

氏名	にし ひら そう こう 西 平 宗 功
学位の種類	博士 (歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第267号
学位授与の日付	平成23年3月10日
学位論文題目	High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells (細胞密度依存的な VCAM1 の発現増加は間葉系幹細胞の遊走能を抑制する)

論文内容の要旨

I 研究目的

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は自己複製および骨, 軟骨, 脂肪, 筋肉への多分化能を有し, 幹細胞治療への応用が期待されている。最近では移植片対宿主病 (GVHD) や自己免疫疾患への MSC を用いた幹細胞治療も注目されている。MSC は様々な細胞接着因子を発現しており, 最近ではこれらの接着因子が MSC による創傷治癒や心筋再生に関与することが報告されている。しかしながら, 細胞接着因子が MSC による組織再生においてどのように機能しているかは解明されていない。本研究では, MSC の細胞間接着に関与する接着分子を同定するために, MSC を様々な細胞密度で培養し, 細胞接着因子の発現を比較した。さらに, どのようなシグナル伝達系によって MSC における細胞間接着因子が増加するかを検討した。

II 研究方法

MSC は hTERT, HPV E7 導入によって不死化された UE7T-13 細胞をヒューマンサイエンス振興財団より入手した。最初に UE7T-13 をコンフルエントおよびその 1/30 の密度で培養して, 細胞接着因子の発現をプライマーアレイで網羅的に解析した。次に, UE7T-13 を様々な細胞密度で培養し, リアルタイム RT-PCR で VCAM1 の mRNA を, ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリーでタンパクの発現を詳細に解析した。密度別に前培養した UE7T-13 に VCAM1 の発現ベクターを導入, 或いは siRNA で VCAM1 をノックダウンして遊走能を検討した。さらに, 細胞密度依存的な VCAM1 の発現を制御する細胞内シグナル伝達系を予測するために, UE7T-13 を各種プロテインキナーゼ阻害剤で処理後, VCAM1 の mRNA 発現量を解析した。

III 研究成績

MSC の細胞間接着によって発現が促進される接着分子を同定するために, 低細胞密度および高細胞密度の培養条件下で網羅的な遺伝子発現の比較を実施した。その結果, 高密度の条件下で血管内皮細胞接着分子 (VCAM1/CD106) の発現が大幅に増加することを見出した。この VCAM1 の発現増加を mRNA およびタンパク質レベルで精査した結果, mRNA 発現量は細胞密度依存的に増加し, 同様にタンパク発現の増加も確認された。この細胞密度依存的な VCAM1 の発現増加が MSC の動態にどのような影響をおよぼすのか明らかにするために, 細胞遊走能に着目し, VCAM1 の発現量と遊走能の相関を調べた。高密度培養, すなわち VCAM1 の発現が高い状態に前培養された細胞と, 低密度, すなわち VCAM1 の発現が低い状態に前培養された UE7T13 の遊走能を比較した結果, 高密度で前培養した UE7T13 の遊走能は, 低密度における前培養と比較して, 顕著に低下することが明らかになった。さらに, MSC の遊走能は VCAM1 をノックダウンすることで促進し, VCAM1 の過剰発現により減少した。また, 細胞密度依存的な VCAM1 の発現は, NF κ B シグナルのプロテインキナーゼ阻害剤である IKK2 阻害剤 IV で強く抑制された。結論として, NF κ B シグナルを介した細胞密度依存的な VCAM1 の発現増加は MSC の遊走能を抑制することが示された。

IV 考察及び結論

VCAM1 は主として血管内皮細胞や間質細胞などに発現する接着分子で、単球、リンパ球、好酸球などの細胞表面に発現する $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンのリガンドとして、これらの細胞の血管外遊走や骨髄へのホーミングに関与する。本研究では MSC における VCAM1 の発現が、細胞の密度依存的に増加することが明らかとなった。さらに、この VCAM1 の発現増加は MSC の遊走を抑制する可能性が示唆された。加えて、この MSC における VCAM1 の細胞密度依存的な発現は、NF κ B 経路が活性化したものと考えられた。本結果は、MSC の組織再生能力に影響する細胞移動性が、VCAM1 の発現量によって大きく影響されることを示唆するものであり、MSC 動態制御機構の重要な一面が明らかとされた。我々の研究成果を発展させ、MSC をセルデバイスとした再生医療において、VCAM1 の発現調節による治療法の開発を目指したい。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 水 城 春 美 (口腔外科学講座 顎口腔外科学分野)
副査 教授 杉 山 芳 樹 (口腔外科学講座 歯科口腔外科学分野)
副査 教授 石 崎 明 (口腔機能構造学講座 口腔生化学遺伝学分野)

多分化能を有した間葉系幹細胞 (MSC) は損傷した組織へと遊走し、増殖や分化を開始する。MSC による損傷した組織の再生に細胞間接着は不可欠であるが、どのような接着分子が MSC 同士の接着に重要であるか解明されていない。そこで本研究では、MSC の細胞間接着に関与する接着分子を同定するために、MSC を様々な細胞密度で培養し、細胞接着因子の発現を比較した。さらに MSC では、どのようなシグナル伝達系によって細胞間接着因子が増加するかを検討した。

本研究の結果、高細胞密度培養条件下では MSC に接着分子 VCAM1 の発現が大幅に増加していることが判明した。この VCAM1 の発現は、ウェスタンブロット法およびフローサイトメトリーを用いてタンパク質レベルで確認された。次に VCAM1 の発現量と MSC の遊走能との関係を Trans-well cell culture inserts を使用して解析した。その結果、高密度で前培養した高 VCAM1 発現 MSC は低 VCAM1 発現 MSC よりも遊走能が低いことが判明した。また、VCAM1 発現 MSC の遊走能は VCAM1 をノックダウンすることで増加し、過剰発現させると減少した。さらに、細胞密度依存的な VCAM1 の発現は、NF- κ B シグナルの阻害剤である IKK2 阻害剤 IV で強く抑制されていた。したがって、VCAM1 の細胞密度依存的発現については NF- κ B シグナル伝達系に依存したものと推察された。

本研究により、細胞療法として MSC を用いる際、細胞塊を作らせて局所の再生を促す場合やその細胞塊より MSC を周囲に遊走させて再生範囲を広くする場合には VCAM1 の発現調節に留意する必要があることが示された。

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、口腔外科学に関する十分な知識も有し、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。