

論 文 要 旨

Elucidation of adipogenic differentiation regulatory mechanism
in human maxillary/mandibular bone marrow-derived stem cells〔 ヒト上顎/下顎骨骨髓由来間葉系幹細胞における
脂肪分化制御機構の解明 〕

宮田 春香

【序論及び目的】

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSC) は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などのさまざまな細胞に分化可能であることから、再生療法における有望な細胞源と考えられている。MSC は、骨髓、脂肪組織、筋肉など全身のさまざまな組織に存在しており、口腔内では歯髄や歯根膜、歯肉だけでなく上顎および下顎骨骨髓内にも存在することが報告されている。口腔顔面領域および腸骨から分離された MSC は、それぞれ由来する組織の違いにより部位特異的な特徴を示すことが報告されている。我々の以前の研究では、上顎/下顎骨由来 MSC(Maxillary/mandibular Bone Marrow-derived Stem Cells: MBMSC)の骨形成能が腸骨骨由来 MSC(Iliac Bone Marrow-derived Stem Cells: IBMSC)の骨形成能と類似している一方で、MBMSC の脂肪細胞能は著しく低く、ほとんど分化しないことが明らかとなった。しかしながら、このような MBMSC の分化を制御するメカニズムは依然として不明である。本研究では、MBMSC の脂肪分化を調節する根本的な分子機構を解明することを目的とする。また、MBMSC の持つ部位特異的特性を明らかにすることで、再生医療への利用に向けた MBMSC の生体内での機能を解明するための重要な基礎となると考える。

【材料及び方法】

MBMSC は患者の同意のもと採取した骨髓液から分離・培養した3株を使用し、IBMSC は Lonza 社より購入した3株を使用した。多分化能の評価では、骨分化誘導後にアリザリンレッド染色、脂肪分化誘導後に Oil-Red O 染色、軟骨分化誘導後にトルイジンブルー染色を行った。フローサイトメトリーで各細胞表面抗原発現を評価した。未分化または脂肪分化誘導時に各細胞より RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作成後、リアルタイム PCR で遺伝子発現を評価した。脂肪分化誘導時に各細胞からセルライゼートを作成し、各抗体を用いてウェスタンブロッティングにてタンパク質発現を評価した。脂肪分化誘導に伴う細胞内グルコース濃度変化は Glucose Assay Kit-WST (DOJIN) を用いて評価した。

【結 果】

1. MBMSC および IBMSC の細胞表面抗原および幹細胞マーカーの発現比較

MBMSC および IBMSC における一般的に MSC マーカーとして用いられている 12 種類の細胞表面抗原発現レベルをフローサイトメトリーにて比較を行った。両方の MSC でこれまで報告された細胞表面抗原発現パターン

(CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, および HLA-ABC が陽性, CD11, CD34, CD45, および HLA-DR が陰性) と類似していた。しかし、CD105 および HLA-DR の発現パターンは、MBMSC と IBMSC の間でわずかに異なっていた。また、MSC 多能性の維持に重要である幹細胞マーカーとして知られている OCT4, Nanog および SOX2 の遺伝子発現に関しても、未分化 MBMSC と IBMSC の間で、発現に有意差はなかった。これらの結果から MBMSC と IBMSC で幹細胞性に差はないといえる。

2. MBMSC と IBMSC の分化能の比較

MBMSC および IBMSC を骨分化誘導培地で 14 日間培養し、アリザリンレッド染色を行ったところ、MBMSC と IBMSC の間で骨形成能に差は認めなかった。また、両 MSC の軟骨分化能について 28 日間のペレット培養後にトルイジンブルー染色を行ったところ、すべての細胞で軟骨様組織が確認され、軟骨形成分化能に差は認めなかった。次に、両 MSC の脂肪分化能を比較するため脂肪分化培地で 14 日培養後、Oil Red-O 染色を行ったところ IBMSC は多くの脂肪滴の蓄積を示したが、MBMSC は少数の脂肪滴のみを示した。また、MBMSC の脂肪滴面積は IBMSC よりも有意に小さかった。これらの結果から MBMSC では脂肪分化能のみが有意に低いといえる。

