

Title	Phosphoinositide 3-Kinase (PI 3K) Activation is Differentially Regulated during Osteogenesis induced by TGF- 1 and BMP- 2 / BMP- 7
Author(s)	山下, 治人
Journal	歯科学報, 114(6): 600-601
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/3538">http://hdl.handle.net/10130/3538</a>
Right	

氏名(本籍)	やま した はると 山下 治 人 (福井県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 1959 号(甲第 1205 号)
学位授与の日付	平成24年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Phosphoinositide 3-Kinase (PI 3 K) Activation is Differentially Regulated during Osteogenesis induced by TGF- $\beta$ 1 and BMP-2/BMP-7
掲載雑誌名	Journal of Hard Tissue Biology 第23巻 1号 9-14頁 2014年
論文審査委員	(主査) 新谷 誠康教授 (副査) 齋藤 淳教授 東 俊文教授 阿部 伸一教授 松坂 賢一准教授

## 論文内容の要旨

### 1. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞は骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞など様々な細胞に分化する。これらの骨髄間葉系幹細胞が分化するメカニズムについては TGF- $\beta$ 1, BMP, ステロイドホルモン, PPAR $\gamma$ などが関与するとされるが, 口腔内に豊富に存在する間葉系幹細胞の分化メカニズムの検討は臨床への応用が期待出来るにもかかわらず, 未だ十分に解明されていない。歯根膜は様々な種類の細胞集団であり, 幹細胞や前骨芽細胞など未分化前駆細胞が含まれることが報告されている。しかし, 歯根膜細胞から骨芽細胞への分化にいたる動態については不明な点が多い。我々の先行実験において, 歯根膜細胞の骨芽細胞分化の際, TGF- $\beta$ 1が濃度や投与回数によってその分化を促進にも抑制にも誘導することがわかった。そして, その誘導には IGF-1の発現が深く関わっていることを見出している。そこで本研究では, TGF- $\beta$ ファミリーである TGF- $\beta$ 1と BMP-2/-7による歯根膜細胞の骨芽細胞分化誘導能の比較と, 一般に骨分化誘導を促進する因子として広く用いられているデキサメタゾンによる, これらサイトカインとの効果の変化を IGF-1に焦点を当て検討した。

### 2. 研究方法

細胞は正常ヒト歯根膜由来細胞(HPDL cells) (Lonza, Switzerland)を使用した。5~8継代の細胞を  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>で播種後, オーバーナイトで培養し, 細胞を培養皿に接着させた。翌日, 骨分化誘導培地(OBM;  $\alpha$ -MEM+L-Ascorbic Acid,  $\beta$ -Glycerophosphate)に交換し誘導を開始した。このとき OBM に, TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml)あるいは, BMP-2/-7 (50ng/ml), およびデキサメタゾン(100nM)を添加し培養を行なった。TGF- $\beta$ 1刺激は12時間毎に2回行なった。培養72時間において, ALP 活性染色, および骨分化マーカー(ALP)と IGF-1 関連遺伝子(IGF-1, PAPP, IGFBP-4)の発現量をリアルタイム PCR により検出した。また, IGF-1 タンパクの発現量をウエスタンブロットにて定量した。

### 3. 研究成績および結論

ALP 活性染色の結果, 1回のみ TGF- $\beta$ 1を投与した群では ALP 活性が有意に増加したが, 2回投与した群ではコントロール群よりも ALP 活性が減少した。BMP-2/-7を投与した群では, ALP 活性の増加は僅かであった。一方, デキサメタゾンの添加により, すべての群で増加が認められた。リアルタイム PCR による

ALP mRNA 発現(量)の結果でも ALP 活性染色と同様に, TGF- $\beta$ 1 の1回投与群では ALP 発現の有意な増加が認められたが, TGF- $\beta$ 1 の2回投与群では著しい減少が認められた。また, デキサメタゾンの添加により, ALP の発現量に増加が見られた。IGF-1 mRNA の発現量は, コントロール群と比べ TGF- $\beta$ 1 の1回投与群では約2倍の増加が認められたが TGF- $\beta$ 1 の2回投与群ではそのような増加は完全に抑制された。また, デキサメタゾンの添加により, TGF- $\beta$ 1 刺激下では IGF-1 の発現量は増加した。しかしながらそれとは逆に, BMP-2/-7 刺激下においてはデキサメタゾン添加により, IGF-1 の発現量は著しく抑制された。ウエスタンブロットにより IGF-1 タンパクの定量を行った結果, リアルタイム PCR と同様に TGF- $\beta$ 1 刺激下においてはデキサメタゾンの添加により IGF-1 の発現は増加するが, BMP-2/-7 刺激下においては, デキサメタゾン添加によりその発現は著しく減少した。

以上の結果から, TGF- $\beta$ 1 と BMP-2/-7 は共に歯根膜細胞の骨芽細胞分化を誘導するが, TGF- $\beta$ 1 の方がその効果はより高く, さらに IGF-1 の発現について, デキサメタゾンとの組み合わせでは TGF- $\beta$ 1 では相乗的に促進に働くが, BMP-2/-7 では反対に抑制的に働くことがわかった。このことから, TGF- $\beta$ 1 と BMP-2/-7 は共に骨芽細胞分化を誘導し, デキサメタゾンによりそれはさらに促進されるが, TGF- $\beta$ 1 による骨分化には IGF-1 の発現が重要な役割を担っており, BMP-2/-7 では IGF-1 ではなく他の因子が主に働いていることが示唆された。

#### 論文審査の要旨

歯根膜は様々な種類の細胞集団であり, 幹細胞や前骨芽細胞など未分化前駆細胞が含まれることが報告されている。しかし, 歯根膜細胞から骨芽細胞への分化にいたる動態については不明な点が多い。我々の先行実験において, 歯根膜細胞の骨芽細胞分化の際, TGF- $\beta$ 1 が濃度や投与回数によってその分化を促進にも抑制にも誘導することがわかった。そして, その誘導には IGF-1 の発現が深く関わっていることを見出している。そこで本研究では, TGF- $\beta$ ファミリーである TGF- $\beta$ 1 と BMP-2/-7 による歯根膜細胞の骨芽細胞分化誘導能の比較と, 一般に骨分化誘導を促進する因子として広く用いられているデキサメタゾンによる, これらサイトカインとの効果の変化を IGF-1 に焦点を当て検討した。

本審査委員会は, 1) 本論文の主題の変更, 2) Abstract の構成の訂正, 3) Introduction, Materials and Methods および Discussion の表現方法の変更ならびに不十分な説明の訂正, 4) 考察等での PAPP-A に関する説明の追加, および Akt に関する結果に対しての考察が無い, 5) Reference における誤字脱字を指摘され, 訂正が行われた。

全体としては, いくつか英文に間違いがあり, Fig に関しても記載漏れ等を指摘され, 訂正が行われた。

論文記載に関する訂正の指摘の他, 口頭試問が行われた。口頭試問の内容は, 1) 各実験系に対するデキサメタゾンの効果に影響する因子および機構, 2) IGF-1 と PAPP-A の関係等であった。

以上より, 本研究で得られた結果は, 歯科医学の進歩発展に貢献するところ大であり, 学位授与に値するものと判定した。