

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名	矢 部 正 浩
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 536 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Synergistic effect of FGF-2 and TGF- β 1 on the mineralization of human umbilical cord perivascular cells (ヒト臍帯血管周囲細胞の石灰化に対する FGF-2 と TGF- β 1 の相乗効果) Archives of Oral Biology 156 巻, 105826 号, 1 頁～10 頁掲載 2023 年 12 月発行
論 文 審 査 委 員	主査 教授 奥 村 敏 副査 教授 二 藤 彰 副査 教授 五 味 一 博

内 容 の 要 旨

【目 的】

間葉系幹細胞 (MSC) は多系統分化が可能であり、腫瘍形成のリスクが低い再生医療の有望な細胞源として注目されている。ヒト臍帯血管周囲細胞 (HUCPVC) は臍帯や胎盤羊膜のウォートンゼリーなどに由来する未分化な MSC である。HUCPVC は、間葉系幹細胞の集団を構成し、間葉系幹細胞のさまざまな研究の細胞源として広く利用されており、将来的には骨髄系間葉系幹細胞に取って代わると期待されている。しかし、HUCPVC を骨芽細胞などの硬組織形成細胞に分化させる方法は現在まで明らかにされていない。線維芽細胞増殖因子 2 (FGF-2) は、血管新生と多くの細胞の増殖を促進するサイトカインであり、線維芽細胞や血管内皮細胞および骨芽細胞や骨細胞などの硬組織形成細胞の増殖を誘導することが示されている。トランスフォーミング成長因子ベータ 1 (TGF- β 1) は、単球細胞および上皮細胞、間葉系細胞、および神経細胞において増殖、分化、走化性、およびアポトーシスを誘導するサイトカインであることが知られている。TGF- β 1 を用いた以前の *in vitro* 研究では、HUCPVC は筋線維芽細胞様細胞に分化し、活性型ビタミン D3 (VD)、骨形成タンパク質 (BMP) 阻害剤である LDN-193189 (LDN) および TGF- β 1 の存在下で培養すると硬組織を形成する能力を欠くことが示されている。そこで、HUCPVC を FGF-2 と TGF- β 1 の併用下で培養することで、その相乗効果により硬組織形成細胞へと分化させることが可能かについて調べるために生化学的、細胞的、形態学的、遺伝学的、結晶工学的レベルで検討を行った。

【材料と方法】

HUCPVC に VD, LDN, および TGF- β 1 を用いて様々な組み合わせで培養し、培養 7 日目に ALP 活性測定を行い、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性が高くなる至適条件を決定した。この TGF- β 1 を含む培養条件下で FGF-2 を使用する FGF (+) HUCPVC または FGF-2 を使用しない FGF (-) HUCPVC を培養し、ALP 染色、定量 PCR (qPCR) による ALP 遺伝子発現の測定、および MTS Assay による増殖能の測定、各種細胞分化マーカーに対する qPCR 測定を行い FGF (+) HUCPVC, FGF (-) HUCPVC の特性を調べた。FGF (+) HUCPVC の石灰化誘導能については、石灰化培地中で形成された石灰化物を Alizarin red S 染色および X 線回析、TEM 観察を行い石灰化小結節の結晶相を同定した。

【結 果】

VD, LDN, TGF- β 1 添加条件下において、FGF (+) HUCPVC 群または FGF (-) HUCPVC 群を培養すると FGF (+) HUCPVC 群は、培養 7 日目に FGF (-) HUCPVC よりも高い ALP 遺伝子発現および ALP 活性を示し、細胞増殖速度も高かった。骨芽細胞マーカー遺伝子の発現レベルは FGF (+) HUCPVC で増加したが、弾性線維および筋細胞マーカーの

発現レベルは、FGF (-) HUCPVC で増加した。基質小胞系マーカー遺伝子の発現は、FGF (+) HUCPVC で増加した。FGF (-) HUCPVC では筋線維芽細胞様の特性を示し、石灰化を誘導できなかった。一方、FGF (+) HUCPVC は14日間の石灰化誘導後、石灰化結節を生成する能力を示した。形成された石灰化小結節は、主相としてのヒドロキシアパタイト (HAP) と少量のリン酸八カルシウム (OCP) から構成されていた。石灰化した結節は、骨様 HAP、線維状 HAP ナノロッドで構成される多結晶シートなどの形態学的特徴を示した。

