

博士論文

周期的伸展力によるヒト歯根膜細胞の機能調節作用

～骨形成蛋白質（BMP）-2 の発現誘導～

鈴木 理紗子

平成二十五年度提出

東北大学

## 要旨

歯根膜細胞は歯周組織の恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。咀嚼によって生じる伸展力、圧縮力、流体せん断力および流体静力等によって同細胞にはメカニカルストレスが誘導される。本研究では、周期的伸展力をヒト歯根膜細胞に加えることにより、骨形成に重要とされる *Bone morphogenetic protein (BMP) -2* 遺伝子の発現が上昇することをリアルタイム PCR 法を用いて明らかにした。まず、シグナル阻害剤である PD98059 (extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor) と SB203580 (p38 inhibitor) を用いて調べたところ、周期的伸展力による *BMP-2* 遺伝子発現には ERK1/2 と p38 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化が必須であることがわかった。また、周期的伸展力は ERK1/2 と p38 MAP キナーゼ経路を介して *cyclooxygenase (COX) -2* 遺伝子発現を誘導し、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 合成を行うことが明らかとなった。さらに、COX-2 阻害剤である NS-398 で細胞を前処理すると、伸展力を介した *BMP-2* 発現は有意に抑制された。これらの結果から、誘導された COX-2 によって合成された PGE<sub>2</sub> が *BMP-2* の発現誘導に関与すると考えられた。NS-398 による *BMP-2* 遺伝子発現の抑制効果は外因性に PGE<sub>2</sub> を添加することで完全に回復した。しかしながら、伸展力を加えない条件下で PGE<sub>2</sub> 単独刺激を行なった場合、*BMP-2* 発現誘導は認められなかった。このことは、伸展刺激による *BMP-2* 発現誘導には、COX-2/PGE<sub>2</sub> 以外の重要な分子が必要であることを示唆している。以上の結果から、伸展刺激は ERK1/2 と p38 MAP キナーゼシグナル経路の活性化を介して、*COX-2* 発現を誘導し、それにより合成された PGE<sub>2</sub> が *BMP-2* 発現を遺伝子レベルで増加させることが示された。

## 緒言

歯周組織はセメント質、歯根膜、歯槽骨および歯肉を含む組織で、歯と歯槽骨を結合して歯を支持するばかりでなく、咬合を維持している (1)。歯根膜は歯周組織の主な構成成分の一つであり、セメント質と歯槽骨をつなぐ結合組織である (1)。加えて、歯根膜には歯牙の支持ばかりでなく、歯周組織の恒常性の維持および組織の修復を行うという機能がある。

歯根膜細胞には組織幹細胞が存在しており、セメント芽細胞、骨芽細胞および線維芽細胞などへの分化能を有する前駆細胞の集団として機能し、セメント質、歯槽骨や靭帯線維を形成して、組織の恒常性の維持、修復や再生を司る (2)。口腔内の生理的環境の中で、歯根膜は咬合力という伸展力、圧縮力、流体せん断力および流体静力から成るメカニカルストレスに常に晒されている (3)。歯根膜細胞はこれらのメカニカルストレスに反応し、リモデリングに必要な分子を産生するが、その種類によって誘導される反応が異なることが知られている (4)。これらのストレスのうち、周期的伸展力を歯根膜細胞へ加えることで骨形成関連遺伝子が誘導されることが報告されており、その過程においては receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) (5, 6) , 骨形成関連分子および成長因子 (7-11) の発現調節が行われることが報告されている。しかしながら、その分子メカニズムについては解明されていない。

Bone morphogenetic proteins (BMPs) , transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, fibroblast growth factor (FGF)-2, platelet-derived growth factor (PDGF) および insulin-like growth factor (IGF)等の様々な成長因子が歯根膜細胞における骨形成代謝に関与している (12)。それらのうち、BMPsは構造的に TGF- $\beta$ スーパーファミリーと関係し、齧歯動物において異所性の骨形成を誘導する (13)。BMP ファミリーの中でも、特に Bone morphogenetic protein (BMP) -2 は様々な生物学的機能を有し、特に骨形成細胞への分化誘導能が広く研究されている (14)。in vitro において、間葉系幹細胞および骨芽細胞に

*BMP-2* 遺伝子を強制発現させると細胞の骨分化能が誘導され骨形成を生じる (15)。歯根膜細胞は骨芽細胞と異なり、恒常状態においては *msh homeobox-2* (*Msx-2*) (16) や *Twist* (17) の発現により、硬組織形成細胞への分化は抑制的に制御されている。しかしながら、*BMP-2* は歯根膜細胞や硬組織形成 (骨芽/セメント芽) 細胞の前駆細胞と報告されている歯小囊細胞 (19) に対して、硬組織形成 (骨芽/セメント芽) 細胞への分化を誘導することが報告されている (18)。内因性 *BMP-2* の発現誘導は以下のような報告からも歯周組織の再生に重要であるといわれている。すなわち、1) 歯周組織再生材料として臨床で使用されている enamel matrix derivative (*EMD*) は歯根膜細胞の *BMP-2* 発現を誘導する (20)。; 2) 動物実験において、*EMD* 処理された歯根表面に *BMP-2* を発現するマクロファージが集積する (21)。; 3) 逆根管充填材料である mineral trioxide aggregate は歯根表面にセメント質を誘導する (22) , ヒト歯根膜細胞に対して *BMP-2* 発現を誘導する (23)。

伸展刺激を受けた歯根膜細胞が、*BMP-2* を含む各種成長因子の遺伝子発現レベルを上昇させることを明らかにした研究報告はわずかしがなく (7, 20, 24) , *BMP-2* 誘導の分子メカニズムに関する報告は皆無である。そこで、私は周期的伸展力下におけるヒト歯根膜細胞の *BMP-2* 発現制御の分子メカニズムを検証した。本研究では、周期的伸展力により extracellular signal-regulated kinase (*ERK*) 1/2 および p38 mitogen-activated protein (*MAP*) キナーゼシグナル経路を介して *cyclooxygenase (COX) -2* 発現が誘導され、それにより合成されたプロスタグランジン  $E_2$  ( $PGE_2$ ) を介して、*BMP-2* 発現が遺伝子レベルで増強することを明らかにした。

