

Title	No. 15 : TGF- 1 による骨形成抑制作用時のWISP- 2 発現と骨形成との関与
Author(s)	吉澤, 佑世; 篠, 宏美; 月野和, 隆; 小野寺, 晶子; 齋藤, 暁子; 森永, 一喜; 村松, 敬; 東, 俊文; 古澤, 成博
Journal	歯科学報, 113(2): 204-204
URL	http://hdl.handle.net/10130/3032
Right	

No.15: TGF- β 1 による骨形成抑制作用時の WISP-2 発現と骨形成との関与

吉澤佑世¹⁾, 篠 宏美²⁾, 月野和隆¹⁾, 小野寺晶子²⁾, 齋藤暁子²⁾, 森永一喜¹⁾, 村松 敬¹⁾, 東 俊文²⁾, 古澤成博¹⁾ (東歯大・保存)¹⁾ (東歯大・生化)²⁾

目的: ヒト歯根膜は線維芽細胞を主としているが, 未分化間葉細胞を含み歯槽骨との位置関係から, 歯槽骨再生の細胞源としても注目されている。今回, 骨組織維持に重要な役割を果たすことが示唆されている Wnt signaling のヒト歯根膜細胞の骨分化誘導における役割について検討した。

方法: 細胞はヒト歯根膜細胞 (HPDL 細胞) を使用し, 骨芽細胞分化には骨分化誘導培地 (OBM) を用い, 96時間培養後それぞれの分析を行った。OBM に 1 ng/ml TGF- β 1 を添加して培養したものを 1 回投与群, 1 ng/ml TGF- β 1 を添加した OBM を 12時間毎に交換したものを複数回投与群, その複数回投与群に 200ng/ml IGF-1 を添加したものを IGF 投与群, 無添加で培養したものを対照群とした。評価項目は ALP 活性染色, Real-time PCR による ALP の mRNA 発現, ウエスタンブロット法での Wnt-1 inducible signaling pathway protein 2 (WISP-2) タンパクの発現とした。統計処理には一元配置の分散分析, および Bonferroni の多重比

較検定を用いた。

結果: ALP 活性染色では, 1 回投与群で強く染色されたものの, 複数回投与群ではほとんど染色されなかった。また, IGF 投与群では染色像が認められた。Real-time PCR では ALP の発現で ALP 活性染色と同様の結果が得られ, 複数回投与群では対照群と比較して約 100 倍発現が減少した ($p < 0.01$)。また, IGF 投与群でも有意に ALP 発現の回復が認められた ($p < 0.01$)。ウエスタンブロット法での WISP-2 発現は, 1 回投与群で増加したが, 複数回投与群では著しく低下した。また, IGF 投与群でも WISP-2 の発現の回復が認められた。

考察: TGF- β 1 の複数回投与による骨芽細胞分化の抑制作用下で, ALP の発現と WISP-2 の発現が連動していたことから, WISP-2 は骨形成において重要な因子であると考えられた。また, TGF- β 1 によって抑制された WISP-2 の発現が, IGF-1 添加によって回復したことから, PI 3 K/Akt 経路と Wnt signaling とのクロストークの存在が示唆された。

No.16: 新たな骨分化メカニズムの解明 (WNT 活性化機序との関連)

月野和隆¹⁾, 小野寺晶子²⁾, 吉澤佑世¹⁾, 篠 宏美²⁾, 齋藤暁子²⁾, 東 俊文²⁾, 森永一喜¹⁾, 村松 敬¹⁾, 古澤成博¹⁾ (東歯大・保存)¹⁾ (東歯大・生化)²⁾

目的: 新生骨形成を効果的に促進する治療法の開発は重要な課題である。我々は歯槽骨再生において重要な役割を果たすヒト歯根膜 (HPDL) 細胞を用いて, 炎症と骨再生抑制が TGF- β による IGF-1 -PI 3 キナーゼ経路抑制により生ずることを報告してきた。骨再生抑制機序では近年, Wnt 経路抑制因子が注目されているが不明な点が多い。そこで今回, HPDL における Wnt 経路の検討を行う。

方法: 細胞は HPDL 細胞を使用し, 骨芽細胞分化には骨分化誘導培地 (OBM) を用い 72 時間培養後それぞれの分析を行った。OBM に 50ng/ml BMP 2/7 を添加して培養したものを BMP 群, OBM に 50 ng/ml BMP 2/7, 100 μ M Dexamethasone (Dex) を添加したものを BMP+Dex 群とした。マイクロアレイ法及び IPA 解析を行い, Wnt 経路に関わる遺伝子を抽出し, 定量的 Real-time PCR で確認した。無添加で培養したもの (OBM 群), OBM に 100 μ M Dex を添加したもの (Dex 群) も同様に評価した。さらに, ALP 活性染色にて骨芽細胞への分化を観察した。統計処理には t 検定を用いた。

結果: マイクロアレイ法及び IPA 解析から Wnt 経

路抑制因子 (SOST, SFRP 2, DKK 1) の著明な発現変化を認めた。定量的 Real-time PCR で, DKK 1 の発現は約 1,150 倍, 有意に増加し, 一方, SOST は約 1/6.7, DKK 2 は約 1/127, SFRP 2 は約 1/3.5, 有意に減少した。また, ALP は約 4.3 倍, 有意に増加しており, ALP 活性染色でも他の群と比較して BMP+Dex 群は強く染色されていた。Dex 群と比較しても BMP+Dex 群の SFRP 2 は約 1/2.2, 有意に減少しており, ALP は約 3.3 倍, 有意に増加していた。

考察: Dex を添加することにより Wnt 経路抑制因子である DKK 2, SFRP 2 の発現を抑制し, BMP による骨分化誘導が増強されることが確認された。また DKK 1 も Wnt 経路阻害因子と考えられているが, 発現量が増加しているにもかかわらず ALP 活性が上昇しており, DKK 1 についてはさらなる研究が必要である。Wnt 経路抑制因子に対する特異抗体が骨再生を促進することが期待されているが, HPDL 細胞では DKK 2, SFRP 2 が骨再生促進のための標的分子として重要であると考えられた。