

氏名	大槻 祐喜
(ふりがな)	(おおつき ゆうき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成30年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	W9 peptide enhanced osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (ヒト脂肪由来幹細胞に対する W9 ペプチドの骨分化作用)
論文審査委員	(主) 教授 根 尾 昌 志 教授 植 野 高 章 教授 近 藤 洋 一

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目的》

骨欠損に対する治療として最も標準的な術式は自家骨移植である。しかしながら採骨部の手術侵襲が課題である。これに対して近年幹細胞や骨分化誘導因子を用いた骨再生治療が研究されている。骨再生のための幹細胞として骨髄由来幹細胞(BM-MSC)が挙げられるが、より犠牲の少ない脂肪由来幹細胞(AdSC)も骨分化能を持つことが報告されており、近年用いられている。一方で最も知られている骨分化誘導因子として既に BMP-2 が海外を中心に臨床で使用されているが、合併症も散見される。そのため、より安全で高い骨分化誘導能を持つ因子が求められている。近年 W9 という破骨細胞形成抑制環状ペプチドが骨髄由来幹細胞に対して BMP-2 と比較しても強い骨分化能を発揮するという報告があった。しかしながら W9 の間葉系幹細胞に対する作用効果のメカニズムはまだあまり知られてい

ない。そのため今回我々は脂肪由来幹細胞に対する W9 の効果およびその作用機序を検討した。

《方法》

ヒト脂肪由来幹細胞(hAdSC)は帝王切開時の癒痕切除時に廃棄する脂肪組織より採取した(倫理委員会承認 No.1040-01)。この脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、比重遠心法を用いて単核細胞を分離した。10%FBS 含有 DEME/F12 にて培養後、接着した細胞を hAdSC として培養し、第 3 から 6 継代の細胞を実験に使用した。

hAdSC をネガティブコントロール群(維持培地群 ; 10%FBS 含有 DEME/F12 培地群)、ポジティブコントロール群 (BMP-2 群 : 500 ng/ml BMP-2 含有培地群)、W9 含有培地群 (W9 群)に分けて骨分化を評価した。各々の群をアリザリンレッド染色による石灰化沈着の程度、アルカリフォスファターゼの活性の程度を定量化し評価した。さらにリアルタイム RT-PCR 法を用いて W9 の骨分化関連遺伝子の発現を評価するとともに、Western blot 法にて各種骨分化関連細胞内シグナルのリン酸化も評価した。骨分化関連タンパクの発現としてはオステオカルシンの免疫染色を用いて評価した。

《結果》

石灰化沈着および ALP の活性化では、ともに 100 μ M W9 含有培地群で、他群に対して統計学的に有意に強い骨分化を認めた。またオステオカルシンの免疫染色を行うと W9 群で他群に対してオステオカルシン陽性細胞がより多く見られた。定量的 RT-PCR 法による遺伝子の発現に関しては、TGF β 1 や骨分化関連遺伝子である COL1A1、RUNX2 が BMP-2 群、W9 群にて維持培地群に対して有意に発現していた。また TGF 受容体である TGFR1、TGFR2 も強く発現していた。また Western blot 法による細胞内シグナルの活性に関しては、BMP-2 群及び W9 群で共に p38、Erk1/2 のリン酸化が見られたが、さらに W9 では JNK、Akt のリン酸化も見られた。

