

## 主論文要旨

Connective tissue growth factor enhances TGF- $\beta$ 1-induced osteogenic differentiation via activation of p38 MAPK in mesenchymal stem cells

結合組織成長因子は間葉系幹細胞における TGF- $\beta$ 1 誘導性骨芽細胞分化を p38 MAPK の活性化を介して促進する

(Journal of Oral Biosciences 令和6年掲載予定)

氏名 吉田 弘法

## I. 研究目的

細胞の分化は様々な成長因子の作用によって制御されている。Transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 1 は細胞の増殖や分化など多くの役割を担っており、間葉系幹細胞 (MSC) においては骨芽細胞分化を誘導する。Connective tissue growth factor (CTGF) は様々な細胞において、細胞外マトリックスタンパクの合成促進、細胞増殖や分化に関与している。加えて、CTGF の過剰ならびに過少発現は骨形成不全を引き起こすことから、CTGF が骨形成に関与していることが強く示唆されている。本研究では、TGF- $\beta$ 1 や CTGF が、ヒト MSC における骨芽細胞分化にどのように影響するのかについて、細胞内シグナル伝達機構に着目して調査した。

## II. 研究方法

本研究は、ヒト骨髄由来 MSC 株である UE7T-13 細胞を使用した。最初に、TGF- $\beta$ 1 誘導性の骨芽細胞分化における CTGF の役割を検討するために、TGF- $\beta$ 1 または CTGF によって活性化される細胞内シグナル伝達経路を抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法によって同定した。次に、UE7T-13 細胞を TGF- $\beta$ 1 ならびに CTGF で単独または共処理し、RT-qPCR 法を用いて骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現量を調査した。アルカリホスファターゼの発現については活性染色も併せて行った。さらに、TGF- $\beta$ 1 および CTGF によって誘導される細胞外マトリックスの石灰化をアリザリンレッド染色で評価した。

## III. 研究成績

TGF- $\beta$ 1 と CTGF の単独または共処理によって活性化される細胞内シグナル伝達経路を同定した。TGF- $\beta$ 1 の単独処理は ERK1/2 のリン酸化を促進したが、CTGF との共処理においてリン酸化は抑制された。また、TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理は p38 MAPK のリン酸化を有意に増強した。一方、TGF- $\beta$ 1 の主要経路として知られる Smad2/3 のリン酸化は認められなかった。骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現については、TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理はアルカリホスファターゼ (ALPL)、I 型コラーゲン (COL)、オステオポンチン (OPN) の mRNA 発現を有意に促進した。興味深いことに、骨シアロタンパク (BSP) とオステオカルシン (OSC) は CTGF の単独処理によっても発現が促進された。これらの発現は p38 MAPK 阻害剤処理で完全に抑制された。また、アルカリホスファターゼ活性染色は TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理によってのみ増強し、p38 MAPK 阻害剤処理によって抑制された。さらに、TGF- $\beta$ 1 による石灰化の促進は CTGF との共処理によってさらに増強され、p38 MAPK 阻害剤または MEK/ERK 阻害剤処理で完全に抑制された。

