

## 論 文 要 旨

**Recombinant human bone morphogenetic protein-9  
potently induces osteogenic differentiation of human  
periodontal ligament fibroblasts**

〔 Bone morphogenetic protein-9 によるヒト歯根膜由来線維芽細胞の  
骨芽細胞様分化 〕

湧上 佐和子

**【序論及び目的】**

Bone morphogenetic protein(BMP)は transforming growth factor(TGF)- $\beta$  スーパーファミリーに属し、骨格形成、幹細胞の分化など様々な機能を有する成長因子群である。BMP は、BMP-2/4、BMP-5/6/7/8、growth/differentiation factor (GDF)-5/6/7、 BMP-9/10 の4つのサブファミリーに分類され、中でも、胎生期マウスの肝細胞から発見された BMP-9 (GDF-2) は、間葉系幹細胞の骨形成細胞への分化促進作用を有し、BMP-2 や BMP-7(OP-1)とともに骨形成性の BMP に分類されている。間葉系幹細胞において、BMP-9 が BMP-2 より強く骨形成細胞への分化を促進することや、BMP-9 の作用が BMP アンタゴニストである noggin の影響を受けないことが報告されている (Wang Y *et al.* 2013)。BMP のシグナル伝達経路としては smad が広く知られており、その他にも mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路なども研究が進められている。

歯根膜は、歯の支持、歯周組織の恒常性の維持だけでなく、歯槽骨のリモデリングや歯周組織再生において重要な働きを担っており、セメント芽細胞や骨芽細胞に分化する未分化間葉系細胞も含まれていると考えられている。最近、歯根膜由来幹細胞 (periodontal ligament stem cells ; PDLSCs) にアデノウイルスを用いて BMP-9 を強発現させると骨分化作用が促進されたと報告された (Ye G *et al.* 2014)。しかし、ヒト歯根膜由来線維芽細胞(human periodontal ligament fibroblasts ; hPDLFs)に外因性に BMP-9 を作用させて骨芽細胞様分化が促進されるかどうかは不明である。そこで本研究では、hPDLFs を用いて、BMP-9 の骨芽細胞様分化に与える影響について BMP-2 と比較して検討を行った。

**【材料及び方法】**

Lonza 社より購入した hPDLFs を実験に用いた。骨分化培地下で BMP-2 および BMP-9 添加後、アルカリフォスファターゼ(ALP)の染色と活性測定、および石灰化物形成評価を行った。BMP の各種受容体の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて、骨および BMP 関連因子の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて解析した。small interfering (si) RNA を用いた activin receptor-like kinase (ALK) -1, -2 の遺伝子抑制による *osterix* および *ALP* の遺伝子発現への影響を、real-time PCR 法を用いて評価した。Western blot 法にて smad1/5/8 のリン

酸化を解析した。MAPK 経路 (p38, JNK, ERK1/2) の阻害剤 (SB203580, SP600125, U0126) を用いて、BMP-9 による hPDLFs の骨芽細胞様分化における MAPK 経路の関与を ALP 活性を指標として評価した。noggin の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて、また、BMP-9 の作用に対する noggin の影響を ALP 活性を指標として評価した。

## 【結 果】

BMP-2 刺激と比較して BMP-9 刺激は、培養 6 日後に ALP 活性を有意に亢進させた。また 15 日目の Alizarin Red S 染色において、BMP-2 刺激と比較して BMP-9 刺激で有意に石灰化物形成が促進した。hPDLFs において BMP 受容体群 (ALK-1/-2/-3/-6, BMP receptor type II, activin receptor type II A/II B, endoglin) の遺伝子発現が認められ、骨および BMP 関連因子(*runx2*, *ID-1*, *osterix*, *osteopontin*, *bone sialoprotein*)の遺伝子発現が BMP 未添加群および BMP-2 刺激と比較して BMP-9 刺激で有意に上昇した。ALK-1, -2 の遺伝子抑制により、BMP-9 により誘導される *osterix*, *ALP* の遺伝子発現は有意に減少した。BMP-9 刺激後に smad1/5/8 のリン酸化が認められた。MAPK 阻害剤 (SB203580, SP600125, U0126) により、BMP-9 刺激によって誘導された ALP 活性は有意に減少した。noggin の遺伝子発現は BMP 未添加群と比較して、BMP-2 刺激および BMP-9 刺激で有意に上昇した。しかし、外因性に添加した noggin は、BMP-2 刺激によって誘導された ALP 活性を有意に減少させたが、BMP-9 刺激によって誘導された ALP 活性に有意な影響を与えなかった。

## 【結論及び考察】

本研究において、BMP-2 と比較して、BMP-9 は hPDLFs の骨関連遺伝子発現、ALP 活性、石灰化物形成を有意に亢進させることが明らかとなった。間葉系幹細胞において、BMP-9 の作用発現には ALK-1, -2 が、BMP-2 の作用発現には ALK-3, -6 が重要であると報告されている (Luo J *et al.* 2010, Miyazono *et al.* 2010)。本研究においても、ALK-1, -2 の遺伝子抑制により、BMP-9 で誘導された *osterix*, *ALP* の遺伝子発現は有意に減少し、BMP-9 の作用における ALK-1, -2 の重要性が示された。BMP-2 と BMP-9 との骨分化作用の差については、このような受容体の違いだけでなく、BMP のフィードバックメカニズムの影響も考えられる。本研究の hPDLFs において、noggin は、BMP-2 と異なり BMP-9 に対しては ALP 活性に抑制的な影響を認めず、間葉系幹細胞 (Wang Y *et al.* 2013) や脱分化脂肪細胞 (Nakamura T *et al.* 2013) において、BMP-9 の骨芽細胞様分化作用は noggin の影響を受けないという報告と一致している。

本研究では BMP-9 刺激時に smad 経路が関与することが示された。MAPK 経路では、p38, JNK, ERK1/2 すべてが hPDLFs の骨芽細胞様分化の亢進に関与するという結果が得られたが、アデノウイルスを用いて BMP-9 を強発現させた PDLSCs では、骨分化が p38 と ERK1/2 の阻害により、各々減少、亢進したという以前の報告 (Ye G *et al.* 2014) とは異なった。この ERK1/2 経路におけるの反応の違いは、BMP-9 の刺激法の違いや、細胞種の違いによるかもしれない。

本研究により、BMP-9 は hPDLFs の骨芽細胞様分化を強力に促進する因子であり、その作用には smad 経路と MAPK 経路 (p38, JNK, ERK1/2) が関与することが示された。これらのことから、BMP-9 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かもしれない。

