

論文内容要旨

脂肪由来間葉系幹細胞の細胞増殖調節機構に対する
完全長アメロゲニン・C末端側アメロゲニンペプチドの影響
及び線維性異形成症モデルマウスから
骨形成阻害に関与する原因遺伝子の探索

主指導教員：谷本 幸太郎 教授
(医系科学研究科 歯科矯正学)
副指導教員：入船 正浩 教授
(医系科学研究科 歯科麻酔学)
副指導教員：上田 宏 准教授
(医系科学研究科 歯科矯正学)

安藤 和代

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

第1章

口唇裂・口蓋裂（CLP）は、頭蓋顎顔面領域において最も高い発症率を示す先天性疾患である。顎裂を有する患者において現在腸骨海綿骨移植が広く行われている。しかし、外科的侵襲の負担は大きく、腸骨採取後の疼痛や歩行障害などの問題が伴う。そこで、我々は脂肪由来間葉系幹細胞（hADSCs）に着目した。脂肪組織の採取は低侵襲であり、単位容積あたりの幹細胞数が多く多分化能を有することが知られている。組織再生は、細胞、担体、生理活性物質の三要素が重要であり、幹細胞移植に際し移植部に生理活性物質の供給を行うことにより組織再生がより有利に導かれる可能性がある。アメロゲニン（amg）はエナメル質形成期にエナメル芽細胞より分泌される細胞外基質の約90%を占める蛋白質であり、硬組織を無細胞性に誘導する働きを有している。

しかし amg が、hADSCs の代謝に及ぼす影響については明らかにされていない。本研究では amg C 末端ペプチド（amgCP）が、hADSCs の増殖能に及ぼす影響とその作用機序について検討した。hADSCs にヒトリコンビナント完全長 amg（rh174）及び amgCP を添加した際の細胞増殖能について、MTS assay 及び BrdU assay を用いて検討するとともに、Cell Adhesion Assay を用いて細胞接着能を検証した。そして、rh174 及び amgCP 添加が、hADSCs において LAMP1 受容体を介した MARK シグナル伝達経路に及ぼす影響について検討を行った。抗 LAMP1 抗体を使用し、rh174 及び amgCP 添加時の LAMP1 を介した増殖能に対する影響を BrdU assay により検討した。また MEK 選択的阻害剤である U0126 存在下における rh174 及び amgCP が hADSCs の細胞増殖能に及ぼす影響について BrdU assay を用いて検討するとともに、ERK のリン酸化について ELISA を用いて定量的に検討した。さらに、U0126 存在下における ERK、p-38、JNK、Elk のリン酸化タンパク質の発現について、Western blot 解析を行った。その結果、以下の結果が明らかとなった。

1. MTS assay において、rh174 及び amgCP 添加群は、対照群と比較して培養 6 日目に有意な生細胞数の増加が認められた。BrdU assay において、rh174 及び amgCP 添加群は、対照群と比較して有意な DNA 合成能の亢進が認められた。Cell Adhesion Assay において rh174 及び amgCP 添加群は、対照群と比較して有意な細胞接着能の亢進が認められた。
2. BrdU assay において、rh174 及び amgCP により亢進した細胞増殖能が抗 LAMP1 抗体により有意に抑制された。また rh174 及び amgCP 添加群は、対照群と比較し、細胞増殖能及び ERK のリン酸化が有意に亢進した。一方、rh174 及び amgCP 添加により亢進した細胞増殖能及び ERK のリン酸化は、U0126 添加によって有意に抑制された。そして、Western blot 解析において、amgCP 添加群は、対照群と比較して、ERK および Elk のリン酸化タンパク質の発現を亢進させ、U0126 添加によって有意に抑制された。

以上の結果より、rh174 及び amgCP は、hADSCs の細胞増殖能及び細胞接着能に対して影響を及ぼすことが明らかとなった。また、その作用機序として LAMP1 受容体を介した MARK/ERK/Elk シグナル伝達経路の活性化が示された。

第2章

線維性異形成症は骨が幼若な線維骨と線維性結合組織の増生により置換される疾患である。Gタンパク共役型受容体において細胞内情報伝達を担う Gsa タンパクの活性変異が発症の原因とされている。これまで、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (mBMSCs) に特異的に発現する Prrx1 のプロモーターを用いて活性化変異したドキシサイクリン (Doxy) 誘導 GNAS 遺伝子を発現させるモデルマウス (Prrx1-Cre / Linker / Tet-H2BGFP / Tet-Gas^{R201C}) が樹立された。これを用いた検討により GNAS 遺伝子の恒常的な活性化が正常な骨分化過程を阻害し、未成熟な細胞が増加した結果、線維性異形成症が発症することが明らかにされた。そこで、本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSCs) に GNAS 遺伝子を導入し骨分化への影響を検討するとともに、上記モデルマウスを使用し GNAS 遺伝子下流で変動する遺伝子を網羅的な遺伝子発現解析により特定した。まず GNAS 遺伝子を導入した hBMSCs (GNAS 群) を骨分化誘導した後に、アリザリンレッド (ALZ) 染色、RT-PCR による骨分化マーカーの検討を行った。さらに、上記モデルマウスで Tet-Gas^{R201C} を有する疾患発症群と有さない対照群を用意し、Doxy を投与後、後肢の長管骨より骨髄を採取、Fluorescence-activated cell sorter scan を使用して、GFP 発現細胞をソーティングし、RNA sequence により遺伝子探索を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. ALZ 染色において、GNAS 群では対照群に比べ骨分化の抑制が観察された。また RT-PCR においては GNAS 群では早期骨分化マーカーの増加、対照群では後期骨分化マーカーの増加が確認された。以上のことより、GNAS 群では、骨分化過程の阻害が確認された。
2. RNA sequence では、疾患発症群において対照群と比較し Cecr2 および、Chst3 遺伝子が有意に低下していることが明らかとなった。

本研究結果では、GNAS 遺伝子の活性化によって骨分化が抑制されること、これに Cecr2、Chst3 遺伝子が関与していることが明らかとなり、線維性異形成症の発症機序として重要であることが強く示唆された。