

氏名	たか はし みかこ 高橋美香子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第273号
学位授与の日付	平成24年3月9日
学位論文題目	Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells 酸性線維芽細胞増殖因子誘導性の ERK1/2 シグナルは靭帯由来血管内皮前駆細胞様線維芽細胞の増殖と平滑筋細胞分化を相反的に制御している

## 論文内容の要旨

### I 研究目的

組織の再生・修復には組織の栄養血管新生が必要であるが、これまでに我々は歯周靭帯中に存在する未分化間葉系細胞から血管内皮細胞マーカー陽性の血管様管腔構造が作られるという報告を行った。また、血管内皮細胞マーカーと平滑筋細胞マーカーを同時に発現する細胞が存在することも明らかとした。そこで本研究では、酸性線維芽細胞増殖因子 (FGF-1) 誘導性のいろいろな細胞内シグナルが、ラット歯周靭帯由来の血管内皮前駆細胞様線維芽細胞集団 single cell-derived culture 2 (SCDC2) の増殖と血管構成細胞 (血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞) 分化に与える影響を調査し、どのような細胞内シグナルが歯周靭帯再生時に必要な栄養血管新生に重要であるかを検討した。

### II 研究方法

ラット歯周靭帯由来初代培養線維芽細胞 1 個を起源とした血管内皮前駆細胞様線維芽細胞集団 SCDC2 を実験に用いた。まず、細胞増殖に与える FGF-1 の効果をアラマーブルー法にて調査した。次に、リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法にてシグナル伝達物質の活性化 (リン酸化) を調べ、FGF-1 誘導性のシグナル伝達経路を調査した。さらにシグナル経路の特異的阻害剤を用いて FGF-1 誘導性のシグナル活性化を抑制し、細胞増殖と分化に与える影響を調べた。細胞の分化は、リアルタイム RT-PCR 法により血管内皮細胞マーカー (Tie-2, vWF) と平滑筋細胞マーカー ( $\alpha$ -SMA, h1-calponin) の mRNA 発現を調査し、さらに免疫細胞染色法にてマーカータンパク質の発現を調査した。

### III 研究成績

FGF-1 は SCDC2 細胞の増殖を濃度依存的に促進した。また FGF-1 刺激により mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一つである extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化が誘導された。この ERK の活性化誘導は MEK-ERK 阻害剤 (U0126) 処理により、濃度依存的に抑制された。さらに FGF 受容体阻害剤 (SU5402) で処理するところの ERK の活性化は FGF 未刺激と同程度かそれ以下まで抑制された。一方、細胞分化の評価において、ERK 活性を抑制すると SCDC2 の平滑筋細胞マーカー mRNA の発現は上昇したが、血管内皮細胞マーカー mRNA の発現には大きな変化はみられなかった。タンパク質発現についても同様の結果が得られた。さらに、免疫細胞染色法において、U0126 処理によりアクチンの重合が顕著に認められた。

### IV 考察及び結論

SCDC2 において FGF-1 は FGF 受容体とそれに続く MEK-ERK シグナルの活性化を介して、細胞増殖促進に作用することが示された。ERK 活性化と細胞増殖は正の相関関係にあり、一方、細胞分化とは負の相関関係すな

わち、ERK 活性の抑制が SCDC2 の平滑筋細胞への分化を促進することが示された。またこの際、平滑筋細胞分化が促進されても内皮細胞としての性質は残っており、完全な平滑筋細胞分化には他のシグナル経路が関わっていることが示唆された。

以上より、歯周靭帯由来の血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の共通前駆細胞では、FGF 誘導性の MEK-ERK シグナル活性化の程度により、その分化の方向性が制御されていると考えられた。

## 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 (口腔外科学講座 歯科口腔外科学分野)  
副査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)  
副査 准教授 八重柏 隆 (口腔機能保存学講座 歯周・歯内治療学分野)

組織の再生・修復には栄養血管新生が必要である。本研究では、どのような細胞内シグナルが栄養血管新生に重要であるかを検討する目的で、酸性線維芽細胞増殖因子 (FGF-1) 誘導性細胞内シグナルが歯周靭帯由来の血管内皮前駆細胞様線維芽細胞集団の増殖および血管構成細胞 (血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞) への分化に与える影響を調査した。

ラット歯周靭帯由来の血管内皮前駆細胞様線維芽細胞集団 SCDC2 を実験に用いた。細胞増殖に与える FGF-1 の効果、シグナル伝達物質の活性化 (リン酸化)、FGF-1 誘導性のシグナル伝達経路を調査した。またシグナル経路特異的阻害剤の影響、血管内皮細胞マーカーと平滑筋細胞マーカーの mRNA の発現およびマーカータンパク質の発現により細胞の分化を調査した。

FGF-1 は SCDC2 細胞の増殖を濃度依存的に促進した。FGF-1 刺激により extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化が誘導され、ERK の活性は MEK-ERK 阻害剤処理により濃度依存的に抑制された。また FGF 受容体の阻害によって ERK の活性化は FGF 未刺激と同程度かそれ以下まで抑制された。一方、ERK 活性を抑制すると SCDC2 の平滑筋細胞マーカー mRNA の発現は上昇したが、血管内皮細胞マーカー mRNA には大きな変化はみられなかった。タンパク質発現についても同様であった。さらに MEK-ERK 阻害剤処理によりアクチンの重合が顕著に認められた。

以上の結果により、SCDC2 において FGF-1 は FGF 受容体とそれに続く MEK-ERK シグナルの活性化を介して、細胞増殖促進に作用することが示された。ERK 活性化と細胞増殖は正の相関を示し、一方細胞分化とは負の相関関係にあり、ERK 活性の抑制が SCDC2 の平滑筋細胞への分化を促進することが示された。また平滑筋細胞分化が促進されても内皮細胞としての性質は残っており、完全な平滑筋細胞分化には他のシグナル経路が関わっていることが示唆された。

歯周靭帯由来の血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の共通前駆細胞では、FGF 誘導性の MEK-ERK シグナルの活性化の程度により、その分化の方向性が制御されていると考えられる。

## 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、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。