《考察》

W9 は以前より receptor activation of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) とその受容体である RANK の結合を阻害し、破骨細胞の形成を抑制する物質として報告されていた。しかし W9 は RANKL に結合することにより、この RANKL を通して逆行性のシグナルを送り骨髄由来幹細胞内の p38、Smad1/5/8 をリン酸化させることが報告された。今回の我々の結果では、W9 による骨分化誘導により骨芽細胞分化への初期の重要な遺伝子とされる RUNX2 の強い発現を認め、ALP の活性化や強い石灰化沈着を認めた。さらに免疫染色でオステオカルシンの強い発現も認めている。オステオカルシンは骨芽細胞の分化において後期になって分泌されるタンパクであり、これらのことから W9 は hAdSC の骨分化に対して、初期と後期の両方に作用していると考えられた。また今回の研究で骨分化関連細胞内シグナルでは、p38 に加えて Akt、Erk1/2、JNK のリン酸化を認めた。PI3K/Akt pathway のリン酸化は cell survival に大きく寄与しているとの報告がなされている。JNK に関しては幹細胞の骨分化誘導過程での後期に作用しているとの報告もあり、W9 の骨分化誘導過程でも後期で貢献していることが示唆される。また TGF β 1 も今回の我々の結果で強く発現していたが、TGF signaling は骨分化へ促進的に働いている。しかし TGF β 1 は過剰に存在すると逆に骨分化誘導作用を阻害してしまうことが知られている。これに対して Akt のリン酸化はこの阻害作用を逆転させ、さらに骨分化誘導の方向へ幹細胞を分化させることが報告されている。AdSC は元々 TGF β 1 を産生し分泌しているため、このような TGF β 1 の豊富な環境に置かれ易いと考えられる。Akt のリン酸化はこの点でも hAdSC の骨分化誘導に対して有利に働いているのではないかと考えられる。結論として W9 は p38、Akt、JNK、Erk1/2 などの細胞内シグナルの活性化と骨分化関連遺伝子の発現により強い骨分化が促されていると考えられる。JNK、Akt のリン酸化は BMP-2 による hAdSC に対する骨分化誘導因子としては働いておらず、これが W9 の特徴と考えられた。特に Akt は cell survival や他の骨分化経路に対しても補足的に作用しており、W9 の hAdSC に対する骨分化誘導作用の中で重要な働きをしていることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

骨欠損に対する治療は現在自家骨移植が標準術式となっているが、ドナーの犠牲が課題となっている。その解決法として、幹細胞や骨分化誘導因子を用いた骨再生治療が研究されている。そこで申請者は新たに骨髄由来幹細胞等に対して直接的な骨分化誘導能が報告された W9 というペプチドが、より簡便に採取・培養できる脂肪由来幹細胞に対しても同様に強い骨分化誘導を示すかを検討した。

既存の方法にて分離・培養した脂肪由来幹細胞を継代し第 3 継代から 6 継代の細胞で実験を行った。骨分化誘導を行っていない脂肪由来幹細胞をネガティブコントロール群、既に骨分化誘導因子として確立されている BMP-2 にて骨分化誘導を行った群をポジティブコントロール群として W9 によるヒト脂肪由来幹細胞 (hAdSC) に対する骨分化誘導能を比較した。

結果は W9 によって骨分化誘導を行った hAdSC はネガティブコントロール群やポジティブコントロール群と比較して、強い石灰化沈着、ALP の活性化、オステオカルシンの発現を認めた。さらに BMP-2 群と同様に骨分化関連遺伝子である RUNX2、COL1A1 の発現も認めている。さらに骨分化関連細胞内シグナル活性として p38、Erk、JNK、Akt の活性化を認め、JNK、Akt に関しては BMP-2 群には発現しておらず、W9 のみで活性化されていた。また TGF β 1 遺伝子の発現、さらにその受容体で TGFR の強い発現を認める一方 BMPR の発現は認めなかった。

これらの結果より、W9 は hAdSC に対して、強い骨分化誘導能を発揮することが示された。またその経路として TGF signaling の活性化が関与していると考えられ、さらに cell survival に関与している Akt の活性化は BMP-2 群には見られず、W9 の特徴と考えられる。さらにこの Akt は TGF signaling にも補足的に働き、今回の研究結果で BMP-2 よりさらに強い骨分化誘導を引き起こした一因であると考えられた。

より低侵襲に採取でき、培養が容易な hAdSC に対しても W9 は強い骨分化誘導を引き起こすことが示されており、今後の骨再生治療の発展に本研究は寄与すると期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Biochemical and Biophysical Research Communications
495 (1): 904-910, 2018