

論文内容の要旨

TGF- β abrogated the LPS-induced activation of NF- κ B-mediated signal that relayed suppressive effect on the osteogenic activity in human mesenchymal stem cells
- TGF- β は LPS がヒト間葉系幹細胞で誘導する NF- κ B 依存的な骨芽細胞分化抑制効果を解除する -

(青木貴晃、横田聖司、帖佐直幸、客本齊子、野田守)
(岩手医科大学歯学会雑誌 令和 3 年掲載予定)

あおき たかあき
青木 貴晃

I. 研究目的

アスコルビン酸、デキサメタゾン (Dex) および β -グリセロリン酸 (β -Gp) の合剤による刺激は、ERK を介したシグナルの活性化を通じて間葉系幹細胞 (MSC) の骨芽細胞分化を誘導することが知られている。また、これらの合剤による骨芽細胞分化誘導効果は、トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) などの増殖因子の添加により増強されることが報告されている。一方、炎症性環境下では、MSC の骨芽細胞分化誘導を基盤とした骨新生は抑制されることが知られているが、その骨芽細胞分化抑制メカニズムは分子レベルでは不明な点が多い。とくに歯周炎の病原菌として知られるグラム陰性菌由来の lipopolysaccharide (LPS) が、MSC の骨芽細胞分化にどのような影響を与えるかについては明らかとされていない。そこで今回我々は、1) LPS がアスコルビン酸、Dex および β -Gp の合剤による骨芽細胞分化促進効果にどのような影響を与えるかについて、骨芽細胞分化に重要なシグナル伝達分子として知られる extra-cellular signal-regulated kinase (ERK) に着目して調査をするとともに、2) LPS が TGF- β による骨芽細胞分化増強効果にどのように影響するかについても同様に調査した。

II. 研究方法

ヒト骨髄由来 MSC 細胞株 UE7T-13 を用い、この細胞の骨芽細胞分化誘導には、骨芽細胞誘導培地 OGM [基礎培地としての α -MEM にアスコルビン酸ナトリウム (50 μ g/mL)、Dex (100 nM)、 β -Gp (10 mM)、およびウシ胎児血清 (FBS) (10%) を加えたもの]を用いた。また、この OGM に TGF- β 1 (1~5 ng/mL) を添加した培地を用いることにより、MSC のさらなる骨芽細胞分化を誘導した。加えて、これらの MSC の骨芽細胞分化誘導系に、LPS (0.1~10 μ g/mL) を投与することにより、MSC の骨芽細胞分化がどのように変化するかについて、

骨芽細胞分化マーカーとしてのアルカリホスファターゼ（ALP）の発現量を指標として調査した。さらに、TGF- β 1 による MSC の骨芽細胞分化誘導シグナルや、LPS による骨芽細胞分化誘導阻害シグナルがどのように伝達されるかを明らかにするために、各種シグナル伝達分子阻害剤や抗リン酸化シグナル伝達分子抗体を用いた実験系により明らかにした。

III. 研究成績

- 1) 合剤（アスコルビン酸、Dex および β -Gp）による刺激により UE7T-13 細胞の ALP の発現量が mRNA レベルで上昇することを確認した。
- 2) TGF- β 1 は、合剤（アスコルビン酸、Dex および β -Gp）により上昇した UE7T-13 細胞の ALP mRNA 発現量を濃度依存的にさらに増加させることを確認した。また、この TGF- β 1 による ALP mRNA 発現増強効果は、I 型 TGF- β 受容体依存的であることを確認した。
- 3) LPS は、合剤（アスコルビン酸、Dex および β -Gp）による ALP mRNA 発現誘導効果を濃度依存的に抑制したが、この合剤に TGF- β 1 を加えた刺激により増強された ALP mRNA 発現誘導効果には影響を及ぼさなかった。また、この合剤（アスコルビン酸、Dex および β -Gp）による ALP mRNA 発現誘導効果に対する LPS の阻害作用は、シグナル伝達分子 NF- κ B 依存的であることが明らかとなった。
- 4) LPS は、合剤（アスコルビン酸、Dex および β -Gp）の刺激により誘導される ERK のリン酸化と、この合剤に TGF- β 1 を加えた刺激により増強して誘導される ERK のリン酸化の両方を阻害することが明らかとなった。
- 5) 合剤（アスコルビン酸、Dex および β -Gp）による ALP mRNA 発現誘導効果と、この合剤に TGF- β 1 を加えた刺激による ALP mRNA 発現増強効果は、ERK と同じく mitogen-activated kinase (MAPK) ファミリーに属するシグナル伝達分子 c-jun N-terminal kinase (JNK) ならびに p38 MAPK 依存的でもあることが明らかとなった。
- 6) 合剤（アスコルビン酸、Dex および β -Gp）による刺激、あるいはこの合剤に低濃度（1 ~ 3 ng/mL）の TGF- β 1 を加えた刺激では TGF- β 1 mRNA 発現量の変化は認められないが、この合剤に高濃度（5 ng/mL）の TGF- β 1 を加えた刺激では TGF- β 1 mRNA 発現量が上昇した。

