

論 文 要 旨

Vascular Endothelial Growth Factor-C induces Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells through the ERK and RUNX2 Pathway

VEGF-C は ERK, RUNX2 経路を介して
ヒト間葉系幹細胞の骨分化を促進する

村上 寿理

【序論及び目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

外傷、腫瘍切除、歯周疾患などにより生じた骨欠損に対して現在、自家骨移植がゴールドスタンダードとされているが、採骨量、合併症、疼痛などの様々な問題がある。間葉系幹細胞 (MSC) は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などに分化する細胞であるため、MSC は骨欠損に対する治療に有用であると考えられている。幹細胞移植による骨欠損の治療効果は、ドナーの年齢や欠損量などに密接に関係しており、大きな骨欠損や高齢患者のような症例では十分な骨再生効果を得られない為、このような患者において適切な骨再生を行う為に、MSC の骨誘導能を高めることが必要と考えられる。

これまで BMP、PDGF、TGF- β などの様々な成長因子が骨誘導能を高め、骨再生を促進するとの報告が数多くある。VEGF は強力な血管新生作用を有し、骨再生においても重要な役割をすることが報告されている。VEGF には7つのファミリーメンバーが存在し、VEGF-A が骨再生促進効果を有することは多数報告されているが、他の VEGF メンバーに関しては未だ報告が少ない。

VEGF-C は VEGFR2、VEGFR3 をレセプターとし、リンパ管新生を誘導することが知られている。VEGF-C が VEGFR3 を介して破骨細胞を活性化し、骨吸収を促進することが報告されている。従って、VEGF-C シグナルは骨形成において重要な役割を果たすことが考えられるが、VEGF-C による骨分化促進効果については不明である。そこで本研究では、VEGF-C による MSC の骨分化促進効果とその分子メカニズムについて検討を行った。

【材料及び方法】

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(hMSC)において VEGFR2、VEGFR3 の発現を western blot によって確認した。MSC における VEGF-C 発現については angiogenic protein array を用いて評価を行なった。次に VEGF-C による MSC の骨分化促進効果の評価として、骨分化誘導培地に VEGF-C (1, 10, 25, 50 ng/ml) を添加し、アリザリンレッド染色、Alkaline phosphatase (ALP)活性定量、骨分化関連マーカー (bone sialoprotein、type I collagen、ALP、osteocalcin、Runx2) 発現解析を行った。また、VEGF-C による骨分化促進に関わる細胞内シグナルについて解明するために ERK、JNK、p38、Akt シグナルについて western blot によって評価を行った。さらに、VEGF-C による骨分化促進作用が VEGFR2 および VEGFR3 のいずれのレセプターを介して誘導されるか明らかにするために、VEGFR2、VEGFR3 阻害剤である Ki8751、MAZ51、および VEGFR3 選択的リガンドである VEGF-C156S を添加した際の骨分化促進作用を評価した。また、VEGF-C による骨分化促進における ERK シグナルの関与を検証するために、ERK

阻害剤である U0126 を添加し、VEGF-C による骨分化促進作用に与える影響について評価した。

【結 果】

本研究にて用いた MSC において VEGFR2、VEGFR3 の両レセプターが発現していることが確認された。一方、protein array の結果により MSC は通常の培養条件では VEGF-C を分泌していないことが明らかとなった。骨分化誘導時に VEGF-C を添加することによって石灰化の促進が認められ、10ng/ml 以上の VEGF-C の添加により有意な ALP 活性の上昇を認めた。また、VEGF-C の添加により、骨分化関連遺伝子マーカーである bone sialoprotein、type1 collagen、ALP、osteocalcin の発現が有意に上昇した。MSC の骨分化において重要な転写因子である RUNX2 が VEGF-C (50ng/ml) の添加により、経時的に発現が誘導されることが明らかとなった。western blot の結果と同様に、蛍光免疫染色によっても VEGF-C の添加による RUNX2 の発現上昇が確認された。

VEGF-C は MSC の VEGFR2、VEGFR3 のリン酸化を誘導することが確認された。また、VEGF-C156 S の添加によっても MSC の石灰化が促進することが示され、Ki8751、MAZ51 を添加することにより VEGF-C によって誘導される石灰化促進作用が抑制されることが明らかとなった。以上の結果より VEGF-C による MSC の骨分化促進作用は VEGFR2、VEGFR3 の両レセプターを介して誘導されることが明らかとなった。

VEGF-C による骨分化促進に関わる細胞内シグナルの解明を目的として、western blot を行った結果、VEGF-C の添加により ERK のリン酸化が促進することが明らかとなった。一方、JNK、p38、Akt シグナルには影響を与えなかった。

次に VEGF-C による骨分化促進作用における ERK シグナルの関与をさらに検証することを目的とし、U0126 添加による影響を評価した。U0126 処理を行うことにより、VEGF-C によって誘導される ALP 活性上昇、石灰化促進作用を著明に抑制することが明らかとなった。さらに、U0126 を添加することによって、VEGF-C により誘導される RUNX2 発現が抑制されることも明らかとなった。

【結論及び考察】

本研究により、VEGF-C は MSC の VEGFR2 および VEGFR3 の両レセプターを介して ERK シグナルを活性化し、RUNX2 発現を誘導することにより骨分化を促進することが明らかとなった。

VEGF-C は通常の培養条件では MSC から分泌されないが、骨分化誘導後期 (21 日目) に発現が上昇するという報告がある。このことから、骨分化誘導後期には、オートクライン的作用によっても MSC の石灰化が促進される可能性が考えられる。

過去の報告により VEGF-C は破骨細胞を活性化し、骨吸収を促進することが示されている。本研究によって VEGF-C による MSC の骨分化促進作用が明らかとなったことから、VEGF-C は骨のリモデリングにおいて重要な役割を担い、それにより骨修復を促進させる可能性が考えられる。

本研究において、ERK シグナルを阻害することによって VEGF-C 非添加群の MSC においても石灰化が抑制されることが確認された。ERK シグナルは RUNX2 以外にも Msx2、Dlx5 などの転写因子発現調節にも関与することが知られているため、今回 U0126 による ERK シグナルの阻害によってこれらの転写因子の発現も抑制された可能性が考えられる。従って、ERK/RUNX2 シグナルを介した経路は、VEGF-C によって誘導される骨分化促進において部分的に関与している可能性が考えられる。本研究によって見いだされた結果により、VEGF-C は骨欠損の治療に有用であると示唆される。