

# 論文内容要旨

## 骨髄間葉系幹細胞集塊 C-MSCs における YAP/TAZ の役割

主指導教員：栗原 英見 教授  
(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

副指導教員：宿南 知佐 教授  
(医歯薬保健学研究科 生体分子機能学)

副指導教員：加藤 功一 教授  
(医歯薬保健学研究科 生体材料学)

小松 奈央

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

歯周炎は歯周病原菌の感染に対する宿主応答の結果、歯周組織の破壊が起こる炎症性疾患である。歯周炎は糖尿病、関節リウマチ、血管障害、非アルコール性脂肪性肝炎、早産／低体重児出産など様々な疾患の発症や進行に関わっている。歯周組織再生療法によって破壊された歯周組織の構造および機能を回復することは、歯周炎の再発リスクを低減するだけでなく全身の健康の維持・増進に重要である。

現在の歯周組織再生療法の適応症は小規模な組織破壊であり、GTR 法やサイトカイン療法がある。一方で、実際には 1 壁性骨欠損や水平性骨吸収など、広範囲にわたる歯周組織破壊も多い。大規模な歯周組織欠損では組織再生に関わる細胞数が少なく、残存する細胞の機能を制御するだけでは組織再生は困難である。そのため、大規模な歯周組織欠損に対しては全く新しい概念の再生療法の確立が必要であり、再生に関与する細胞を生体外から補充する細胞治療が適していると考えられる。

私どもの研究室では様々な形態や大きさの組織欠損を治療対象とするための unit として骨髄間葉系幹細胞 (MSC) と細胞自身が産生する細胞外基質 (ECM) から、3 次元的な細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs) を作製した。C-MSCs の特徴は、①直径約 1mm の球状細胞集塊で、その大きさと形状から良好な操作性を有す。②人工の足場材料を用いることなく欠損部位に直接移植することが可能である。③複数の C-MSCs をさらに結合させることが可能であり様々な形や大きさに適用できる。これまでにラットの頭蓋冠欠損モデルやビーグル犬のⅢ級根分岐部病変モデルにおいて C-MSCs の移植が効果的な骨再生を誘導することを報告してきた [1, 2]。

C-MSCs を実際に臨床応用するためには、C-MSCs 内の細胞性質を詳細に解明しておく必要がある。C-MSCs の性質を解明するための重要な情報に、近年、基質の固さ、細胞密度、浮遊状態などの因子がメカノトランスダクションを誘導し、転写共役因子 YAP/TAZ を介して MSCs の細胞分化を制御するという報告がある。そこで浮遊状態で 3 次元的に培養される C-MSCs 内では 2 次元培養とは異なるメカノトランスダクションが生じ、YAP/TAZ を制御している可能性があるかと推定した。本研究では C-MSCs における YAP/TAZ の動態とその役割を明らかにすることを目的とした。

## 【材料と方法】

ヒト MSCs を 24-well plate に  $2.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸含有の増殖培地で 4 日間培養し十分な ECM を産生させた。培養した細胞を鈍的に剥離し、シートの状態で浮遊させ、増殖培地でさらに 5 日間培養することで 3 次元的な細胞集塊 C-MSCs を得た。またこれとは別に C-MSCs 作製過程を骨分化誘導培地で行うことで、骨分化誘導を施した C-MSCs (OIM-C-MSCs) を作製した。C-MSCs および OIM-C-MSCs について、培養過程における I 型コラーゲンの発現、F-actin の形態、YAP/TAZ の局在と活性、さらに MSCs の分化能を解析した。

## 【結果と考察】

C-MSCs 作製過程における浮遊培養状態では、F-actin の脱重合が促進した。これと一致して、経時的な YAP/TAZ の核外移行、発現量の低下、および活性の低下が生じた。さらに、C-MSCs は骨分化能より脂肪・軟骨分化能が高かった。F-actin の脱重合に必須の cofilin1 に対する siRNA を導入したところ、YAP/TAZ 活性が上昇し、脂肪・軟骨分化能が低下し、骨分化能が上昇した。一方、OIM-C-MSCs は C-MSCs と比較して豊富な I 型コラーゲンで形づくられており、高い YAP/TAZ 活性を示した。この YAP/TAZ 活性は、Integrin $\beta$ 1 siRNA 導入、もしくは F-actin 重合阻害剤である Y-27632 とあるいは blebbistatin によって抑制された。以上のことから、3 次元培養される C-MSCs においては、浮遊状態であることが F-actin の脱重合を介したメカノトランスダクションを誘導し、YAP/TAZ の核外移行を促進して活性を減弱させると考えられる。一方で、OIM-C-MSCs では豊富な I 型コラーゲンを足場とすることで、F-actin の伸展を介して YAP/TAZ 活性の低下が抑制されたと考えられる。そして、この YAP/TAZ 活性の違いが、C-MSCs 内の細胞の分化運命の調節に関与していると考えられる。

## 【結論】

C-MSCs においてメカノトランスデューサーである YAP/TAZ が細胞分化を制御する可能性が示された。

## 参考文献

- [1] Kittaka M et al., *Cytotherapy*, 2015; 17(7): 860-873
- [2] Takewaki M et al., *J Dent Res*, 2017; 96(9): 984-991