

## 論文内容の要旨

### PDGF-induced PI3K-mediated signal enhances TGF- $\beta$ -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the TGF- $\beta$ -activated MEK-dependent manner

-PDGF は TGF- $\beta$  誘導性 MEK/ERK シグナル依存的にヒト間葉系幹細胞における骨芽細胞分化を促進する-  
(International Journal of Molecular Medicine、平成 26 年掲載予定)

よこた じゅん  
横田 潤

#### I. 研究目的

高齢者のクオリティ・オブ・ライフを著しく低下させる要因のひとつとして、歯の喪失による咀嚼、構音、審美障害が挙げられる。デンタルインプラントによる機能回復は治療効果も患者満足度も高いが、骨量の少ない場合にはインプラントの埋入が不可能で、必ずしも容易に適用できるわけではない。インプラント埋入の際には顎骨の形態や骨量が重要なポイントとなるため、抜歯後の骨量維持と骨再生を促す目的で、現在も新規生体材料の開発や成長因子の制御等、様々な試みがなされている。一方、骨再生医療としての細胞治療の中核を担う間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, 以下 MSC) は、様々な成長因子の作用によって骨芽細胞 (osteoblast 以下, OB) へと分化することが知られている。MSC の移植による骨形成療法は、局所の様々な成長因子の作用により影響を受けることが報告されている。しかしながら複数の成長因子の組み合わせが MSC の骨芽細胞分化に与える影響について、それらの単独刺激と比較して明らかにした研究はほとんど存在しない。そこで本研究では、骨形成の重要な調節因子として報告されている TGF- $\beta$  に着目し、TGF- $\beta$  と PDGF との協調作用が如何なる細胞内シグナルを介して、MSC の骨分化能に影響を及ぼすのかを検討し、今後の臨床における骨再生療法樹立の一助とすることを目的とした。

#### II. 研究方法

1. 細胞：ヒト骨髄由来不死化 MSC (UE7T-13 細胞) を用いた。また骨芽細胞分化誘導基礎培地として 100 nM デキサメタゾン, 50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸, 10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸および 10% FBS 含有  $\alpha$ MEM を用いた。
2. アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, 以下 ALP) 染色：UE7T-13 細胞を TGF- $\beta$  または PDGF による単独刺激, あるいはこれら 2 種類の成長因子による同時刺激をした後, ポリスチレン製ディッシュならびにオステオロジックディスク (BD Bioscience) 上で 1 週間培養し, ALP 染色を用いてそのタンパク質レベルの発現を検討した。
3. 骨分化マーカー遺伝子の検討：UE7T-13 細胞を上記 2 と同様に TGF- $\beta$  と PDGF で刺激後, ポリスチレン製ディッシュあるいはオステオロジックディスク上で 1 週間培養してから, リアルタイム RT-PCR 法を用いて, 各骨分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量の変動について検討した。
4. 細胞間基質石灰化能力の評価：UE7T-13 細胞を上記 2 と同様に TGF- $\beta$  と PDGF で刺激後, ポリスチレン製ディッシュ上で 2 週間培養してから, Alizarin Red 染色を行った。
5. 各成長因子添加による細胞内シグナル活性化の調査：UE7T-13 細胞を上記 2 と同様に TGF- $\beta$  と PDGF で刺激後, さらに 0, 10, 30, 60, 120 分間培養を続けた後, 全細胞蛋白を回収し, Western Blotting

法を用いて検討した。

6. MSC の骨芽細胞分化に関わる成長因子誘導性シグナル伝達経路の特定：上記 5 で特定されたシグナル系のインヒビター（MEK 阻害剤：U0126, PI3K 阻害剤：LY294002）が、各成長因子により誘導される UE7T-13 細胞の細胞間基質石灰化能力にどのように影響するかについて上記 4 と同様に評価した。
7. 統計解析：各実験群間における有意差は Student' s *t*-test を用いて検討した。

