

論 文 要 旨

Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in BMP9-stimulated osteogenic differentiation and SDF-1 production in human periodontal ligament fibroblasts**Bone morphogenetic protein 9 刺激による
ヒト歯根膜線維芽細胞の骨分化および SDF-1 産生に
おける PI3K/Akt 経路の関与**

古江 きらら

【序論及び目的】

歯周組織再生療法は、歯周炎によって破壊された歯周組織の再生を目的として行われる。歯周組織の再生において歯根膜中の細胞は重要な役割を果たしていることが知られており、次世代の歯周組織再生療法の一つとして bone morphogenetic proteins (BMPs)を含めた種々の成長因子の応用が試みられている。BMPs は元来、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を誘導する成長因子として同定され、アミノ酸配列の相同性より、今日まで 20 種類以上の関連分子が報告されている (Bragdon B et al. 2011)。BMP9 は、最初、胎生期マウスの肝細胞において同定された (Song JJ et al. 1995)。BMP9 は、他の BMP と比較して間葉系幹細胞 (MSC)、骨形成前駆細胞および骨芽細胞の骨形成分化を高度に誘導することができることが示されている (Cheng H et al. 2003)。近年、歯根膜由来幹細胞にアデノウイルスベクターを用いた BMP9 強発現や、組換えヒト BMP9 (rhBMP9)刺激により、骨分化作用が促進されることが報告されている (Ye G et al. 2014, Fuchigami S et al. 2016)。したがって、BMP9 は、骨を含む歯周組織を再生するための成長因子である可能性がある。

細胞から分泌された BMPs は BMP レセプターに結合し、Smad や Mitogen-activated protein kinases (MAPK) を活性化することが知られている (Rahman MS et al. 2015)。最近の研究より、生体内で細胞の生死、成長、増殖において中心的な役割を果たすとされる phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt 経路が BMP2 によって誘導される骨分化において必要であることが報告されたが (Mcgonnell IM et al. 2012)、BMP9 の下流における同経路の関与については不明である。

CXCL12 としても知られている Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)は組織修復/再生中の傷害部位への MSC などの幹/前駆細胞の集積において重要な役割を果たすと考えられている。歯根膜線維芽細胞 (periodontal ligament fibroblasts ; PDLFs)は SDF-1 を分泌することが知られており、SDF-1 は歯根膜の代謝速度の維持における MSC の増殖を誘導すると考えられている (Asakawa T et al. 2012, Yashiro Y et al. 2014)。しかし、BMP9 が PDLFs における SDF-1 分泌を調節するか否かは検討されていない。従って、本研究の目的は、BMP9 刺激によるヒト PDLFs の骨分化および SDF-1 発現における PI3K/Akt 経路の関与について解明することである。

【材料及び方法】

BMP9 刺激による歯根膜細胞の骨分化および SDF-1 発現における PI3K/Akt 経路の関与の解明を目的に以下の実験を遂行した。細胞は、Lonza 社より購入した、正常ヒト PDLFs を使用した。

1) rhBMP9 刺激による Akt のリン酸化の解析

ヒト PDLFs を rhBMP9 にて刺激する前(baseline)と後 (30、60、120 分後) のサンプルを回収し、SDS-PAGE/western blot により Akt のリン酸化の解析を行った。

2) rhBMP9 刺激による骨分化への PI3K 阻害剤 (LY294002; LY) の影響

骨分化への LY の影響を見るため、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定、骨関連遺伝子発現の解析を行った。骨関連遺伝子については刺激後 2 日に runx2、osterix、id1 を、6 日後に bone sialoprotein、osteopontin の mRNA レベルの解析を行った。

3) rhBMP9 刺激による SDF-1 発現の解析および LY の SDF-1 発現への影響

SDF-1 は alternative splicing によりヒトでは α 、 β 、 γ を含むスプライスバリエーションが知られている。本研究では α 、 β 、 γ に特異的なプライマーを用いて qPCR によりそれぞれの mRNA 発現量を調べた。さらに、ELISA 法にて培養液中の SDF-1 のタンパク量のレベルを解析し、LY の影響についても検討を行った。

【結 果】

1) rhBMP9 刺激による Akt のリン酸化の解析

rhBMP9 刺激後 30 分および 60 分において Akt のリン酸化の促進が認められた。

2) rhBMP9 刺激による骨分化への LY の影響

rhBMP9 刺激により上昇した ALP 活性は LY 添加により有意に抑制された。

rhBMP9 刺激により上昇した runx2、osterix、id1、bone sialoprotein、osteopontin の mRNA の発現レベルは、LY 添加により有意に抑制された。

3) rhBMP9 刺激による SDF-1 発現の解析および LY の影響

rhBMP9 刺激により sdf1 α の mRNA の発現レベルの有意な上昇が認められた。sdf1 β 、sdf1 γ の mRNA の発現レベルについては有意な変動は認められなかった。

rhBMP9 刺激により SDF-1 のタンパク量レベルは有意に上昇を認め、LY 添加により有意に抑制された。

【結論及び考察】

本研究において、BMP9 刺激により Akt のリン酸化の促進が認められた。また、BMP9 刺激による ALP 活性の上昇、骨関連遺伝子発現レベルの上昇は PI3K 阻害剤である LY の添加により抑制された。Akt は PI3K 依存的に活性化されるキナーゼであり、PI3K/Akt 経路は様々な細胞機能を制御している。以上より、BMP9 刺激はヒト PDLFs の骨分化を促進し、その過程において PI3K/Akt 経路が関与することが示された。これは MSC における BMP9 刺激による骨分化の過程において PI3K が必要であるという報告 (Chen H et al. 2010) と一致する。

また、BMP9 刺激により SDF-1 産生の促進が認められ、LY の添加により抑制された。ヒト PDLFs の BMP9 刺激による SDF-1 産生への PI3K の関与は本研究が初めての報告となる。骨修復/再生の際に損傷部位への間葉系幹細胞の集積には、損傷部位で産生される SDF-1 が重要な役割を果たすことが報告されている (Yellowley C et al. 2013)。以上より、BMP9 は歯周組織の骨分化を促すだけでなく、SDF-1 産生を介しても歯周組織の再生を促す可能性が示唆された。

以上より、BMP9 は歯根膜細胞の骨分化、SDF-1 産生を促進し、その作用には PI3K/Akt 経路が関与することが示された。今後、BMP9 が骨増生や歯周組織の創傷治癒、再生を促す有望な成長因子の候補の一つとなる可能性がある。