

論文内容要旨

論文題目 骨髄由来間葉系幹細胞からセメント芽細胞様細胞への
分化に及ぼす Wnt3a の影響

学位申請者 間 悠介

【緒言】 歯周病に伴う大規模歯周組織破壊の新たな治療法として、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用いた組織工学に基づく治療法が注目されている。この歯周組織再生では、歯槽骨・歯周靭帯・セメント質の三つの組織を誘導し、正常な組織構造を再構築することが重要である。しかしながら、とりわけセメント質の再生は容易ではない。なぜなら、セメント芽細胞が歯根に乏しく、また、hMSC からセメント芽細胞を効率よく誘導する方法が確立されていないためである。

セメント芽細胞の誘導に関して Han らは、歯周靭帯細胞にリチウムイオンを作用させると、セメント質・骨関連遺伝子の発現量が増加することを報告した (P. Han, *et al.*, 2012)。リチウムイオンは古典的 β -catenin/Wnt 経路を活性化することが知られていることから、セメント芽細胞の誘導にはこの細胞内シグナル伝達経路が鍵を握ると推測される。

そこで本研究では、古典的 β -catenin/Wnt 経路を活性化する代表的なタンパク質性因子である Wnt3a に着目し、hMSC からセメント芽細胞様細胞への分化誘導因子としての効果およびその作用機序について調べることを目的とした。セメント芽細胞の分化を促進するタンパク質に関する知見は、細胞機能制御能を有する組織工学用スキャホールドの分子設計にとって有益な情報となる。

【材料及び方法】 細胞には主に骨髄由来不死化 hMSC (UE6E7T-3 ; JCRB 細胞バンク) を用いた。Wnt3a のセメント芽細胞誘導因子としての効果を調べるため、hMSC を骨誘導培地中 (OIM ; α -MEM 培地に牛胎児血清, アスコルビン酸, β -グリセロフォスフェート, デキサメタゾン) を添加) で 6 日間培養した。その後、培地を無血清 OIM に変更し、種々の濃度の Wnt3a を添加した。経時的に細胞を回収し、CEMP-1 mRNA の発現量を real-time PCR 法によって調べた。また、CEMP-1 以外のセメント質・骨関連遺伝子 (cementum attached protein ; CAP, alkaline phosphatase ; ALP, osteocalcin ; OCN, dentin sialophosphoprotein ; DSPP), β -catenin/Wnt 経路に関連する遺伝子 (β -catenin, Axin2), 細胞成長因子 (bone morphogenetic protein-2 ; BMP-2), 神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor ; BDNF) の発現について real-time PCR 法によって調べた。

Wnt3a 刺激により活性化される細胞内シグナル伝達経路について情報を得るため、Wnt3a 含む培地に種々の阻害剤を添加した。これらの培養液中で培養した hMSC 内における CEMP-1 の発現について real-time PCR 法およびウエスタンブロッティング法によって分析した。用いた阻害剤は次の通りである。 β -catenin/Wnt 経路阻害剤 (DKK-1, ICG-001),

ERK 阻害剤 (PD98059), JNK 阻害剤 (SP600125), p38 阻害剤 (SB203580)。

【結果】

hMSCs 培養系に Wnt3a を加えた結果, 濃度および時間に依存して CEMP-1 の mRNA 発現量が増加した。また, その他の遺伝子 (CAP, ALP, OCN, DSPP, β -catenin, Axin2, BMP-2, BDNF) についても Wnt3a の添加によって mRNA 発現量が有意に増大した。

β -catenin/Wnt 経路, ERK, p38 に対するいずれの阻害剤も, Wnt3a 刺激で増加した CEMP-1 の発現量を減少させた。一方, JNK 阻害剤は, CEMP-1 の発現を増大させた。

【考察】

hMSC に Wnt3a を作用させた結果, CEMP-1 をはじめ, その他のセメント芽細胞・骨関連遺伝子の発現が亢進したことから, Wnt3a は hMSC からセメント芽細胞様細胞への分化を促進するものと考えられる。Wnt3a は, 細胞膜上の frizzled および LRP5/6 へ結合することによって細胞内にそのシグナルが伝達され, 古典的 β -catenin/Wnt 経路を介して下流の遺伝子発現が調節される。このカスケードに対する阻害剤 (DKK1, ICG-001) を用いた実験結果から, Wnt3a による分化誘導促進にも, 同経路の活性化が重要であると考えられる。ただし, Wnt3a 添加によって, 同経路のシグナル伝達分子である β -catenin および Axin2 の発現量も増大したことから, Wnt3a による β -catenin/Wnt 経路の活性化は自己触媒的な作用を惹起することを示唆する。

さらに, Wnt3a 添加による BMP-2 および BDNF の発現亢進は, β -catenin/Wnt 系の活性化のみならず, BMP-2 や BDNF 等の因子によるパラクリン的な作用もセメント芽細胞への分化に影響を及ぼす可能性のあることを示唆する。阻害剤を用いた実験結果から, ERK および p38 を介するシグナル伝達経路の関与が示唆され, またこれとは逆に, JNK 経路の活性化はセメント芽細胞への分化にとって阻害的に働くものと推測される。

以上のように, Wnt3a の作用は, β -catenin/Wnt 経路の単純な活性化のみならず, 同経路の自己触媒的な作用, ERK あるいは p38 を介したシグナル伝達, さらには分泌性のタンパク質因子のパラクリン作用も関与する可能性のあることが示唆された。

【結論】 Wnt3a は, hMSCs からセメント芽細胞様細胞への分化を促進する。その作用機序には, 古典的 β -catenin/Wnt 経路を含む複数のシグナル伝達経路が関与する。