## 材料および方法

### 試薬

Actinomycin D (Act D), PD98059, SB203580 および SP600125 は Calbiochem-Novabiochem Co. (La Jolla, CA) から購入した。NS-398 (選択的 COX-2 阻害剤) は Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI) から購入した。PGE<sub>2</sub> および ascorbic acid は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から購入した。選択的 PGE<sub>2</sub> 受容体作動薬である ONO-AE1-259-01 (EP2 作動薬), ONO-AE-248 (EP3 作動薬) および ONO-AE1-329 (EP4 作動薬) は小野薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) から供与されたものを用いた。Dimethylsulfoxide (DMSO) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。

### 細胞培養

ヒト歯根膜細胞は東北大学病院で同意を得た歯周組織の炎症徴候のあるものを除いた完全萌出した健全な第三大臼歯 (19歳から29歳まで) の歯根膜を採取し、そこから分離した(25)。歯根膜はメスで歯根中央部 1/3 から歯肉や歯髓細胞を含まないように離切し、小片にしたものを、10 %heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) と抗生物質 (penicilin G) の入った $\alpha$ -Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 中で out-growth 法により培養し、単一層細胞がコンフルエントとなるまで 3 日おきに培地交換を行なった。コンフルエントに達した後、細胞は 0.25 %trypsin-0.1 %EDTA 処理を施し、ディッシュからはがして細胞を回収し継代を行なった。歯根膜細胞は 3 代から 10 代の継代培養したものを実験に供試した。実験開始に先立って、東北大学大学院歯学研究科倫理審査委員会による承認を受けた (承認番号: 20-19)。

### 細胞伸展刺激

周期的伸展力をヒト歯根膜細胞へ加えるために、STB-140 STREX 細胞進展装置 (STREX Co., Osaka, Japan) を用いた。300 µg/ml I 型アテロコラーゲン (Atelo Cell® , KOKEN Co., Tokyo, Japan) でコーティングされたシリコンレジンチャンバー (サイズ : 32×32 mm, STB-CH-10.0, STREX Co.) で細胞をコンフルエントになるまで培養した。細胞を 50 µg/mL の ascorbic acid および 5 %FBS をα-MEM 培地にて周期的伸展力下 (5 %進展率, 1/60 Hz) で 6 時間培養した。なおコントロールとして、伸展力を受けていないチャンバーの細胞を用いた。

#### 逆転写および定量性 Real-time polymerase chain reaction (PCR)

全細胞 RNA は製品マニュアルに従い、RNeasy® (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) で抽出し、DNase (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, USA) 処理を施した。全 RNA は Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, IN, USA) を用いて、PCR 増幅を行い、100 ng に転換された cDNA を使用した。以下に BMP-2, -3, -4, FGF-2, IGF-1, COX-2, PGE<sub>2</sub> receptor subtype 1 (EP1), EP2, EP3, EP4, glycerol-dehyde 3-phosphate (GAPDH) をコードしているヒト遺伝子の特異的プライマー塩基配列 (LightCycler Probe Design 2.0 (Roche) を用いて決定した) は以下の通りである。

(forward/reverse):

*BMP-2* (5'-CGAAATCCCCGTGAC-3'/5'-AGTTACTAGCAATGGCCT-3'); *BMP-3*  
 (5'-AATTCAGCTATTTACACCCC-3'/5'-CACTTAAACCAAAGCGAATGC-3'); *BMP-4*  
 (5'-ACTACATGCGGGATCT-3'/5'-AGATCGCCTCGTTCTCA-3'); *FGF-2*  
 (5'-AAACCCGAGCGAGTAG-3'/5'-GTTACGGATGGGTGT-3'); *IGF-1*  
 (5'-AGTTAGATGTGATAATTCTAAGAGTGTC-3'/5'-CAGTTGGAGAGGATTATGTGTT-  
 3'); *PDGF-B*

(5'-CAAACCTCGGGTGACCATTC-3'/5'-GGCAATACAGCAAATACCATATTTAAA-3');

*COX-2*

(5'-TCCTTGAAAGGACTTATGGGTAAT/5'-CTGAATGAAGTAAAGGGACAGC-3'); *EP1*

(5'-CGGTATCATGGTGGTGTC-3'/5'-CTGGCGCAGTAGGATGT-3'); *EP2*

(5'-GGACCACCTCATTCTCCTG-3'/5'-AAAGACCCAAGGGTCAATTAT-3'); *EP3*

(5'-TGGTCTCCGCTCCTGATA-3'/5'-TCTTAACAGCAGGTAAACCCA-3'); *EP4*

(5'-AGTACTGTTTCTGGACCCTTA-3'/5'-CCACGTGAGTCAACTTGATT-3'); *GAPDH*

(5'-TGAACCATGAGAAGTATGACAACA-3'/5'-TCTTCTGGGTGGCAGTG-3')

Real-time PCR の条件は, 40 サイクル, 95/60, 55/30, 72;30 【温度 (°C) /時間 (秒)】 に設定し, PCR 産物は iQ SYBR Green Supermix® (Bio-Rad) を用いて最終濃度 3 mM MgCl<sub>2</sub> となるように試料を調製し, CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System® (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて解析を行った。遺伝子増幅後は, PCR 生成物の特異性を確認するために, 増幅後さらに 0.5 °C/30 秒率で 55 °C から 95 °C までの融解曲線を作成した。各反応過程においては水を negative control とし, 反応生成物は GAPDH を reference gene として用いることで定量化した。さらに各実験の対照比較としてヒト歯根膜細胞の cDNA を calibrator として用いた。また, 従来型の PCR では, 同様なサイクルプログラムで 30 サイクルを行い, その後, 2.0 %アガロースゲルに泳動したものを, エチレンブロマイドにより染色し, UV ライト下で写真撮影を行った。

ウエスタンブロット分析

コンフルエントとなった単一層細胞は, 製品マニュアルに従い Cell Lysis Buffer® (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を用いて溶解した。細胞溶解物は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後, semidry transblot system (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて, polyvinylidene difluoride membrane (ATTO) に転写した。ブロットしたメン

