

学位論文題名

Vascular cell-like potential of undifferentiated fibroblast-like cells derived from ligament to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel-like structure with a lumen in a PI3K-activation-dependent manner

(靱帯由来未分化線維芽細胞様細胞による PI3K 依存性な
血管内皮細胞マーカー陽性血管様構造物構築能力について)

学位論文内容の要旨

【背景】 歯周靱帯（以下 PDL）組織中には線維芽細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞の他に、上皮細胞や血管を構成する細胞(血管内皮細胞、血管平滑筋細胞)や神経細胞など様々な種類の細胞が混在している。PDL 中には歯小嚢由来のいわゆる未分化間葉系幹細胞様細胞が存在し骨芽細胞に分化して硬組織を形成するという報告はあるが、この細胞が血管内皮細胞や血管平滑筋細胞へ分化し血管構造を構築するか否かは明らかではない。そこで、これまでに本研究グループでは、ミニ豚 PDL 由来細胞株を樹立し、この細胞株が、これまでに報告されている骨芽細胞マーカーの発現に加え、血管内皮細胞分化マーカーを発現することを実証した。しかし、これらの細胞株が血管内皮細胞マーカー陽性の血管構造を構築するかどうかは明らかではなかった。

【目的】 以前に報告したミニ豚由来 PDL 細胞株を用いた研究成果では、不死化遺伝子 (*hTERT*) 発現により、本来の PDL 細胞の分化能力とは異なる性質を示す可能性が否定できなかった。そこで本研究では、不死化遺伝子を導入しないラット歯周靱帯由来初代培養系の確立を目指し、次いで、その初代培養細胞集団を個々の細胞に分けて培養することにより、単一の細胞より派生した Single Cell Derived Culture (以下 SCDC) を確立した。各 SCDC 間の PDL 細胞マーカー、骨芽細胞マーカー、血管構築細胞マーカーの発現の様子を比較し検討することにより、PDL 由来線維芽細胞の性格を保ちながら、骨芽細胞としての性格は示さず血管構築細胞としての性格をより強く示す SCDC の選別を試みた。そして、この血管構築細胞としての性格の強い SCDC は、他の骨芽細胞の性格の強い SCDC に比べて、3 次元培養下での血管様構造形成能力が高いかどうかを調査し、各分化マーカーの発現様式と血管構築能力との関連性について調査した。また、特に、その血管様構築物が、実際の血管構造と同様に血管細胞マーカー陽性で且つ連続した内腔を形成しているかどうかについて、組織形態学および免疫組織学的な手法により調査した。さらには、血管内皮細胞による血管新生の際に重要とされる MEK/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) や phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt を介した細胞内情報伝

達系が、PDL 由来線維芽細胞様細胞による血管形成にどのように関わるかを明らかにした。

【材料および方法】Rat 由来 PDL 細胞の初代培養系の確立は、4 週齢のウィスター系ラットの上下顎臼歯より PDL 組織を歯肉組織や歯髄組織が混入しないように採取した後、out growth 法により行った。さらに、その細胞からの SCDC の獲得は、限界希釈法により行った。そして、各 SCDC における靱帯細胞、骨芽細胞および血管構成細胞マーカーの発現を RT-PCR を用いて評価した。SCDC 細胞の血管様構造構築能力は、一定数に調整した細胞を浮遊培養し Spheroid 体を形成させた後、タイプ I コラーゲンスキャホールドに包埋する in vitro 三次元培養系にて評価した。SCDC による構造物の形態学的組織調査は、そのパラフィン包埋薄切切片による評価に加え、セロイジン厚切切片を用いて行った。また、SCDC の血管形成能力とこの細胞内の MEK/ERK や PI3K/Akt との関わりについては、それぞれの選択的阻害薬を用いて評価した。