#### IV. 考察及び結論

MSCにおける TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理は p38 MAPK のリン酸化を促進することが示された。CTGF は TGF- $\beta$ 1 のレセプターへの結合を増強することが報告されている。したがって、CTGF 存在下では TGF- $\beta$ 1 の作用が増強され、p38 MAPK の活性化が促進することが示唆された。さらに、TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理は、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を上昇させた。また、CTGF 単独処理においても BSP と OSC の mRNA 発現レベルを上昇させた。我々はこれまでの研究で、同細胞において TGF- $\beta$ 1 と platelet-derived growth factor (PDGF) との共処理が ALPL と BSP の mRNA 発現レベルを促進することを報告している。本研究では、TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理が ALPL に加え COL や OPN、さらには CTGF 単独でも BSP と OSC の発現を誘導することが示された。すなわち、CTGF は MSC における TGF- $\beta$ 1 誘導性の骨芽細胞分化において、分化の中期から後期における細胞外マトリックスタンパクの産生を促進することが示唆された。さらに、TGF- $\beta$ 1 は MSC の骨芽細胞分化における細胞外マトリックスの石灰化を誘導した。加えて、この石灰化は CTGF との共存下で有意に増強され、p38 MAPK 阻害剤ならびに MEK/ERK 阻害剤によって完全に抑制された。これらの結果から、TGF- $\beta$ 1 と CTGF による協調的な細胞外マトリックスの石灰化促進作用は、p38 MAPK 依存的なシグナルにより誘導されるものと考えられた。また、TGF- $\beta$ 1 は ERK1/2 のリン酸化を促進するものの、CTGF の存在下でそのリン酸化促進効果は抑制されることから、TGF- $\beta$ 1 と CTGF による協調的な細胞外マトリックスの石灰化促進作用の発現には、基底レベルでの MEK/ERK 依存的シグナルの活性の維持が必要であると考えられた。このように、TGF- $\beta$ 1 と CTGF は、協調的に MSC の骨芽細胞分化を p38 MAPK 依存的に促進するが、そのためには、MEK/ERK 依存的シグナルの活性を基底レベルで維持することが重要であると結論づけられた。

## 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

- |      |           |            |
|------|-----------|------------|
| 主査   | 千葉 俊美 教授  | (関連医分野)    |
| 副査 1 | 帖佐 直幸 准教授 | (細胞情報科学分野) |
| 副査 2 | 佐藤 和朗 教授  | (歯科矯正学分野)  |



Transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 1 は細胞の増殖や分化など多くの役割を担っており、間葉系幹細胞 (MSC) においては骨芽細胞分化を誘導する。Connective tissue growth factor (CTGF) は様々な細胞において、細胞外マトリックスタンパクの合成促進、細胞増殖や分化に関与している。本研究では、TGF- $\beta$ 1 や CTGF が、ヒト MSC における骨芽細胞分化にどのように影響するのかについて、細胞内シグナル伝達機構に着目して調査した。

ヒト骨髄由来 MSC 株である UE7T-13 細胞を使用した。最初に、TGF- $\beta$ 1 または CTGF によって活性化される細胞内シグナル伝達経路をウェスタンブロット法にて同定した。また、RT-qPCR 法を用いて骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現量を調査した。アルカリホスファターゼの発現については活性染色も併せて行った。さらに、TGF- $\beta$ 1 および CTGF によって誘導される細胞外マトリックスの石灰化をアリザリンレッド染色で評価した。その結果、TGF- $\beta$ 1 の単独処理は ERK1/2 のリン酸化を促進したが、CTGF との共処理においてリン酸化は抑制された。また、TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理は p38 MAPK のリン酸化を有意に増強した。骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現については、TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理はアルカリホスファターゼ (ALPL)、I 型コラーゲン (COL)、オステオポンチン (OPN) の mRNA 発現を有意に促進した。興味深いことに、骨シアロタンパク (BSP) とオステオカルシン (OSC) は CTGF の単独処理によっても発現が促進された。これらの発現は p38 MAPK 阻害剤処理で完全に抑制された。また、TGF- $\beta$ 1 による石灰化の促進は CTGF との共処理によってさらに増強され、p38 MAPK 阻害剤または MEK/ERK 阻害剤処理で完全に抑制された。