ブレンは 0.5 % (w/v) non-fat dried milk と 0.1 % (v/v) Tween20 配合 phosphate-buffered saline (PBS) で室温 1 時間にてブロッキングを行った後, 続いて希釈濃度 1:1000 の rabbit anti-phosphorylated ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phosphorylated p38, anti-p38, anti-phosphorylated c-jun N-terminal kinase (JNK), あるいは anti-JNK antibodies (Cell Signaling Technology) を室温で 1 時間反応させた。引き続き, 希釈濃度 1:2000 の horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) で室温 1 時間処理した後, Western blotting detection reagent ECL Plus® (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) で処理を行い, 化学発光シグナルは luminescent image analyzer ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad) を用いて分析した。発現強度は NIH Image software を用いてデンシトメトリースキャンにより定量化した。

#### ELISA 法による PGE<sub>2</sub> 測定

細胞の上清は 1500 rpm で 5 分間遠心分離して回収し, -20 °C で保存した。上清中の PGE<sub>2</sub> 量は PGE<sub>2</sub> EIA Kit (Cayman Chemicals) を用いて測定した。PGE<sub>2</sub> の濃度は Softmax data analysis program (Molecular Devices, Menlo Park, CA) にて解析した。すべてのサンプルは triplicate で行なった。

#### 統計分析

全ての実験において, 結果の再現性を確かめるために 3 回以上の実験を繰り返し行い, その代表的な結果を示した。測定値はそれぞれの平均値と標準偏差 (standard deviation ; SD) を算出して表した。コントロールと刺激実験間の有意差検定は one-way ANOVA 法により行い, 危険率 (P) < 0.05 の時に有意差があるとした。



## 結果

### ヒト歯根膜細胞における周期的伸展刺激は *BMP-2* 遺伝子の発現を増強する

コンフルエントとなった細胞を 5 %伸展率, 1 分間に 1 サイクルの頻度で 6 時間刺激した。

図 1A では周期的伸展刺激に晒された歯根膜細胞を顕微鏡下でみたものである。伸展力を受けた細胞に損傷が生じていないことがわかった。各種成長因子の遺伝子発現を定量性 PCR 法で解析したところ, 図 1B に示すように *BMP-2* 遺伝子の発現が有意に上昇していた。しかし, *BMP-4* および *IGF-1* 遺伝子の発現に対して伸展刺激は有意な変化を与えなかった。

*BMP-3*, *FGF-2* および *PDGF-B* 遺伝子の発現はコントロール群および伸展刺激群の両者でほぼ検出されなかった (データは示さず)。異なる 2 つのドナーより得られた歯根膜細胞においても再現性が得られたため (データは示さず), 図 1A に示した細胞を本研究で使用した。

### 伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子発現誘導は転写レベルで制御されている

次に, 伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子発現が転写レベルで制御されているかどうかを調べるために, コンフルエントとなった細胞に RNA 合成阻害剤である Act D 存在あるいは非存在下にて 6 時間伸展刺激を行い, *BMP-2* 遺伝子の発現を解析した。図 2A に示すように Act D 存在下では, 伸展刺激群および非伸展刺激群の両群ともに *BMP-2* 遺伝子発現はほぼ完全に抑制された。さらに, *BMP-2* 遺伝子発現の安定性に対する細胞伸展刺激の影響を調べた。

コンフルエントとなった細胞に 3 時間伸展刺激することにより *BMP-2* 遺伝子の発現が誘導された (図 2B)。その時点で Act D を添加し, 伸展刺激群および非伸展刺激群に分けて, さらに 1.5 時間培養を行い *BMP-2* の遺伝子発現を解析した。図 2B に示すように伸展刺激群および非伸展刺激群の両群とも *BMP-2* 遺伝子発現量は減少し, 群間に有意差は認められなかった。このことから伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子の発現誘導は遺伝子の安定性を高めることによるものではなく, 転写レベルで制御されていることが示唆された。

### 伸展刺激を介した *BMP-2* 遺伝子発現には p38 と ERK1/2 が関与する

伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子発現誘導にいかなるシグナル経路が関与しているかを明らかにするために、伸展刺激が p38, ERK1/2 および JNK といった MAP キナーゼのリン酸化を誘導するかを Western blot 法で検証した。図 3A および B に示すように、p38, ERK1/2 および JNK 共にリン酸化は刺激後 15 分で認められ、同じく 45 分においても維持されていた。次に、ERK1/2, p38 および JNK シグナルが伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子発現誘導に関与するかを調べるために MAP キナーゼ阻害剤である PD98059 (MEK1/2 inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor) および SP600125 (JNK inhibitor) で 30 分前処理した後、伸展刺激を行い、*BMP-2* 遺伝子の発現量を定量性 RT-PCR 法にて解析した。図 4A および B に示したように、PD98059 および SB203580 存在下において *BMP-2* 遺伝子発現は顕著に抑制された。しかし、図 4C に示したように SP600125 存在下では *BMP-2* 遺伝子発現に有意な抑制はみられなかった。このことから伸展刺激による *BMP-2* 誘導には ERK1/2 と p38 シグナル経路が関与していることが示唆された。

### 伸展刺激によりヒト歯根膜細胞で COX-2 遺伝子発現が増強し PGE<sub>2</sub> が合成される

伸展および圧縮等による様々なメカニカルストレスによって、ヒト歯根膜細胞に COX-2 発現が誘導されることが知られている (5, 26-28)。本実験系においても同様の反応がみられるかを解析したところ、ヒト歯根膜細胞を 6 時間伸展刺激することで *COX-2* 遺伝子の顕著な誘導が認められた (図 5A)。図 4 に示したように伸展刺激による *BMP-2* の発現誘導には JNK は関与せず、p38 と ERK1/2 が関与していることから、同じ刺激による *COX-2* 遺伝子発現誘導のシグナル経路にもこれらが関与している可能性を検討した。コンフルエントに達した細胞に PD98059, SB203580 および SP600125 存在下で伸展刺激を行なったところ、PD98059 および SB203580 存在下において *COX-2* 遺伝子は有意に抑制された (図 5 B および C)。しかし、図 5D に示すように SP600125 存在下では抑制は認められなかった。こ

のことから、*COX-2* 遺伝子発現にも ERK1/2 と p38 が関与していることが示唆された。次に、培養上清中の *COX-2* による酵素反応生成物である PGE<sub>2</sub> 量を測定するため ELISA 法を用いて調べたところ、刺激後 1 時間より PGE<sub>2</sub> の有意な誘導が認められ、6 時間にわたって維持された (図 5E)。