【結果】線維芽細胞増殖因子 (FGF) 刺激下でラット PDL 由来線維芽細胞様細胞初代培養系を樹立した。さらに、この細胞を起源とし、不死化遺伝子の導入に頼ることなく 4 種類の SCDC を獲得した。その後、獲得した 4 種の SCDC すべてに複数の PDL マーカーの発現を確認し、これらの細胞が PDL 由来であることを確認した。次いで、RT-PCR 法により、各 SCDC が骨芽細胞マーカーに加えて血管内皮細胞および平滑筋細胞マーカーを発現していることを確認した。特に、SCDC2 においては、血管内皮細胞による血管新生の際にその発現が重要とされる Tie-2 および FLK-1 の著名な発現を認め、この細胞が血管構成能力を発現する可能性が強く示唆された。一方、SCDC1 においては、Tie-2 や FLK-1 の発現は認められなかったが、骨芽細胞の最終分化に必要な転写因子である Osterix の発現が顕著に認められ、SCDC1 が骨芽細胞に近い性格をもつ可能性が示唆された。次いで、これらの 2 種の SCDC による血管構造形成能力を比較したところ、まずは浮遊培養において SCDC2 が完全な spheroid 体を形成したのに対し、SCDC1 では不完全な spheroid 体しか形成できなかったことに加え、これらの spheroid 体からの培養ゲル中での血管構造物構築能力を調査したところ、SCDC2 では顕著な血管構造物構築能力が認められるのに対し、SCDC1 ではそれが認められないことが判明した。さらに、SCDC2 による血管様構造物のパラフィン包埋切片やセロイジン切片を用いた形態学的調査により、この構造物内での連続した管腔構造の存在が確認された。加えて、免疫組織学的調査により、この構造物が血管内皮細胞マーカーである vWF や CD31 を発現することを確認した。また、この SCDC2 による血管構築能力は、MEK/ERK 阻害剤 U0126 を添加した群では変化は認められなかったが、PI3K/AKT 阻害剤 LY294002 を添加した群においては完全に抑制された。

【考察】不死化遺伝子 *hTERT* を導入することなく、ラット PDL 由来線維芽細胞様細胞初代培養系ならびにこれを起源とした SCDC 4 種を確立できたが、この培養系の樹立ならびに維持は FGF-1 10ng/ml および heparin 15μg/ml 添加培地にて行った。FGF は未分化間葉系細胞の自己複製能力と多分化能力の維持に働くと報告されており、この特殊な培養法が SCDC の多分化能力の維持にも働いている可能性が考えられる。PDL 由来初代培養細胞全体から約 1% の割合（通常の培地では 0.001% 以下）で 1 個の細胞から増殖しうる SCDC を獲得できたことは、FGF 刺激により幹細胞様自己複製能力が亢進したためであると予想される。今回のデータには示していないが、各 SCDC が複数の間葉系幹細胞マーカーを発現することを確認しており、この培養法が PDL 由来細胞の幹細胞様能力の維持に適した培養法であることが示唆された。また、特に、

SCDC2 をさらなる限界希釈法により 1 個の細胞から増殖させた細胞集団においても SCDC2 同様の血管構造形成能力と各間葉系幹細胞マーカーの発現が維持されていることから、この培養法が歯周靱帯由来細胞の幹細胞様能力の維持に適していることが再確認されている。

靱帯細胞マーカーの発現に加え、血管内皮細胞マーカーの発現が顕著な SCDC2 は、血管内皮細胞マーカーの発現が乏しい SCDC1 と比較して、顕著な血管様構造構築能力を示した。加えて、この SCDC1 は SCDC2 に比べて骨芽細胞マーカーを高発現していたが、SCDC における骨芽細胞マーカーの発現に伴いその血管構築能力が減弱されるか否かを判断するには、今後の新たな研究が必要である。また、SCDC2 による血管形成能力は MEK/ERK 阻害剤では変化が認められなかったが、PI3K/Akt 阻害剤により顕著に抑制された。一方、一般的な血管内皮細胞では、PI3K/Akt に限らず MAPK/ERK を介したシグナルがその血管形成能力発現に重要と考えられている。今回我々が用いた PDL 由来 SCDC2 細胞は、多種類の分化マーカーを発現する未分化な細胞であるため、一般的な血管内皮細胞を用いた研究結果と異なるもの思われた。

【結論】歯周靱帯由来線維芽細胞様細胞が、PI3K 依存的に血管内皮細胞マーカー陽性の血管様構造を構築することを明らかにした。この研究成果により、この細胞が有する多分化能力の新たな一面が明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

Vascular cell-like potential of undifferentiated fibroblast-like cells derived from ligament to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel-like structure with a lumen in a PI3K-activation-dependent manner

(靱帯由来未分化線維芽細胞様細胞による PI3K 依存性な
血管内皮細胞マーカー陽性血管様構造物構築能力について)