【考 察】

この研究の最大の目的は、HUCPVC を硬組織形成する細胞に分化させ、それによって石灰化を誘導できるようにすることである。HUCPVC は TGF- β 1 を添加した培養では筋線維芽細胞様細胞へと分化したが、TGF- β 1 に FGF-2 を添加することで FGF (+) HUCPVC は ALP 活性の有意な増加が観察された。さらに、qPCR および ALP 染色により、FGF (+) HUCPVC は FGF (-) HUCPVC と比較してより高い ALP 遺伝子発現および酵素活性を示すことが示された。これらの所見は、FGF-2 と TGF- β 1 が相乗効果により、HUCPVC を硬組織形成細胞に分化誘導することを示唆していると考えられた。FGF (+) HUCPVC では骨芽細胞マーカー遺伝子である OC、OPN、CD73 の遺伝子発現レベルが高かった。これまでに、成熟した骨芽細胞では OC と OPN が骨芽細胞の分化過程で発現すること、細胞外アデノシン産生に寄与する CD73 は、骨芽細胞の分化を促進・調節することにより骨組織の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが知られている。これらの結果から、FGF (+) HUCPVC は骨芽細胞様の特徴を有することが示唆された。

また、FGF (-) HUCPVC よりも FGF (+) HUCPVC において基質小胞系マーカー遺伝子である NPP1 および PiT1 の遺伝子発現レベルが有意に高かった。骨や象牙質などの硬組織では、基質小胞内で NPP1 によって生成された無機ピロリン酸が、組織非特異的な ALP によって無機リン酸に変換される。その後、リン酸は PiT1 によって小胞に輸送されることにより石灰化に関与することが示されており、FGF (+) HUCPVC が潜在的に石灰化を誘導する能力を有していることを示唆している。

これらの結果から *in vitro* での石灰化誘導実験を行ったところ FGF (+) HUCPVC は石灰化結節の形成を示したが、FGF (-) HUCPVC では示さなかった。形成された石灰化結節は、主にカルシウムとリン酸の成分で構成されており、FGF-2 が HUCPVC の石灰化に作用する効果的な誘導剤であることを示唆している。次に、形成された石灰化結節中にどのような結晶相が存在するかを調べた。ミクロおよびナノサイズでの特性評価により、石灰化結節には主相としての HAP と少量の OCP が含まれていることが明らかになった。このことから小結節の主相は骨様 HAP であることが示された。HAP 結晶に見られる OCP 構造は、小結節析出時に OCP から HAP への相転移することを示唆している。石灰化小結節の最初の結晶は OCP で構成され、その後 HAP に変化すると考えられ、FGF-2 がリン酸カルシウムの核形成と産生を促進したことを示唆している。

【結 論】

HUCPVC は医療廃棄物とみなされている臍帯から採取されるため、患者への新たな侵襲を引き起こすことなく十分な数の細胞を確実に提供できるという利点がある。今回、FGF-2 と TGF- β 1 の相乗効果により、HUCPVC を骨芽細胞様細胞に分化誘導し、石灰化結節を形成し HAP へと結晶化させることを認めた。これは、FGF-2 と TGF- β 1 との相乗作用が HUCPVC を硬組織形成細胞へと分化させる上で重要な物質であると考えられる。さらに本研究を進めることで HUCPVC が将来の骨再生療法や歯科治療のための新しい幹細胞源となる可能性を引き出す可能性があることを示している。しかし、新しい骨再生療法における HUCPVC の潜在的な寄与を明らかにするには、動物研究を含むさらなる研究が必要と考えられる。

審査の結果の要旨

矢部正浩氏は、1) 線維芽細胞増殖因子 2 (FGF-2) は、硬組織形成細胞の増殖を誘導すること、2) トランスフォーミング成長因子 β 1 (TGF- β 1) は、ヒト臍帯血管周囲細胞 (HUCPVC) を筋線維芽細胞に分化するこれまでの研究成果を踏まえ、HUCPVC を FGF-2 と TGF- β 1 の併用下で培養すると、相乗効果により硬組織形成細胞に分化するという仮説をたてた。

1) 活性型ビタミン D3 (VD)、TGF- β 1、骨形成タンパク質シグナル伝達阻害剤である LDN-193189 を添加した培地 (α MEM) で 7 日培養すると (FGF (-)-HUCPVC)、ALP の活性と mRNA の発現量はコントロール群に比較して有意に増加したが、同培地に FGF-2 を添加すると (FGF (+)-HUCPVC)、ALP の活性と mRNA 発現量ならびに増殖速度も FGF (-)-HUCPVC に比較して有意に増加した。

2) q-PCR より FGF (+)-HUCPVC では骨芽細胞マーカーである RUNX2、osteocalcin、osteopontin、CD73 の mRNA

博 士 学 位 論 文

発現量は、コントロール群に比較して有意に増加した。

3) q-PCR より FGF (+)-HUCPVC では基質小胞系マーカー、とりわけリン酸トランスポーターで石灰化を促進する Pit1 の mRNA の発現量がコントロール群ならびに FGF (-)-HUCPVC に比較して顕著に増加した。

4) アリザリンレッド染色より FGF (+)-HUCPVC では石灰化結節の生成が見られ、X 線解析の結果、石灰化小結節の主成分はヒドロキシアパタイトと少量のリン酸 8 カルシウムであることが明らかになった。

本研究成果は、HUCPVC が骨再生療法の新しい幹細胞源となる可能性を示唆している。よって、本論文は博士（歯学）の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。