伸展刺激によって誘導される *BMP-2* 遺伝子発現は *COX-2*/PGE<sub>2</sub> シグナル経路に依存する伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子発現誘導に *COX-2*/PGE<sub>2</sub> シグナルが関与している可能性を調べるために、コンフルエントに達した細胞に *COX-2* 阻害剤である NS-398 を添加して 6 時間伸展刺激を行なったところ、*BMP-2* の発現は部分的ではあるが有意に抑制された (図 6A)。このことは、誘導された *COX-2* による PGE<sub>2</sub> 産生が *BMP-2* 発現誘導に関与していることを示唆する。この可能性を検証するために、同実験系に外因性 PGE<sub>2</sub> を添加したところ、その抑制は解除された (図 6A)。非伸展刺激下において PGE<sub>2</sub> (10 ng/ml および 100 ng/ml) 単独刺激を行なったところ、*BMP-2* 遺伝子の有意な誘導はみられなかった (図 6B)。このことから伸展刺激によって誘導される *BMP-2* 遺伝子発現は *COX-2*/PGE<sub>2</sub> シグナル経路に依存することが示唆された。以上の経緯から、伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子の発現には *COX-2*/PGE<sub>2</sub> シグナル経路が関与していること、さらに PGE<sub>2</sub> 単独刺激では *BMP-2* 遺伝子の発現を誘導しないことが示唆された。次に EP レセプター (EP1, EP2, EP3 および EP4) のサブタイプのうちどのレセプターを介して *BMP-2* 発現を誘導しているか検討した。まず、ヒト歯根膜細胞の *EP1*, *2*, *3* および *4* の遺伝子発現を RT-PCR で解析したところ、*EP2*, *EP3* および *EP4* の発現が認められたが *EP1* の発現は認められなかった (図 6C)。次に NS-398 存在下でそれぞれの EP レセプターの選択的作動薬を加え、6 時間伸展刺激下で培養したところ、図 6D に示したように EP2 作動薬は *BMP-2* 遺伝子を有意に誘導した。一方、他の EP レセプター作動薬は *BMP-2* 遺伝子を誘導しなかった。このことから、伸展刺激を介した *BMP-2* 誘導は *COX-2*/PGE<sub>2</sub>/EP2 シグナルを介していることが示唆された。さらに、図

6Eに示すように, 6時間伸展刺激では *EP2* および *EP4* の遺伝子発現が増強されることが明らかとなった。

## 考察

本研究においては、周期的伸展刺激により ERK1/2 および p38 MAP キナーゼの活性化を生じて *COX-2* 発現を誘導することで、合成された PGE<sub>2</sub> がオートクラインに *BMP-2* 遺伝子発現を転写レベルでさらに増強させるという新たなメカニカルストレスに対する細胞応答機構を明らかにした (図 7)。

セリン-スレオニンプロテインキナーゼである MAP キナーゼには ERK, JNK および p38 キナーゼが含まれ、これらは発生, 増殖, 分化, アポトーシスおよび炎症などを制御する (29)。骨芽細胞をはじめ, 様々な細胞において, 周期的伸展力は MAP キナーゼ活性を引き起こすことが報告されている (30-32)。今回, 周期的伸展力によりヒト歯根膜細胞では ERK, JNK および p38 MAP キナーゼのリン酸化が誘導されたが, さらに *BMP-2* 遺伝子誘導に至るには ERK1/2 および p38 の活性化が必要であることがわかった。それに対して JNK は伸展力を介した *BMP-2* 遺伝子誘導に関与しなかったが, リン酸化した JNK は, I 型コラーゲンや Matrix Metalloproteinase (MMP) -1 等の機械受容遺伝子のプロモーターへの結合が報告されている AP-1 転写因子の形成に関与している可能性が考えられる (33)。

周期的伸展力によって誘導される *COX-2* 同様に, *BMP-2* 発現は完全に ERK1/2 と p38 MAP キナーゼシグナル経路に依存しており, NS-398 による処理は *BMP-2* 誘導を部分的に阻害したことから, *BMP-2* 誘導は *COX-2*/PGE<sub>2</sub> シグナルに部分的に依存していることがわかった。加えて, PGE<sub>2</sub> 単独刺激は *BMP-2* 遺伝子発現を上昇させなかった。すなわち, 周期的伸展力を介した *BMP-2* 誘導には *COX-2*/PGE<sub>2</sub> 経路の以外に, ERK1/2 および p38 MAP キナーゼが誘導するまだ明らかではない重要な分子を介する経路の存在が示唆される。一方で *COX-2*/PGE<sub>2</sub> シグナルは, 図 7 に示したように *BMP-2* 誘導のポジティブレギュレーターとして機能すると考えられる。*COX-2*/PGE<sub>2</sub> シグナルは, 骨細胞と同様に歯根膜細胞でもメカニカルストレスによるシグナル伝達において重要な調節因子であると報告されている (5, 26-28)。本研究においても, 外因性の PGE<sub>2</sub> 添加により NS-398 による *BMP-2* 抑制

が完全に回復したことから、 $\text{PGE}_2$  シグナルは伸展力を介した *BMP-2* 遺伝子誘導に関わっていることを示した。 $\text{COX-2/PGE}_2$  シグナルは骨修復の過程における骨形成に重要であることが知られており (34) , その作用は *EP2* および *EP4* を介して行われることが報告されている (35, 36)。さらに  $\text{COX-2}$  によって産生された  $\text{PGE}_2$  は、*EP4* レセプターを介して、マウス間葉前駆細胞同様に (38) ヒト間葉前駆細胞でも *BMP-2* を増加させることが報告されている (37)。本研究において、*NS-398* により抑制された *BMP-2* 発現が *EP2* 作動薬によりその抑制が解除されたことから、伸展刺激による *BMP-2* 誘導に *EP2* シグナルが関与していることが示唆された。さらに歯根膜細胞への伸展刺激により *EP2* および *EP4* の遺伝子発現が有意に上昇した。このことより、伸展力を受けた歯根膜細胞は *EP2* および *EP4* レセプターを介したシグナルを受けやすくなるものと思われる。

