

論 文 要 旨

Evaluation of the effect of platelet-derived growth factor-BB on the biological activity of human mandibular bone marrow-derived mesenchymal stem cells

〔血小板由来成長因子 BB がヒト下顎骨骨髓由来間葉系幹細胞の
生理活性へ与える影響の評価〕

大浦 悠梨香

【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、脂肪細胞などに分化できる幹細胞であり、組織再生の細胞源として期待されている。MSC は全身のさまざまな組織に存在しており、口腔内では顎骨骨髓、歯髄、歯根膜などに存在している。

血小板由来成長因子-BB (PDGF-BB) は前臨床試験でインスリン様成長因子との併用によりサルの歯周組織再生を促進し、また、イヌの垂直性骨欠損モデルにおいてウシ由来のブロック骨移植と組み合わせることで垂直性の骨再生が得られたと報告されている。PDGF-BB の歯周組織再生のメカニズムとして、PDGF-BB は大腿骨や腸骨骨髓由来 MSC の増殖、骨分化、遊走を促進すること、さらに様々な細胞内シグナル伝達経路が関与しており Akt シグナルの活性化が重要であることが報告されている。

しかし、ヒト下顎骨骨髓由来間葉系幹細胞 (MBMSC) に対する PDGF-BB の生理活性は不明である。そこで、本研究は MBMSC の生理活性に対する PDGF-BB の影響を調べることを目的とした。

【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 株を使用した。PDGF-BB (20ng/mL) を用いて MBMSC を処理し、その増殖、骨分化、遊走に対する効果を評価した。細胞増殖は WST-1 アッセイを用いて評価した。骨分化能は、石灰化能とアルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定することで評価した。細胞遊走は、創傷治癒アッセイとトランスウェルチャンバーアッセイを用いて評価した。細胞骨格の再編成と接着動態は、免疫蛍光染色を用いて評価した。PDGF-BB 刺激による MBMSC の細胞内シグナル伝達の変化は、ウェスタンブロッティングを用いて評価した。さらに、PDGF-BB による細胞遊走制御の分子メカニズムとして、Girdin シグナル伝達を検討した。

【結 果】

1. PDGF-BB が MBMSC の増殖へ与える影響

MBMSC を PDGF 添加または無添加の培地で 24, 48, 72 時間培養した。WST-1 アッセイにて 450nm の吸光度を測定し、また、顕微鏡下で細胞数を測定した。PDGF-BB 添加群、無添加群いずれも経時的に増殖傾向を示したが、どの時点においても 2 群間に有意差を認めなかった。したがって、PDGF-BB は MBMSC の増殖能に影響を与えないといえる。

2. PDGF-BB が MBMSC の骨分化へ与える影響

MBMSC を骨分化培地で 7 日間培養し、アルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定したところ、骨分化誘導することで ALP 活性は上昇したが、PDGF-BB 処理による ALP 活性の変化は認められなかった。次に、MBMSC を骨分化培地で 14 日間培養し、アリザリンレッド染色を行ったところ、PDGF-BB 添加群と無添加群の間に石灰化能に明らかな差は認めなかった。これらの結果から、PDGF-BB は MBMSC の骨分化能に影響を与えないといえる。

3. PDGF-BB が MBMSC の遊走へ与える影響

まず、創傷治癒アッセイを行った。MBMSC をコンフルエントまで培養後、200 μ L ピペットチップで細胞層をスクラッチし、PDGF-BB 添加または無添加培地で培養した。スクラッチ後 0 時間と 24 時間後に位相差顕微鏡で細胞画像を撮影し、ImageJ ソフトウェアを用いて無細胞領域の面積を解析した。0 時間時点における無細胞領域の面積に対する 24 時間時点での面積を算出した結果、PDGF-BB 添加群では無添加群と比較し、有意に小さい値となった。また、トランスウェル・チャンバーアッセイを行ったところ、移動した細胞は PDGF-BB 無添加群と比較し、添加群で有意に多かった。細胞の遊走には細胞骨格や接着斑の再編成が重要であると報告されている。これらに関連が強いタンパクである F-actin と paxillin に着目し、MBMSC を PDGF-BB で 24 時間刺激後に免疫蛍光染色を行った。PDGF-BB 添加群では無添加群と比較し、F-actin の形成が増加し、細胞先端部の paxillin の局在が増加した。これらの結果から、PDGF-BB は MBMSC の遊走を促進するといえる。

4. PDGF-BB 誘導性の MBMSC の遊走における Akt シグナルの役割

Akt シグナルの活性化は PDGF-BB による MSC の増殖と遊走に重要であると報告されている。PDGF-BB が MBMSC の Akt シグナルを活性化するか調べるため、MBMSC を PDGF-BB で 5, 10, 15, 20, 30 分間刺激し、Akt のリン酸化を評価した。PDGF-BB は 5 分後から直ちに Akt のリン酸化を促進し、その効果は 30 分後も維持された。さらに、Akt 阻害剤 LY294002(50 μ M)で 24 時間前処理すると、前処理しない場合と比較し、PDGF-BB 誘導性の Akt のリン酸化が有意に抑制された。次に、MBMSC の遊走における Akt の関与を調べるため、前述の創傷治癒アッセイとトランスウェル・チャンバーアッセイに LY294002 を前処理した群を追加して実験した。その結果、LY294002 にて前処理した群では PDGF-BB 誘導性の創傷治癒面積は小さく、遊走細胞数も少なかった。さらに、LY294002 前処理により PDGF-BB 誘導性のアクチン線維や paxillin の増加が抑制された。これらのことから、Akt は PDGF-BB 誘導性の MBMSC の遊走に関わっているといえる。

5. PDGF-BB 誘導性の MBMSC の遊走における Girdin シグナルの役割

Akt シグナルの活性化による細胞の遊走を促進するメカニズムにおいて、Girdin の活性化は重要であると報告されている。そこで、MBMSC を PDGF-BB で 5, 10, 15, 20, 30 分間刺激し、PDGF-BB が Girdin を活性化するかを調べた。その結果、MBMSC において 5 分から 20 分の PDGF-BB 処理は Girdin のリン酸化を有意に増加することが示された。また、PDGF-BB 誘導性の Girdin のリン酸化が Akt 阻害により抑制されるか調べたところ、Akt 阻害剤 LY294006(50 μ M)で 24 時間前処理することにより PDGF-BB 誘導性の Girdin のリン酸化は有意に抑制された。これらのことから、Girdin は PDGF-BB 誘導性の MBMSC の遊走に関わっているといえる。

【結論及び考察】

本研究により、PDGF-BB が、増殖や骨分化に影響を与えることなく、MBMSC の遊走を強く誘導することが示された。さらに、PDGF-BB による MBMSCs の遊走誘導は、Akt/Girdin シグナル経路を介する可能性が示唆された。これらの知見は、PDGF-BB による歯周組織再生の分子メカニズムの解明の一助となると考えられる。