### III. 研究成績

1. TGF- $\beta$  は濃度依存的に UE7T-13 の細胞間基質石灰化能力を増強させ、5 ng/ml で最も顕著に石灰化促進効果が認められた。
2. PDGF を単独添加したところ顕著な石灰化は確認されなかった。一方 TGF- $\beta$ , PDGF を同時添加したところ、TGF- $\beta$  単独よりも顕著に石灰化が増強された。
3. ポリスチレン製ディッシュ上の培養法を用いて、リアルタイム RT-PCR 法により調査したところ、TGF- $\beta$  単独添加で ALP の mRNA 発現量が有意に増加し、この効果は TGF- $\beta$  と PDGF の組合せによって増強された。加えて、各成長因子の単独添加では認められなかった骨シアロタンパク質 mRNA の発現が TGF- $\beta$  と PDGF の組合せで検出された。
4. 骨表面の性状に近いリン酸カルシウム膜で覆われたオステオロジックディスク上で上記 3 と同様の実験を行ったところ、TGF- $\beta$  単独でも ALP の mRNA の発現を促進させるが、TGF- $\beta$  と PDGF を同時に添加することで、この TGF- $\beta$  による ALP 発現誘導効果がさらに増強されることが確認された。またポリスチレン製ディッシュ上では確認できなかった TGF- $\beta$  と PDGF による協調的な骨シアロタンパク質 mRNA の発現増強効果が、この培養法で確認された。
5. TGF- $\beta$  刺激により ERK のリン酸化が増強され、PDGF 刺激により Akt のリン酸化が増強されることを確認した。
6. TGF- $\beta$  と PDGF との協調作用による MSC の細胞間基質石灰化能力増強効果は、PI3K/Akt 阻害剤で一部消失したのに対し、MEK/ERK 阻害剤で完全に消失した。

### IV. 考察及び結論

TGF- $\beta$  により誘導される MEK/ERK 経路の活性化は、MSC の OB 分化を促進した。一方、PDGF により誘導される PI3K/AKT 経路の活性化は、それ単独での OB 分化促進効果は認められなかったが、TGF- $\beta$  により誘導される OB 分化を協調的に促進した。さらに、この PDGF による TGF- $\beta$  誘導性 OB 分化に対する協調的な促進効果は、MEK 依存的であることが明らかとなった。

今回の研究成果により、MSC を用いた骨組織再生には、この細胞の TGF- $\beta$  誘導性 MRK/ERK シグナルと PDGF 誘導性 PI3K/Akt シグナルによる協調的な骨芽細胞分化促進作用が重要な役割を担うことが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 八重柏 隆 (歯科保存学講座 歯周療法学分野)  
副査 教授 石崎 明 (生化学講座細胞情報科学分野)  
副査 教授 近藤 尚知 (補綴・インプラント学講座)

歯科インプラント治療をはじめとした欠損補綴を行う際には、顎骨の形態や骨量が重要なポイントとなるため、骨芽細胞を活性化する新規生体材料の開発や各種成長因子の利用等、様々な試みがなされている。一方、骨再生医療としての細胞治療の中核を担う間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, 以下 MSC) は、様々な成長因子の作用によって骨芽細胞 (osteoblast 以下, OB) へと分化することが知られている。本研究では骨形成の重要な調節因子として報告されている TGF- $\beta$  に着目し、TGF- $\beta$  と PDGF との協調作用が MSC の骨芽細胞分化能に及ぼす影響を検討した。

ヒト骨髄由来 MSC 細胞株 UE7T-13 を細胞成長因子 TGF- $\beta$  ならびに PDGF 単独あるいは両方で刺激し、Alizarin Red 染色による細胞外基質石灰化能の評価やリアルタイム RT-PCR 法による OB 分化マーカー遺伝子の mRNA 発現解析により、この細胞の骨芽細胞分化能について検索した。さらに、ウェスタンブロット法により細胞内シグナル伝達分子のリン酸化を解析した。

その結果、TGF- $\beta$  により誘導される MEK/ERK 経路の活性化は、MSC の OB 分化を促進した。一方、PDGF により誘導される PI3K/AKT 経路の活性化は、単独での OB 分化促進効果は認められなかったが、TGF- $\beta$  により誘導される OB 分化を促進した。この PDGF と TGF- $\beta$  との協調的な OB 分化促進効果は MEK 阻害剤で完全に消失することから、PDGF 誘導性の PI3K/AKT による TGF- $\beta$  誘導性 OB 分化の促進効果は、MEK 依存的事であることが明らかとされた。

上記より、MSC の TGF- $\beta$  誘導性 MEK/ERK シグナルと PDGF 誘導性 PI3K/Akt シグナルによる協調的な骨芽細胞分化促進作用が明らかとなり、今後の臨床の現場における骨再生療法確立の一助となるものと考えられる。本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士(歯学) の学位を授与することを適当と認める。

### 試験・試問結果の要旨

本研究の目的、方法、結果などについて本人から説明を受け、質問を行った。また、今後の研究の展開ならびに関連する基本的事項についても試問を行い、適切かつ十分な回答が得られたことから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと認めた。

**参考論文** なし