周期的伸展力がヒト歯根膜細胞に加わることで、歯根膜細胞自身またはその近隣の細胞である骨芽細胞等の骨形成細胞の分化に関連する遺伝子発現 (7-11) を誘導することが報告されている。このことは、伸展刺激による *BMP-2* 誘導がオートクラインのみならずパラクラインにも作用することを示唆する。一方で、周期的伸展力は I 型コラーゲン、オキシタラン線維、*MMP* およびマトリックスメタロプロテアーゼ阻害物質 (5, 34,39) 等の発現を介して細胞外基質の代謝を制御している。従って、歯根膜細胞は適切なメカニカルストレスによって歯周組織の恒常性の維持を行うものと考えられる。本研究で得られた結果は歯根膜細胞の生理機能を解明する上で役立つ重要な知見である。

## 謝辞

稿を終えるに臨み、多大なるご指導、ご校閲を賜りました東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野 島内英俊教授、本研究の実施にあたり、細部にわたるご指導をいただきました同分野 根本英二准教授に深甚なる感謝を捧げます。さらに、研究の技術的なご指導を頂きました歯学イノベーションリエゾンセンター 金谷聡介助教に感謝申し上げるとともに、ご支援、ご協力いただいた歯内歯周治療学分野教室員各位に心より厚くお礼申し上げます。

なお本研究の要旨は第 56 回春季日本歯周病学会学術大会（2013 年 6 月）において発表した。

## 参考文献

1. **Mark P. Bartold.** Bone and tooth interface: periodontal ligament. In: McCauley LK, Somerman MJ, editors. Mineralized Tissues in Oral and Craniofacial Science. Wiley-Blackwell, Inc.; 2012. p. 219-230.
  
2. **Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S.** Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
  
3. **Pavasant P, Yongchaitrakul T.** Role of mechanical stress on the function of periodontal ligament cells. *Periodontol* 2000 2011; 56: 154-165.
  
4. **Papachristou DJ, Papachroni KK, Basdra EK, Papavassiliou AG.** Signaling networks and transcription factors regulating mechanotransduction in bone. *Bioessays* 2009; 31: 794-804.
  
5. **Tsuji K, Uno K, Zhang GX, Tamura M.** Periodontal ligament cells under intermittent tensile stress regulate mRNA expression of osteoprotegerin and tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 and -2. *J Bone Miner Metab* 2004; 22: 94-103.
  
6. **Kanzaki H, Chiba M, Sato A, Miyagawa A, Arai K, Nukatsuka S, Mitani H.** Cyclical tensile force on periodontal ligament cells inhibits osteoclastogenesis through OPG induction. *J Dent Res* 2006; 85: 457-462.



7. **Wescott DC, Pinkerton MN, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC.** Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension. *J Dent Res* 2007; 86: 1212-1216.
8. **Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Kono K, Akamine A.** The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2011; 90: 181-185.
9. **Liu M, Dai J, Lin Y, Yang L, Dong H, Li Y, Ding Y, Duan Y.** Effect of the cyclic stretch on the expression of osteogenesis genes in human periodontal ligament cells. *Gene* 2012; 491: 187-193.
10. **Diercke K, Kohl A, Lux CJ, Erber R.** Strain-dependent up-regulation of ephrin-B2 protein in periodontal ligament fibroblasts contributes to osteogenesis during tooth movement. *J Biol Chem* 2011; 286: 37651-37664.
11. **Li L, Han M, Li S, Wang L, Xu Y.** Cyclic tensile stress during physiological occlusal force enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via ERK1/2-Elk1 MAPK pathway. *DNA Cell Biol.* 2013 32(9):488-97
12. **Stavropoulos A, Wikesjo UM.** Growth and differentiation factors for periodontal regeneration: a review on factors with clinical testing. *J Periodontal Res* 2012; 47: 545-553.

13. **Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA.** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-1534.
14. **Ducy P, Karsenty G.** The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 2000; 57: 2207-2214.
15. **Huang W, Rudkin GH, Carlsen B, Ishida K, Ghasri P, Anvar B, Yamaguchi DT, Miller TA.** Overexpression of BMP-2 modulates morphology, growth, and gene expression in osteoblastic cells. *Exp Cell Res* 2002; 274: 226-234.
16. **Yoshizawa T, Takizawa F, Iizawa F, Ishibashi O, Kawashima H, Matsuda A, Endo N, Kawashima H.** Homeobox protein MSX2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 3460-3472.
17. **Komaki M, Karakida T, Abe M, Oida S, Mimori K, Iwasaki K, Noguchi K, Oda S, Ishikawa I.** Twist negatively regulates osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Cell Biochem* 2007; 100: 303-314.
18. **Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, Ikegame M, Ishibashi O, Okuda K, Hara K, Ishibashi K, Obinata M, Kawashima H.** A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Sci* 2002; 115: 4191-4200.

19. **Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ.** Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1441-1451.
20. **Nokhbehsaim M, Deschner B, Winter J, Bourauel C, Rath B, Jäger A, Jepsen S, Deschner J.** Interactions of regenerative, inflammatory and biomechanical signals on bone morphogenetic protein-2 in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2011;46(3):374-381.
21. **Fujishiro N, Anan H, Hamachi T, Maeda K.** The role of macrophages in the periodontal regeneration using Emdogain gel. *J Periodontal Res* 2008;43(2):143-155.
22. **Baek SH, Plenk H, Jr., Kim S.** Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod* 2005;31(6):444-449.
23. **Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A.** Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J Endod* 2010;36(4):647-652.
24. **Cho JH, Lee SK, Lee JW, Kim EC.** The role of heme oxygenase-1 in mechanical stress- and lipopolysaccharide-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells. *Angle Orthod* 2010; 80: 552-559.

25. **Nemoto E, Shimonishi M, Nitta Y, Shimauchi H.** The involvement of platelet-derived growth factor receptors and insulin-like growth factor-I receptors signaling during mineralized nodule formation by human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2004; 39: 388-397.
26. **Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A.** Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 1-5.
27. **Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H.** Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 210-220.
28. **Kang YG, Nam JH, Kim KH, Lee KS.** FAK pathway regulates PGE(2) production in compressed periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2010; 89: 1444-1449.
29. **King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ.** Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997; 76: 1460-1470.
30. **Hsu HJ, Lee CF, Locke A, Vanderzyl SQ, Kaunas R.** Stretch-induced stress fiber remodeling and the activations of JNK and ERK depend on mechanical strain rate, but not FAK. *PLoS One* 2010; 5: e12470.

