

主論文の要旨

Chondroitin-4-sulfate transferase-1 depletion inhibits formation of a proteoglycan-rich layer and alters immunotolerance of bone marrow mesenchymal stem cells on titanium oxide surfaces

コンドロイチン 4 硫酸転移酵素-1 の発現低下は骨髄由来間葉系幹細胞
の酸化チタン表面におけるプロテオグリカン層の形成を阻害し、
免疫寛容能を変化させる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

神尾 尚伸

【緒言】

チタン製インプラントは優れた生体親和性、力学特性、耐食性を有するため歯科治療などに広く利用されている。オッセオインテグレーションはチタンと骨組織が直接結合した状態であり、インプラント治療が成功するためには必須の現象である。しかし、チタン上における骨形成過程や生体親和性の詳細な分子メカニズムは解明されていない。

電子顕微鏡でチタンと骨組織の界面にルテニウムレッド陽性を示すプロテオグリカン層が観察される。プロテオグリカンはタンパク質とグリコサミノグリカンの複合体であり、グリコサミノグリカン鎖の末端に存在するグリコサミノグリカンの中で Chondroitin-4-sulfate (C4S) のみがチタンに直接結合することが報告されている。C4S は糖転移酵素である Chondroitin 4-O-sulfotransferase (C4ST) ファミリー (C4ST-1, -2, -3) によりタンパク質に付加されるが、その中で C4ST-1 は骨格の成長、シグナル伝達および、癌を含むヒトの疾患においても役割を果たすことが示唆されている。

本研究では、C4ST-1 がチタン上におけるヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) のプロテオグリカン層の形成や骨形成能、免疫寛容能に与える影響を解析することを目的とした。

【材料・方法】

ヒト BMSCs 株 UE7T-13 にリポフェクション法で C4ST-1 の shRNA を導入しピューロマイシンによる薬剤選択後、限界希釈法によって shRNA 安定発現株のシングルクロンを作製した (sh-BMSCs 群)。同様にして sh none target を導入した細胞を作製し (N-BMSCs 群)、リアルタイム PCR 法およびウェスタンブロッティングによって C4ST-1 の発現を解析した。それぞれの細胞の特性を分化誘導 (骨、脂肪、軟骨) およびフローサイトメトリーで解析後、これらの細胞をチタン板上に播種し、透過型電子顕微鏡でチタンと細胞の界面を観察した。また、骨形成能をリアルタイム PCR 法およびアリザリンレッド染色で、細胞増殖能を WST-8 キットで、初期接着能を免疫組織化学染色で、免疫寛容能をリアルタイム PCR 法で解析した。それぞれの実験に際してチタン板をフッ化水素酸および硝酸を用いて酸洗し、その表面形態および元素組成を走査型電子顕微鏡 (SEM-EDX) により解析した。

【結果】

チタン板表面の形態および元素解析

酸洗後のチタンは機械研磨により生じる凹凸や有機物の付着はなく、またアルミニウムやバナジウムが混合されていない純チタンであった。

N-BMSCs および sh-BMSCs の特性

N-BMSCs および sh-BMSCs は骨、脂肪、軟骨分化能を有した。またフローサイトメトリーによる解析ではいずれの細胞群も幹細胞マーカー (陽性: CD73、CD90、CD105、陰性: CD14、CD19、CD34、CD45、HLA-DR) が維持されていた。

N-BMSCs および sh-BMSCs の C4ST ファミリーの遺伝子発現

チタン上で7および14日間培養した sh-BMSCs は、N-BMSCs と比較して C4ST-1 の発現が有意に低下しており、C4ST-2, -3 の発現に有意差はなかった (Fig. 1)。

細胞とチタン界面のプロテオグリカン層の観察

培養 14 日間でチタンと細胞の界面にルテニウムレッド陽性像が観察された。チタン上で培養した sh-BMSCs は N-BMSCs と比較してプロテオグリカン層の面積が有意に減少し、相対輝度 (プロテオグリカン層/細胞質) が有意に低下した (Fig. 2)。

初期接着能および細胞増殖能の測定

チタン上で1および3時間培養した N-BMSCs と sh-BMSCs における vinculin の発現に差はなかった。また、面積、近似楕円長軸、最大径に有意差はなかった。24、48、72 時間培養した N-BMSCs と sh-BMSCs の細胞増殖能に有意差はなかった (Fig. 3)。

骨形成能および石灰化能の解析

チタン上で7および14日間培養した N-BMSCs と sh-BMSCs の骨関連遺伝子発現に有意差があったが、その差は 10-30%であった。また、アリザリンレッド染色では有意差はなかった (Fig. 4)。

免疫寛容能

チタン上で14日間培養した sh-BMSCs は、N-BMSCs と比較して IL-6 および IDO の発現が有意に高かった。また、sh-BMSCs 由来培養上清は、N-BMSCs 由来培養上清と比較してヒトマクロファージにおける IL-6、CD80、IDO の遺伝子発現を有意に亢進させた (Fig. 5, 6)。

【考察】

本研究ではチタン上の BMSCs に対して C4ST-1 がプロテオグリカン層の形成、骨形成能および免疫寛容能に与える影響を解析した。透過型電子顕微鏡の結果からチタンと細胞界面には N-BMSCs、sh-BMSCs とともに 20-500 nm 程度のプロテオグリカン層が観察され、その厚さは過去の報告と同等であり、チタン上の BMSCs における C4ST-1 はプロテオグリカン層の形成量に関与するが、厚さには影響を与えないことが示唆された。また、細胞増殖能、細胞接着能、骨形成能、石灰化能の解析結果から、酸化チタン上の BMSCs における C4ST-1 は細胞増殖、接着、骨分化能に影響を与えないことが示唆された。C4S は BMSCs の骨分化を促進しないと報告されていることから、プロテオグリカン層は酸化チタン上の BMSCs の細胞増殖能や骨形成能には影響を与えないことが示唆された。本研究では C4ST-1 の発現低下により BMSCs の免疫寛容能に影響を与え、マクロファージの極性は M1 になった。これらのことからプロテオグリカン層は酸化チタン上の BMSCs の免疫寛容能において M2 様マクロファージを誘導する因子の分泌に影響を与える可能性が示唆された。

酸化チタンの表面改変が BMSCs の分化能に影響を与えることが報告されている。今後、異なる表面性状および形状の酸化チタン上で BMSCs における C4ST-1 の影響を解析し、臨床研究の結果と関連付けて解析する必要があると考えられた。

【結論】

本研究により、BMSCs における C4ST-1 は酸化チタン上のプロテオグリカン層の形成に影響を与えるが、細胞増殖能や骨分化能には影響しないことが示唆された。また、プロテオグリカン層は BMSCs の免疫寛容能を直接的および間接的に変化させる可能性が示唆された。