

全文要約

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

安藤 和代

第 1 章

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り、現在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。そこで本研究では、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。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 の細胞増殖能、DNA 合成能に及ぼす影響とその作用機序、及び細胞接着能に及ぼす影響について検討した。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、DNA 合成能について BrdU assay を用いて検討するとともに、Cell Adhesion Assay によって細胞接着能を評価した。さらに、amgCP 添加が、hADSCs において LAMP1 受容体を介した MAPK シグナル伝達経路に及ぼす影響について検討するため、抗 LAMP1 抗体を使用して、amgCP 添加時の LAMP1 を介した DNA 合成能に対する影響を 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 DNA 合成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 法を用いて定量的に検討した。さらに、U0126 存在下における rh174 及び amgCP の ERK、p-38、JNK、Elk のリン酸化への影響について、Western blot 解析を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

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、amgCP により亢進した DNA 合成能が抗 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、DNA 合成能及び 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 DNA 合成能及び ERK のリン酸化は、U0126 添加によって有意に抑制された。さらに、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、DNA 合成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、amgCP 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

FD 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。FD の原因は、G タンパク共役型受容体 (GPCR) の構成要素である Gas サブユニットをコードする guanine nucleotide-binding protein, alpha stimulating activity polypeptide 1 (GNAS) 遺伝子の変異であると報告されている。これまでに、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、ドキシサイクリン (Doxy) 誘導変異 GNAS ($\text{GNAS}^{\text{R201C}}$) 遺伝子を発現するモデルマウス (*Prrx1*-Cre/Linker/Tet-Gas $^{\text{R201C}}$) が樹立された。これを用いた検討により Gas タンパク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する結果、線維性異形成症が発症することが明らかにされた。本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSCs) に $\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 遺伝子を導入し骨分化への影響を検討するとともに、上記モデルマウスに Tet-H2BGFP 遺伝子を導入した FD モデルマウス (*Prrx1*-Cre/Linker/Tet-Gas $^{\text{R201C}}$ /Tet-H2BGFP) を作製し、 $\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 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。 $\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 遺伝子を導入した hBMSCs ($\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 群) を骨分化誘導した後に、アリザリンレッド (ALZ) 染色及び定量 PCR による骨分化マーカーの発現解析を行った。さらに、FD モデルマウスで Tet-Gas $^{\text{R201C}}$ を有する FD 発症群と有さない対照群に対し、Doxy を投与後、後肢の長管骨より骨髄を採取し、GFP 発現細胞を FACS を用いてソーティングし、RNA sequence による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、 $\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 群では対照群に比べ骨分化の抑制が観察された。また、定量 PCR においては、 $\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 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認められた。以上のことより、 $\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 群では、骨分化過程が阻害されることがわかった。
2. RNA sequence では、FD 発症群において対照群と比較し、*Cecr2* 及び *Chst3* 遺伝子が有意に低下していることが明らかとなった。

以上の結果より、 $\text{GNAS}^{\text{R201C}}$ 遺伝子による Gas タンパクの活性化により骨分化が抑制されること、また、この抑制に *Cecr2* 及び *Chst3* 遺伝子が関与していることが明らかとなり、FD の発症機序として重要であることが示唆された。