31. **Ji G, Liu D, Liu J, Gao H, Yuan X, Shen G.** p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates NF-kappaB transcriptional activation through RelA phosphorylation during stretch-induced myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 547-551.
32. **Li JL, Cui B, Qi L, Li XY, Deng LF, Ning G, Liu JM.** NMDA enhances stretching-induced differentiation of osteoblasts through the ERK1/2 signaling pathway. *Bone* 2008; 43: 469-475.
33. **Kook SH, Jang YS, Lee JC.** Involvement of JNK-AP-1 and ERK-NF-kappaB signaling in tension-stimulated expression of type I collagen and MMP-1 in human periodontal ligament fibroblasts. *J Appl Physiol* 2011; 111: 1575-1583.
34. **Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ.** Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 2002; 109: 1405-1415.
35. **Li M, Ke HZ, Qi H, Healy DR, Li Y, Crawford DT, Paralkar VM, Owen TA, Cameron KO, Lefker BA, Brown TA, Thompson DD.** A novel, non-prostanoid EP2 receptor-selective prostaglandin E<sub>2</sub> agonist stimulates local bone formation and enhances fracture healing. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 2033-2042.
36. **Ke HZ, Crawford DT, Qi H, Simmons HA, Owen TA, Paralkar VM, Li M, Lu B, Grasser WA, Cameron KO, Lefker BA, DaSilva-Jardine P, Scott DO, Zhang Q, Tian XY, Jee WS, Brown TA, Thompson DD.** A nonprostanoid EP4 receptor selective

prostaglandin E<sub>2</sub> agonist restores bone mass and strength in aged, ovariectomized rats.

J Bone Miner Res 2006; 21: 565-575.

37. **Arikawa T, Omura K, Morita I.** Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E<sub>2</sub> in human mesenchymal stem cells. J Cell Physiol 2004; 200: 400-406.

38. **Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi JY, Kim JB.** Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. Stem Cells 2009; 27: 2254-2262.

39. **Tsuruga E, Nakashima K, Ishikawa H, Yajima T, Sawa Y.** Stretching modulates oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res 2009; 44: 170-174.

## 図の説明

図 1 周期的伸展刺激はヒト歯根膜細胞において *BMP-2* の遺伝子発現を増強する

コンフルエントとなった細胞を周期的伸展刺激下にて 6 時間培養した。(A) : 位相差顕微鏡写真を示す (倍率 :  $\times 400$ )。 (B) : 全 RNA を回収し, *BMP-2*, *BMP-4* および *IGF-1* の遺伝子発現をリアルタイム定量性 RT-PCR 法にて解析した。同様の実験を triplicate assay にて 3 回繰り返して行い, その代表的なデータを平均値  $\pm$  標準偏差で示した。統計学的有意差あり ( $P < 0.05$ ) は \* 印, 有意差なしは ns で示した。

図 2 周期的伸展刺激による *BMP-2* 遺伝子発現誘導は転写レベルで制御されている

(A) : コンフルエントとなった細胞に Act D (5  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下あるいは非存在下にて周期的伸展刺激を 6 時間加えた。(B) : コンフルエントとなった細胞を周期的伸展刺激下で 3 時間培養後, Act D (5  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加し, さらに 1.5 時間伸展刺激を行なった。全 RNA を回収し, *BMP-2* 遺伝子をリアルタイム定量性 RT-PCR 法にて解析した。同様の実験を triplicate assay にて 3 回繰り返して行い, その代表的なデータを平均値  $\pm$  標準偏差で示した。統計学的有意差あり ( $P < 0.05$ ) は \* 印, 有意差なしは ns で示した。

図 3 周期的伸展刺激は MAP キナーゼ経路を活性化する

(A) コンフルエントとなった細胞を周期的伸展刺激下にて図に示した時間培養した。リン酸化状態を調べるために, 細胞溶解物は抗 p-p38 (Thr180/Tyr182) 抗体, 抗 p-ERK1/2 抗体 (Thr202/Tyr204) および 抗 p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) 抗体を用いて, Western blot 法を用いて解析した。抗 p38 抗体, 抗 ERK1/2 抗体および 抗 SAPK/JNK 抗体はコントロールとして使用した (分子量, p38: 43 kDa, ERK1: 42 kDa, ERK2: 44 kDa, SAPK: 46 kDa, JNK: 54 kDa)。 (B) p38, ERK1 および JNK1 のリン酸化発現レベルは NHI Image software

を用いてデンシトメトリースキャニングで定量化した。リン酸化 p38, リン酸化 ERK1 およびリン酸化 JNK1 の発現レベルはそれぞれ p38, ERK1 および JNK の発現レベルと比較した。

図 4 周期的伸展刺激を介した *BMP-2* 発現には ERK1/2 と p38 MAP キナーゼ経路の活性化が必要である。

(A から C) : コンフルエントとなった細胞に SB203580, PD98059 および SP600125 を 20  $\mu\text{M}$  の濃度で 30 分間前処理を行い, 周期的伸展刺激下にて 6 時間培養した。コントロールを含む全てのサンプルの細胞培養液中の DMSO が最終濃度 0.1 % (v/v) となるように調製した。全 RNA を回収し, *BMP-2* 遺伝子をリアルタイム定量性 RT-PCR 法にて解析した。同様の実験を triplicate assay にて 3 回繰り返して行い, その代表的なデータを平均値±標準偏差で示した。統計学的有意差あり ( $P<0.05$ ) は\*印, 有意差なしは ns で示した。

図 5 歯根膜細胞において周期的伸展刺激は *COX-2* の遺伝子発現を誘導し,  $\text{PGE}_2$  産生を増強する。

(A から D) : コンフルエントとなった細胞を周期的伸展刺激下にて 6 時間培養した。(B から D) SB203580, PD98059 および SP600125 を 20  $\mu\text{M}$  の濃度で前処理した後, 周期的伸展刺激を行った。コントロールを含む全てのサンプルの細胞培養液中の DMSO が最終濃度 0.1 % (v/v) となるように調製した。全 RNA を回収し, *COX-2* 遺伝子をリアルタイム定量性 RT-PCR 法にて解析した。(E) : 1, 3 および 6 時間周期的伸展刺激下にて培養した上清中の  $\text{PGE}_2$  の発現量を ELISA 法で測定した。同様の実験を triplicate assay にて 3 回繰り返して行い, その代表的なデータを平均値±標準偏差で示した。統計学的有意差あり ( $P<0.05$ ) は\*印, 有意差なしは ns で示した。



