であることが示唆された。

2. TGF- β 誘導性の Smad シグナルにより SMC 分化が誘導される一方、TGF- β 誘導性の p38 MAPK シグナルにより EC 分化が抑制されることが明らかとなった。

3. TGF- β により誘導された SCDC2 細胞の SMC 分化は、その後の FGF 添加により脱分化されることから、この細胞の TGF- β による SMC 分化は完全分化ではなく、初期分化である可能性が示唆された。

これらの結果より、歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞においては、TGF- β シグナル経路依存的にその増殖や血管内皮細胞分化あるいは平滑筋細胞分化が調節されると考えられた。以上の研究成果は、歯周靭帯周囲組織の再生に必要な局所の血液循環を改善する Cell Therapy 確立のために役立つ重要な研究基盤であると考えられる。

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 八重柏 隆 (歯科保存学講座 歯周療法学分野)

歯周靭帯 periodontal ligament (PDL) 由来細胞の増殖や血管構成細胞分化を制御する細胞内シグナル伝達経路の詳細は明らかにされていない。これまで、大久保らにより、PDL 由来線維芽細胞様細胞 SCDC2 が、三次元培養下で血管内皮前駆細胞 (EPC) 様に血管内皮細胞 (EC) マーカー陽性の血管様構造物を形成することが明らかにされている。今回、吉田らは、内皮-間葉転換誘導作用を持つとされる Transforming growth factor- β (TGF- β) が、SCDC2 細胞の増殖や EC および平滑筋細胞 (SMC) 分化に及ぼす影響について調査した。さらに、TGF- β 誘導性の Smad2/3 シグナルならびに p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) シグナルが、この細胞の増殖・分化にどのように影響するかについて調査した。

TGF- β は、濃度依存的に SCDC2 細胞の増殖を抑制した。また、TGF- β が濃度依存的に EC マーカーの発現を抑制することや、SMC マーカーの発現を誘導することが明らかになった。加えて、TGF- β は、SCDC2 細胞における Smad2/3 と p38 MAPK のリン酸化を誘導することが判明した。次いで、SCDC2 に Smad7 を過剰発現させて Smad2/3 シグナルを阻害したところ、TGF- β による増殖抑制効果は完全に解除された。しかし、p38 MAPK の特異的阻害剤 SB 203580 では、この TGF- β による増殖抑制効果は解除されなかった。一方、TGF- β による EC マーカー Tie-2 の発現抑制効果は SB 203580 により解除されたが、Smad7 では解除されなかった。これとは対照的に、TGF- β による SMC マーカーの発現誘導効果は Smad7 の過剰発現により抑制されたが、SB 203580 では解除されなかった。興味深いことに、TGF- β 誘導性の SMC マーカーの発現誘導は、fibroblast growth factor (FGF) 処理により解除された。

以上の結果から、TGF- β で誘導される SCDC2 細胞の増殖抑制効果は Smad2/3 を介していることが示唆された。また、TGF- β 誘導性の Smad2/3 シグナルにより SMC 分化が誘導される一方、TGF- β 誘導性の p38 MAPK シグナルにより EC 分化が抑制されることが示唆された。また、この TGF- β による SCDC2 細胞の SMC 分化誘導効果が FGF により解除されることから、この TGF- β により認められる SMC 様分化は完全分化ではなく、初期分化の段階に留まっている可能性が示唆された。これらの研究成果は、PDL 周囲組織の再生に必要な局所の血液循環を改善する Cell Therapy 確立のために役立つ重要な研究基盤であると期待された。

試験・試問の結果の要旨

最初に本論文の目的、概要について説明がなされた。次いで研究方法、結果ならびにその考察と臨床的意義、今後の研究展開について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、歯科医学研究者としての十分な知識も有し、今後の研究に対しても意欲的であり、学位に値する学識と研究能力を備えているものと判定した。