本研究より、MSC における TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理は p38 MAPK のリン酸化を促進することが示された。CTGF は TGF- $\beta$ 1 のレセプターへの結合を増強することが報告されており、CTGF 存在下では TGF- $\beta$ 1 の作用が増強され、p38 MAPK の活性化が促進することが示唆された。さらに、TGF- $\beta$ 1 と CTGF の共処理は、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を上昇させ、CTGF 単独処理においても BSP と OSC の mRNA 発現レベルを上昇させた。CTGF は MSC における TGF- $\beta$ 1 誘導性の骨芽細胞分化において、分化の中期から後期における細胞外マトリックスタンパクの産生を促進することが示唆された。TGF- $\beta$ 1 は MSC の骨芽細胞分化における細胞外マトリックスの石灰化を誘導し、CTGF との共存下で有意に石灰化の増強がされた。さらに、p38 MAPK 阻害剤ならびに MEK/ERK 阻害剤によって完全に抑制された。TGF- $\beta$ 1 と CTGF による協調的な細胞外マトリックスの石灰化促進作用は、p38 MAPK 依存的なシグナルにより誘導されるものと考えられた。

また、TGF- $\beta$ 1 は ERK1/2 のリン酸化を促進するものの、CTGF の存在下でそのリン酸化促進効果が抑制されることから、TGF- $\beta$ 1 と CTGF による細胞外マトリックスの石灰化促進作用の発現には、基底レベルでの MEK/ERK 依存的シグナルの活性の維持が必要であると考えられた。このように、TGF- $\beta$ 1 と CTGF は、協調的に MSC の骨芽細胞分化を p38 MAPK 依存的に促進するが、そのためには、MEK/ERK 依存的シグナルの活性を基底レベルで維持することが重要であると結論づけられた。

#### 試験・試問結果の要旨

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、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明した。

主査・副査から複数の質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

問：石灰化の結果について、p38 MEAK 阻害剤の SB203580 と MEK 阻害剤の U0126 を同時作用させることでの抑制は有意差が出なかったのか。

答：培地自体に骨誘導性があるためコントロールも多少石灰化するが、SB203580 では有意に抑制され、U0126 ではコントロールと同程度まで抑えられた。これらの阻害剤は異なるシグナル経路に作用するため抑制増強に関しては関連しないと考える。

問：多血小板血漿療法による骨芽細胞の増殖に関しては実際に臨床で行われているのか。

答：ローカルデリバリーが非常に技術的に難しいため、臨床による実用はまだできていない。骨に関しては不明であるが、軟部組織は優先的に出来ることは考えられる。

問：今回の研究で MSC に対して TGF- $\beta$ 1 と CTGF による石灰化の増強が明らかとなり、先行研究でも TGF- $\beta$ 1 と PDGF で石灰化が促進することが示されていることから TGF- $\beta$ 1 と CTGF、PDGF の 3 つを作用させれば石灰化はさらに増強するのか。

答：MSC に対する TGF- $\beta$ 1 と CTGF の骨芽細胞分化促進のシグナル経路と TGF- $\beta$ 1 と PDGF のシグナル経路は異なるため、3 つを同時作用することで石灰化の増強が起こると考えられる。

問：骨芽細胞誘導の主な成長因子として TGF- $\beta$ 1 が分かっているが、生体内での局在性はあるのか。

答：骨リモデリング時に BMP や TGF- $\beta$ 1 が存在することはわかっている。成体における骨リモデリングは破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスを保っており、破骨細胞によって吸収された骨は骨芽細胞により埋め戻されるカップリング機構が働いている。CTGF が骨組織で検出されることは知られているが局在しているかどうかの解析が難しく、局在性に関しては *in vivo* では不明確なところがある。

問：CTGF 単独で BSP と OSC の発現増強が認められたことはどういう意味があるのか。

答：CTGF が TGF- $\beta$ 1 の作用を増強させたことは示された。しかし、CTGF は特定のレセプターが存在しないため、TGF- $\beta$ 1 以外のサイトカインや成長因子などと結合して BSP と OSC の発現を増強させたのではないかと考える。

問：iPS 細胞で作用はどのようになると考えるか。

答：CTGF は発生の様々な段階で変動するため、骨へ分化しない可能性がある。CTGF は特定のレセプターがない分、様々なサイトカイン等との相互作用による分化誘導が期待できる。また、iPS 細胞も様々な組織に分化出来ることから今後の再生医療に貢献できるのではないかと期待している。