IV. 考察及び結論

- 1) LPS は、合剤（アスコルビン酸、Dex、および β -Gp）により誘導される ERK の活性化を介したヒト MSC の骨芽細胞分化誘導効果を NF- κ B 依存的に抑制することが明らかとなった。
- 2) 合剤（アスコルビン酸、Dex、および β -Gp）に TGF- β 1 を加えた刺激により増強されたヒト MSC の骨芽細胞分化誘導効果には、LPS は抑制作用を示さないことが明らかとされた。

一方、LPSはこの合剤にTGF- β 1を加えた刺激により増強されたERKの活性化を低下させることから、TGF- β 1による骨芽細胞分化増強作用の発現にはERK以外のシグナル伝達分子が重要な役割を果たしていることが推察された。興味深いことに、このTGF- β 1による骨芽細胞分化増強効果は、ERK以外のMAPKであるJNKやp38 MAPK依存的であることも判明した。この結果より、TGF- β 1刺激によるヒトMSCの骨芽細胞分化増強作用がLPSの影響を受けないのは、JNKやp38 MAPKなどのERK以外の分子を介したシグナルが関与する分子メカニズムによるものと予測されるが、今後のさらなる調査で明らかとしたい。

3) 合剤(アスコルビン酸、Dex、および β -Gp)の単独刺激や合剤と低濃度TGF- β 1との同時刺激ではTGF- β 1 mRNA発現量には影響がないが、この合剤と高濃度TGF- β 1との同時刺激ではTGF- β 1 mRNA発現量が有意に上昇することから、MSCから骨芽細胞への分化が進行した細胞ではTGF- β 1の産生量が増加する可能性が示唆された。このことから、グラム陰性菌の感染による歯周炎の患部では、その周囲組織中に存在するMSCに対する外来的なTGF- β 1の投与があれば、MSCの骨芽細胞分化誘導と、その分化後の骨芽細胞より発現・分泌されるTGF- β 1による連鎖的なMSCの骨芽細胞分化誘導作用が起こることが示唆された。

本研究により、TGF- β 1は、LPSにより誘導されるヒトMSCの骨芽細胞分化抑制作用を解除すると共に、この細胞のさらなる骨芽細胞分化を促進する性質を有することが明らかとなった。このように、TGF- β 1は、根尖性あるいは辺縁性歯周炎に伴い失われた歯槽骨の再生に応用できるものとして期待される。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査	石崎 明 教授	(生化学講座 細胞情報科学分野)
副査	野田 守 教授	(歯科保存学講座 う蝕治療学分野)
副査	千葉 俊美 教授	(口腔医学講座 関連医学分野)

アスコルビン酸、デキサメタゾン (Dex) および β -グリセロリン酸 (β -Gp) の合剤による刺激は、ERK を介したシグナルの活性化を通じて間葉系幹細胞 (MSC) の骨芽細胞分化を誘導することが知られている。また、これらの合剤による骨芽細胞分化誘導効果は、トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) などの増殖因子の添加により増強されることが報告されている。一方、炎症性環境下では、MSC の骨芽細胞分化誘導を基盤とした骨新生は抑制されることが知られているが、その骨芽細胞分化抑制メカニズムは分子レベルでは不明な点が多い。とくに歯周炎の病原菌として知られるグラム陰性菌由来の lipopolysaccharide (LPS) が、MSC の骨芽細胞分化にどのような影響を与えるかについては明らかとされていない。そこで今回、青木らは、1) LPS がアスコルビン酸、Dex および β -Gp の合剤による骨芽細胞分化促進効果にどのような影響を与えるかについて、骨芽細胞分化に重要なシグナル伝達分子として知られる extra-cellular signal-regulated kinase (ERK) に着目して調査をするとともに、2) LPS が TGF- β による骨芽細胞分化増強効果にどのように影響するかについても同様に調査した。

本研究により、LPS は、合剤 (アスコルビン酸、Dex、および β -Gp) 刺激により誘導される ERK の活性化を介したヒト MSC の骨芽細胞分化誘導効果を NF- κ B 依存的に抑制することが明らかとなった。加えて、LPS は、合剤 (アスコルビン酸、Dex、および β -Gp) と TGF- β 1 との同時刺激により増強されたヒト MSC の骨芽細胞分化誘導効果には抑制作用を示さないことが明らかとなった。一方、LPS は、合剤刺激のみ、あるいは合剤と TGF- β 1 との同時刺激により増強された ERK の活性化の双方を抑制することから、TGF- β 1 による骨芽細胞分化増強作用の発現には ERK 以外のシグナル伝達分子が重要な役割を果たしていることが推察された。興味深いことに、この TGF- β 1 による骨芽細胞分化増強効果は、ERK 以外の MAPK である JNK や p38 MAPK 依存的であることも判明した。これらの結果より、TGF- β 1 刺激によるヒト MSC の骨芽細胞分化増強作用が LPS の影響を受けないのは、JNK や p38 MAPK の働きによるものであるとの可能性が示唆された。しかし、それを明らかにするためには、TGF- β 1 の刺激により、JNK や p38 MAPK の活性化が増強されること、また、この TGF- β 1 の刺激により増強された JNK や p38 MAPK の活性化が、LPS の刺激により減弱されないことを確認する必要がある。