3. MBMSC および IBMSC における初期脂肪分化因子発現の評価

MBMSC が示す低脂肪分化能の機序を解明するため、脂肪分化関連因子の発現について評価を行うこととした。MSC の脂肪分化には、さまざまな転写因子が関与する複雑な段階によって制御されている。C/EBP β および C/EBP δ は、脂肪分化の初期段階で誘導され、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化において重要な役割を果たす転写因子である。脂肪生成分化後 72 時間後の MBMSC および IBMSC における発現を比較したところ、未分化細胞 (0 h) では、MBMSC の C/EBP β および C/EBP δ の mRNA 発現量は、低い傾向を示した。また、C/EBP β および C/EBP δ の mRNA の発現は、両 MSC で脂肪分化中に増加したが、MBMSC では、すべての時点で IBMSC よりも有意に低かった。タンパク質レベルに関しても C/EBP β および C/EBP δ の MBMSC での発現レベルは有意に低かった。初期脂肪分化転写因子である Ebf-1 および KLF5 は、C/EBP β および C/EBP δ によって調節される。したがって、Ebf-1 と KLF5 が MBMSC の脂肪生成分化の調節に関与しているかどうかを調査した。Ebf-1 mRNA 発現は、未分化 MBMSC で有意に低かった。MBMSC における Ebf-1 および KLF5 mRNA およびタンパク質の発現は、脂肪分化期間を通じて IBMSC よりも低かった傾向であった。これらの結果から、MBMSC では脂肪分化前期における脂肪分化関連因子の発現が IBMSC と比較して低いことが明らかとなった。

4. MBMSC および IBMSC における後期脂肪分化因子発現の評価

PPAR

γ および C/EBP α は、さまざまな脂肪細胞代謝因子の発現を促進し、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への最終分化を誘導する必須の転写因子である。したがって、MBMSC および IBMSC の成熟脂肪細胞への最終分化段階における分子発現を評価した。脂肪分化誘導により、両 MSC で PPAR γ および C/EBP α の mRNA およびタンパク質の発現が増加したが、MBMSC での発現レベルは、すべての時点で IBMSC での発現レベルよりも低かった。次に、MBMSC および IBMSC における脂肪生成制御遺伝子の発現を比較した。IBMSC では、aP2、LPL、アディポネクチン、および GLUT4 の発現レベルが脂肪分化誘導 7 日目に有意に増加したが、MBMSC ではほとんど変化はなかった。脂肪分化誘導に伴う細胞内へのグルコース取り込み能の評価では、脂肪分化誘導後 10 および 14 日目で、MBMSC による細胞内グルコース濃度は IBMSC による細胞内グルコース濃度よりも有意に低かった。これらの結果から、MBMSC では脂肪分化後期および脂肪成熟における脂肪分化関連因子の発現が IBMSC と比較して低いことが明らかとなった。

5. MBMSC および IBMSC における脂肪生成系統決定因子の発現の評価

次に、未分化間葉系幹細胞における脂肪細胞への系統決定を制御する Zfp423 の発現を評価した。Zfp423 mRNA レベルは、未分化 MBMSC で有意に低かった。また、Zfp423 タンパク質発現も MBMSC で低い傾向を示した。

【結論及び考察】

本研究の結果から MBMSC は未分化細胞から脂肪前駆細胞への分化過程および脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への最終分化過程の両ステップが制御されることによって脂肪分化が抑制される可能性が見出された。しかし、MBMSC が示すこのような特徴的な性質は、由来する骨組織の発生学的な違いに起因するものか、MBMSC と IBMSC が局在する微小環境の違いによって制御されているのかは現時点では不明であり、今後さらなる検討が必要である。