

論 文 内 容 要 旨

歯周組織由来細胞の液性因子による
間葉系幹細胞の骨分化制御

応用生命科学部門歯周病態学

(主指導教員：栗原 英見 教授)

基礎生命科学部門細菌学

(副指導教員：菅井 基行 教授)

応用生命科学部門歯周病態学

(副指導教員：柴 秀樹 准教授)

田 英里

論文内容要旨

論文題目 歯周組織由来細胞の液性因子による間葉系幹細胞の骨分化制御

学位申請者 田 英里

歯周組織再生のひとつとして間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 移植が行われている。移植された MSC は、移植先において他の細胞の直接接触または間接触により転写因子, microRNA (miRNA), サイトカインなどを介して、増殖・分化の制御を受けていると考えられる。液性因子が他の細胞に与える影響についてはいくつか報告されており、歯周組織構成細胞から分泌される液性因子も MSC の分化に影響を与えられられる。

そこで本研究では、歯周組織構成細胞であるヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts, HGF) とヒト歯周靭帯細胞 (human periodontal ligament cells, HPL cells) に着目し、HGF および HPL cells から分泌される液性因子がヒト MSC (hMSCs) の骨分化に与える影響について調べることを目的とした。

細胞は腸骨骨髓由来の hMSCs および HGF, HPL cells を用いた。HGF と HPL cells の液性因子の hMSCs に対する作用を調べるために Transwell®を用いて非接触下での共培養を行った。プレート上に hMSCs, Transwell®上に HGF または HPL cells を培養した。hMSCs だけの共培養をコントロールとした。まず、骨分化誘導時において HGF あるいは HPL cells との共培養が hMSCs の骨分化に与える影響を確認した。10% FBS を添加した α -MEM を基礎培地とし、骨分化誘導には dexamethasone, ascorbic acid-2-phosphate, β -glycerophosphate を添加した。3, 7, 14 日間共培養を行ったのち、hMSCs から RNA を抽出し、骨分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を Real-time PCR によって検討したところ、hMSCs との共培養と比較し、hMSCs における Osteocalcin, BMP2, Runx2 の mRNA 発現は減少した。タンパク発現を Western Blotting を用いて確認したところ、HGF および HPL cells との共培養で Osteocalcin 発現の減少がみられた。さらに、Alizarin red 染色を行ったところ、培養開始 2 週間後に石灰化が抑制されていた。このことから、HGF および HPL cells 由来の液性因子は hMSCs の骨分化を抑制することが示唆された。

次に、転写因子と miRNA が液性因子によって影響を受けると考えられるため、それらの発現について検討した。MSC が発現する未分化マーカーとして 9 つの転写因子 (ETV1, ETV5, FOXP1, GATA6, HMGA2, KLF12, PRDM16, SIM2, SOX11) が報告されており、今回はそれらに着目した。また、いくつかの miRNA は MSC の分化を制御すると報告されている。そこで、hMSCs は未分化状態において HGF, HPL cells 由来の液性因子によって、上述の転写因子や miRNA を介して制御されていると仮定し、以下の実験を行った。

まず、Transwell®を用いた共培養を行い、未分化状態の hMSCs における未分化マーカー転写因子と miRNA の発現を検討した。培地は 10% FBS を添加した DMEM を用いた。

別紙様式 2

hMSCs を HGF あるいは HPL cells と 1, 3, 7 日間共培養を行い、未分化マーカー転写因子の mRNA 発現を比較したところ、いくつかの転写因子で発現の変化を認めた。さらに、一定の発現傾向を示す miRNA を同定するために、1, 7 日間共培養を行い、miRNA Array を用いて 377 種類の miRNA 発現レベルの解析を網羅的に行った。HGF あるいは HPL cells 由来の液性因子によって、hMSCs の骨分化が抑制されていることから、今回は、同様の発現傾向を示している miRNA に注目した。hMSCs と HGF あるいは HPL cells と共培養、共培養 1 日目と 7 日目で共通して 2 倍以上の発現の差が認められた miRNA に着目したところ、miR-101-3p の発現上昇、miR-125a-3p と miR-299-5p の発現減少がみられた。miRNA ターゲット探索データベースを参考にし、未分化マーカー転写因子発現と骨分化に影響を与える miR-101-3p と miR-299-5p についてさらに検討を加えた。

これらの miRNA が hMSCs における、未分化マーカー転写因子の発現と骨分化に与える影響について検討した。miR-101-3p, miR-299-5p の mimic および inhibitor (mirVana™) を hMSCs にトランスフェクションし、3 または 7 日間通常培養したのち、9 つの未分化マーカー転写因子の mRNA 発現を検討したところ、これらの miRNA はいくつかの未分化マーカー転写因子の mRNA 発現レベルを制御したが、HGF と HPL cells 由来の液性因子と miRNA との間で相関関係は認められなかった。これは、他の因子、あるいは転写後の制御が関与していると考えられる。最後に、miR-101-3p inhibitor と miR-299-5p mimic のトランスフェクション後に 14 日間骨分化誘導培地で培養したところ、Osteocalcin の mRNA 発現は上昇した。さらに、miR-299-5p mimic のトランスフェクションにおいて Alizarin Red 染色によって石灰化の促進を確認した。miR-299-5p は骨分化を促進したが、一般的に miRNA は抑制作用を有するため、miR-299-5p によって抑制された因子が骨分化を促進していると考えられる。また、miR-101-3p は Osteocalcin の mRNA 発現のみ制御したが、転写から石灰化までの間に何らかの因子が関係している可能性が考えられる。

以上のことから、HGF と HPL cells 由来の液性因子は hMSCs の骨分化を抑制し、それらの液性因子は hMSCs において、miR-101-3p および miR-299-5p を介していくつかの未分化マーカー転写因子発現および骨分化を制御していることが示唆された。