図6 伸展刺激によって誘導される *BMP-2*発現は *COX-2/PGE<sub>2</sub>*シグナル経路を介している

(A) : コンフルエントとなった細胞を NS-398 (5  $\mu$ M) で 30 分前処理した後, *PGE<sub>2</sub>* (100 ng/ml) 存在下あるいは非存在下で, 周期的伸展刺激を 6 時間行った。コントロールを含む全てのサンプルの細胞培養液中の DMSO が最終濃度 0.1 % (v/v) となるように調製した。

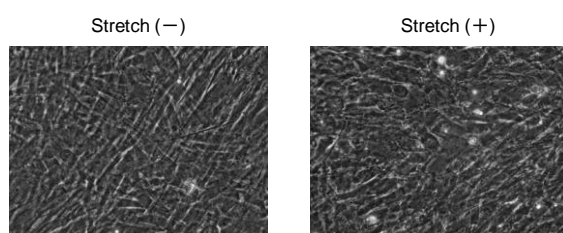
(B) : コンフルエントとなった細胞を図に示した濃度の *PGE<sub>2</sub>* で 6 時間刺激を行った。コントロールを含む全てのサンプルの細胞培養液中の DMSO が最終濃度 0.1 % (v/v) となるように調製した。(C) : コンフルエントとなった細胞の全 RNA を回収した。(D) : コンフルエントとなった細胞を NS-398 (5  $\mu$ M) 存在下かつ 1  $\mu$ M EP 作動薬 (EP2 作動薬である EP2A, EP3 作動薬である EP3A および EP4 作動薬である EP4A) 存在下あるいは非存在下で周期的伸展刺激を 6 時間行った。コントロールを含む全てのサンプルの細胞培養液中の DMSO が最終濃度 0.1 % (v/v) となるように調製した。(E) : コンフルエントとなつた細胞を周期的伸展力下にて 6 時間培養した後, *EP1*, *EP2*, *EP3* および *EP4* 遺伝子の発現について解析した。(A, B, D および E) : 全 RNA を回収し, リアルタイム定量性 RT-PCR 法にて解析した。同様の実験を triplicate assay にて 3 回繰り返して行い, その代表的なデータを平均値  $\pm$  標準偏差で示した。統計学的有意差あり ( $P < 0.05$ ) は \*印, 有意差なしは ns で示した。(C) : 従来型の PCR を 3 回繰り返して行い, その代表的なデータを示した。フラグメントサイズは 169 bp (EP-1), 166 bp (EP-2), 168 bp (EP-3), 154 bp (EP-4), 156 bp (GAPDH) である。

図7 周期的伸展力が PDL 細胞において *BMP-2* 発現を増強するメカニズム

歯根膜細胞において, 周期的伸展力は p38 および ERK1/2 MAP キナーゼを介して, *COX-2* 発現を誘導する。その結果, 産生された *PGE<sub>2</sub>* がオートクラインに作用して *BMP-2* 遺伝子発現を増強することが示唆された。*PGE<sub>2</sub>* シグナル経路のみでは *BMP-2* の誘導は十分ではなく, 周期的伸展力を介した *BMP-2* 誘導には *COX-2/PGE<sub>2</sub>* 経路の以外に, ERK1/2 および

p38 MAP キナーゼが誘導するまだ明らかではない重要な分子を介する経路の存在が示唆される。

A



B

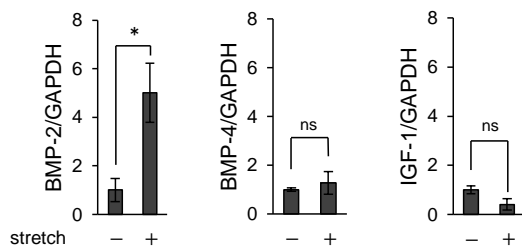
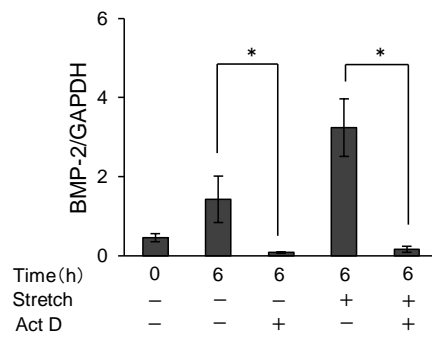
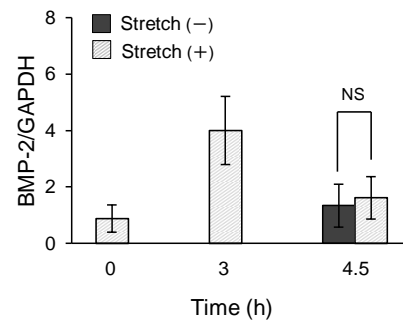


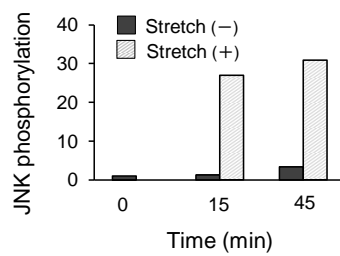
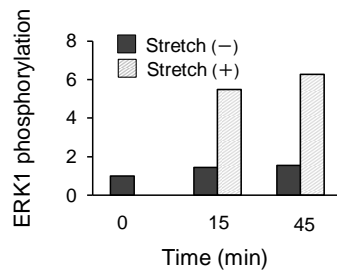
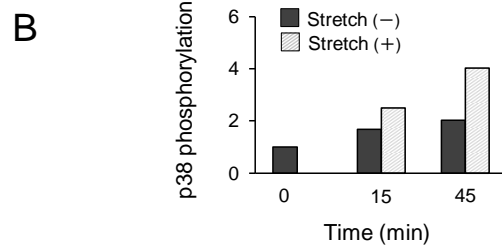
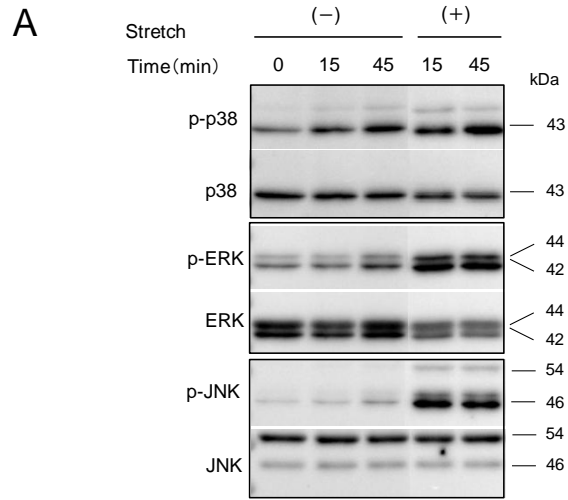
图1