また、興味深いことに、青木らは、MSC が骨芽細胞に分化誘導されると、TGF- β 1 の発現能力が高まることも見出しており、このことから、グラム陰性菌の感染による歯周炎の患部では、その周囲組織中に存在する MSC に対する外来的な TGF- β 1 の投与があれば、MSC の

骨芽細胞分化誘導と、その分化後の骨芽細胞より発現・分泌される TGF- β 1 による連鎖的な MSC の骨芽細胞分化誘導作用が起こることが示唆された。本研究により、TGF- β 1 は、LPS により誘導されるヒト MSC の骨芽細胞分化抑制作用を解除すると共に、この細胞のさらなる骨芽細胞分化を促進する性質を有することが明らかとなった。このように、本研究では、TGF- β 1 が根尖性あるいは辺縁性歯周炎に伴い失われた歯槽骨の再生に応用できるものとして期待されることを初めて明らかとしており、今後の歯科医療の発展に貢献しうる内容として、博士（歯学）の学位に十分に値する報告であると判断した。

試験・試問の結果の要旨

本論文の内容について、研究背景、方法、結果の解釈、結果の考察（臨床的意義ならびに臨床応用の可能性）の順で、スライドを用いたプレゼンテーションによる説明がなされた。下記の通りに試問した結果、いずれについても適切かつ明瞭な回答が得られた。

試問内容 1：本論文の Introduction には、間葉系幹細胞の TGF- β 1 による骨芽細胞分化誘導機構には Smad 経路も大切な役割を果たしているとのことが記載されているが、UE7T-13 細胞ではこの経路の役割はわかっているのか？

回答内容 1：UE7T-13 細胞に対し、合剤と TGF- β 1 との同時刺激を与えて骨芽細胞分化を誘導した際に、Smad3 阻害剤である SIS3 を与えても、TGF- β 1 刺激による ALP 発現増強効果が有意には減弱されないことを確認している。従って、この細胞における TGF- β 1 刺激による骨芽細胞分化増強効果の発現には、Smad を介したシグナルは関与しないものと考えている。

試問内容 2：Western Blot 法では、合剤と TGF- β 1 との同時刺激を与えた際には、リン酸化 JNK やリン酸化 p38 MAPK を認めることはできなかったとされているが、今後、Western Blot 法以外の方法を用いて、これらのリン酸化について確認する予定はあるのか？

回答内容 2：液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS 法）により、微量のリン酸化タンパク質の検出が可能であるとされている。本学の医歯薬総合研究所には、LC-MS/MS が配備されていることから、今後はこの機器を利用して本調査を進めたく思っており、将来的な課題と考えているところである。

試問内容 3：根尖性歯周炎の炎症巣に TGF- β 1 を供給する組織あるいは細胞については、どのようなものを想定しているのか？

回答内容 3：炎症巣より放出されるケモカインにより、抗炎症性マクロファージ（M2-マクロファージ）が炎症巣に集積し、積極的に TGF- β 1 を発現・分泌することが報告されている。また、骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSC）も同様に炎症巣に集積することが知られているが、この BM-MSC が TGF- β 1 を発現・分泌することも知られている。このように、炎症巣で TGF- β 1 を供給する細胞については、M2-マクロファージや BM-MSC などを想定している。

試問内容 4：TGF- β 1 刺激による骨芽細胞分化増強効果には JNK や p38 MAPK が関与しうることは、実験結果から明らかである。また、もし、これらの分子の TGF- β 1 による活性化

(リン酸化) が LPS 刺激でも減弱しないことが確認できれば、これらの分子を活性化しうる薬剤の局所への単独投与、あるいは TGF- β 1 とこの薬剤との併用的な投与により、炎症部位での骨再生が期待できることについては理解できる。しかし、JNK や p38 MAPK 以外のシグナル伝達分子が、炎症性刺激でも抑制されない TGF- β 1 誘導性の骨芽細胞分化増強効果に関わる可能性についても明らかとしていく価値はあるのではないか？

回答内容 4 : LC-MS/MS 法を利用すれば、微量なタンパク質のリン酸化の強度の変化についても網羅的に明らかとすることが可能であり、この方法を用いて JNK や p38 MAPK 以外のシグナル伝達分子の可能性についても追求していきたいと考えている。

質疑応答の概要は上記の通りであるが、加えて、M2-マクロファージの移植とシグナル伝達増強剤との併用療法による根尖性歯周炎に伴う骨吸収部位での新たな骨再生医療への発展性についても積極的に述べており、研究に対する十分な意欲を感じられたことから、学位に値する学識と研究能力を有すものと判定した。