審査は、全審査委員出席のもと、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

歯周靱帯（以下 PDL）組織中には線維芽細胞，セメント芽細胞，骨芽細胞の他に，上皮細胞や血管を構成する細胞や神経細胞など様々な種類の細胞が混在している。PDL 中には歯小嚢由来の未分化間葉系幹細胞様細胞が存在し骨芽細胞に分化して硬組織を形成するという報告はあるが，この細胞が血管を構成する細胞へ分化し血管構造を構築するか否かは明らかではない。そこで，これまでに本研究グループでは，ミニ豚 PDL 由来細胞株を樹立し，この細胞株が骨芽細胞マーカーの発現に加え，血管内皮細胞分化マーカーを発現することを実証した。しかし，これらの細胞株が血管内皮細胞マーカー陽性の血管構造を構築するかどうかは明らかではなかった。さらに，ミニ豚由来 PDL 細胞株を用いた研究成果では，不死化遺伝子 (*hTERT*) 発現により，本来の PDL 細胞の分化能力とは異なる性質を示す可能性が否定できなかった。そこで本研究では，不死化遺伝子を導入しないラット歯周靱帯由来初代培養系の確立を目指し，次いでその初代培養細胞集団を個々の細胞に分けて培養することにより，単一の細胞より派生した Single Cell Derived Culture (以下 SCDC) を確立した。各 SCDC 間の PDL 細胞マーカー，骨芽細胞マーカー，血管構築細胞マーカーの発現の様子を比較し検討することにより，PDL 由来線維芽細胞の性格を保ちながら，骨芽細胞としての性格は示さず血管構築細胞としての性格をより強く示す SCDC の選別を試みた。それにより，最も血管内皮細胞に近い性格を有する SCDC2 と骨芽

細胞に近い性格を有していた SCDC1 を用いて、一定数に調整した細胞を浮遊培養し Spheroid 体を形成させた後、タイプ I コラーゲンスキャホールドに包埋する in vitro 三次元培養系にて評価を行った。その結果、SCDC2 では顕著な血管構造物構築能力が認められるのに対し、SCDC1 ではそれが認められないことが判明した。さらに、SCDC2 による血管様構造物のパラフィン包埋切片やセロイジン切片を用いた形態学的調査を行ったところ、この構造物内での連続した管腔構造の存在が確認された。加えて、免疫組織学的調査により、その構造物が血管内皮細胞マーカーである Tie-2 を発現することを確認した。最後に、血管内皮細胞による血管新生の際に重要とされる MEK/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) や phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt を介した細胞内情報伝達系が、PDL 由来線維芽細胞様細胞による血管形成にどのように関わるかを調査した。その結果、この SCDC2 による血管構築能力は、PI3K/AKT 阻害剤 LY294002 を添加した群においては完全に抑制されたのに対して、非常に興味深いことに MEK/ERK 阻害剤 U0126 を添加した群においては、逆に血管新生を促進する方向に作用した。平面培養系における遺伝子発現の変化の調査においても、LY294002 添加群においては Tie-2, KDR の発現が低下したのに対し、U0126 添加群においては、Tie-2, KDR の遺伝子発現が亢進しており、三次元培養における結果を裏付ける形となった。今回の実験により、歯周靱帯由来線維芽細胞様細胞が PI3K 依存的に血管内皮細胞マーカー陽性の血管様構造物を構築することが明らかとなった。この研究成果により、この細胞が有する多分化能力の新たな一面が明らかとなった。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容について口頭により質疑が行われた。主な質疑項目は、1) 獲得した SCDC が PDL 由来であることを裏付ける決定的な根拠があるのか、2) SM α -actin は癌関連遺伝子といわれるが Primary に比べ SCDC 群でその発現が亢進している理由をどう考えるか、3) 間葉系幹細胞マーカーである CD44 や CD146 の Primary における発現はどうであったか、4) SCDC2 の免疫染色に関して、細胞膜受容体である Tie-2 遺伝子の発現が細胞質においても認められているがそれをどう考えるか、5) 阻害薬添加系において、結果がヒト臍帯血管細胞 (HUVEC) の系と異なるが、その点をどう解釈しているか、等であった。また、血管新生に関連する遺伝子、さらには実験方法の詳細についてなど多岐にわたる関連事項の質問を行った。学位申請者からは、いずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られ、研究の立案と進行、結果の解析について十分な能力を有していると考えられた。更に、今後の研究の方向性についても明確な将来の展望が示された。

本論文は、歯根膜由来細胞が血管構成細胞へと分化しうる可能性を形態学的、免疫組織学的な詳細を交えて明らかにしたものであり、歯根膜由来組織の多分化能力のさらなる可能性を明らかにした点が評価され、この業績は、今後の歯科医学・研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。また、試問の結果より学位申請者は十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいと認められた。