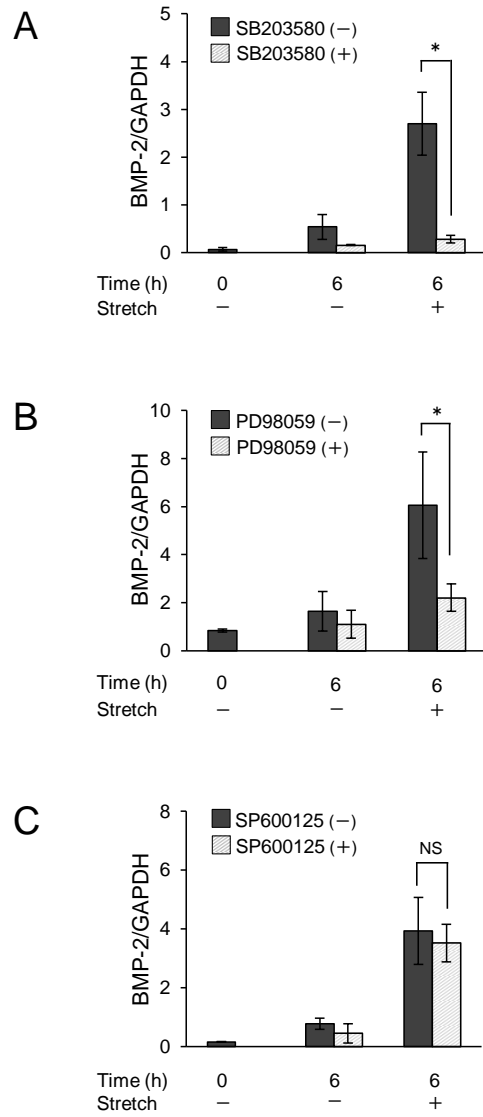
A



B







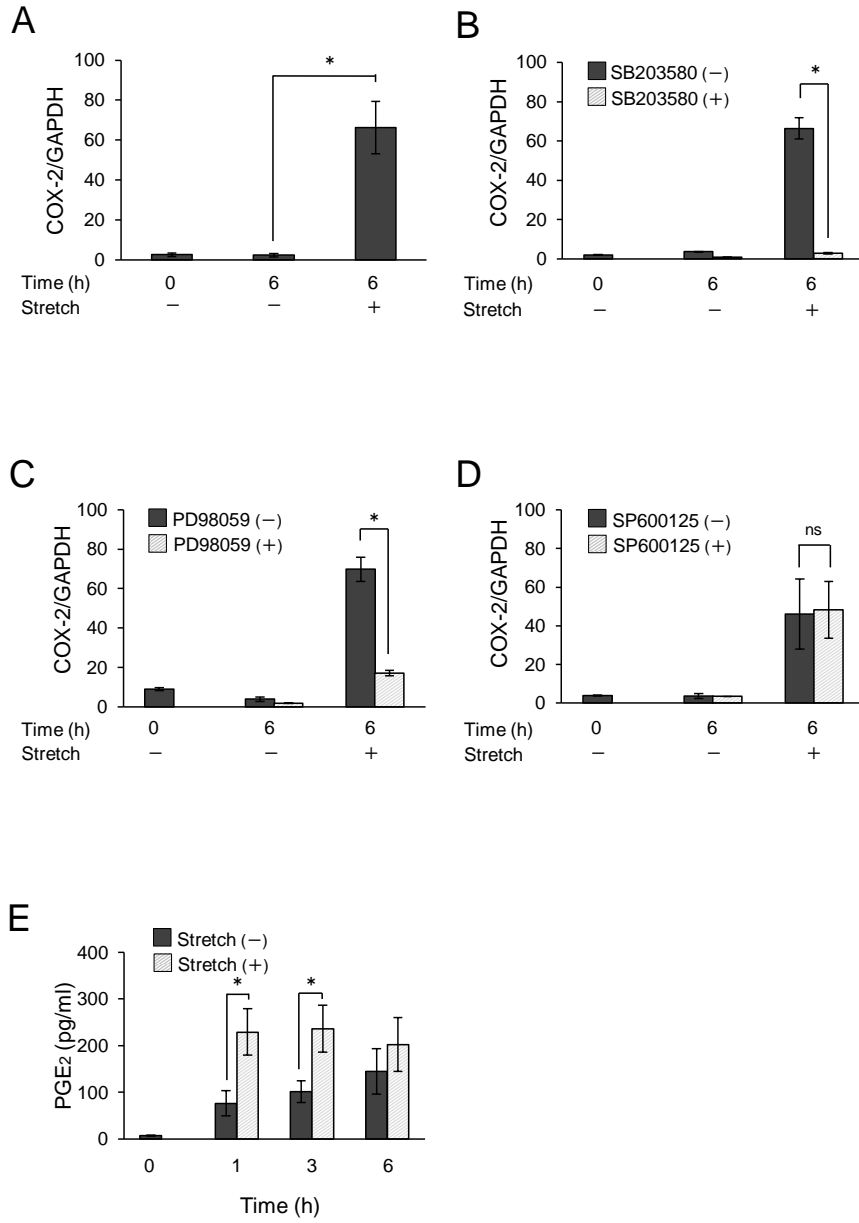


图5

