

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09620

研究課題名(和文) BMP9を用いた歯周組織細胞の分化制御メカニズムの解明と新規歯周再生療法への展開

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism that controls the differentiation of periodontal tissue cells by using BMP9 and its application to novel periodontal regenerative therapy

研究代表者

中村 利明 (Nakamura, Toshiaki)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：60381183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究より下記が示された。(1)骨芽細胞においてBMP-9は直接的にGSK3 のリン酸化を誘導すること(2)Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) はヒト歯根膜由来線維芽細胞(hPDLFs)においてBMP-9誘導性骨芽細胞様分化を促進すること(3)炎症環境下(IL-1 存在下)においてhPDLFsのBMP-9誘導性骨芽細胞様分化は抑制され、これには一部Activin-Follistatin系がネガティブフィードバック機構として関与している可能性が示唆されたこと(4)ビーグル犬2壁性骨内欠損モデルにおいてBMP-9の歯周組織再生傾向が認められたこと

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、BMP-9による歯周組織細胞の分化制御メカニズムの一端が示された。BMP-9は結合する受容体やシグナル伝達経路、抑制機構などにおいてBMP-2と異なる特徴を多く持ちながら、強力な骨芽細胞への分化能、骨誘導能を有している。このことからBMP-9はBMP-2と比較してその投与量を低減することによりコスト面や安全性という観点から大きな利点を有していると考えられ、BMP-9の臨床応用に向けたトランスレーショナルリサーチを今後さらに推進していく必要があると考えている。

研究成果の概要(英文)：(1) BMP-9 directly induces GSK3 phosphorylation in osteoblasts (2) Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces BMP-9-induced osteoblast-like differentiation in human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs) (3) BMP-9-induced osteoblast-like differentiation of hPDLFs was suppressed in an inflammatory environment (in the presence of IL-1 ), and the activin A-follistatin system may function as a negative feedback mechanism for BMP-9 in hPDLFs. (4) In two-wall intrabony defects model using beagle dogs, a tendency of periodontal tissue regeneration by BMP-9 was observed.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 BMP-9

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病や他の口腔内疾患, 外傷などにより歯周・顎骨組織が破壊・喪失すると咀嚼・発音・審美などに障害が発生し, 著しいQOLの低下を招く. そのため, これら失われた歯周・顎骨組織の再生療法として, 近年, 骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)やiPS細胞を用いた細胞移植療法が話題の中心であり, 将来的な応用が期待されている. しかし, 骨・歯周組織再生分野においてはCorre, P<sup>(1)</sup>らや, Chen, FM<sup>(2)</sup>らの報告より, 既存の治療法に対する治療成績・費用対効果などの面で優位性を確立するまでには至っていない. 歯科の日常臨床で対応すべき, 小規模の組織欠損に対しては, 安全性・簡便性・費用対効果という面でnon-cell basedな再生療法が中心的役割を果たすと考えられる. そのため安全かつ適応症を拡大すると共に, より予知性の向上を行い発展させるべく, non cell-basedな再生療法への新規成長因子としてBone morphogenetic protein-9(BMP-9)に着目した. BMP-9(別名GDF-2)はBMP-2やBMP-7とともに骨形成性のBMPに分類されており, 肝細胞増殖作用, 脂質代謝, 酵素誘導作用, リンパ管形成制御作用など様々な生理活性を有している. また, BMP-9は間葉系幹細胞を骨芽細胞様に分化する能力が14のBMPsの中で特に高いことが示され<sup>(3)</sup>, 代表的なBMP antagonistであるNogginの影響を受けないなどユニークな特徴を有している. しかし, これまでBMP-9の歯周組織再生に関する報告は少ない.

### 2. 研究の目的

本研究では, 歯周組織由来細胞のBMP-9による分化制御機構の解明と, in vivoでの歯周組織再生の検証を目的としている.

### 3. 研究の方法

#### (1) BMP-9の骨芽細胞におけるシグナル伝達経路の解析

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1を用い, 細胞生物学的手法を用いてシグナル伝達経路を解析する.

#### (2) BMP-9のヒト歯根膜線維芽細胞(hPDLFs)における作用の解析

low intensity pulsed ultrasound(LIPUS)作用下でのBMP-9の作用を解析する.

炎症環境(IL-1存在下)がBMP-9誘導性骨芽細胞様分化に与える影響を解析する.

#### (3) ビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いたBMP-9の歯周組織再生効果の検討

ビーグル犬の下顎両側第2, 4前臼歯の近遠心部に2壁性骨欠損(5×5×5mm)を外科的に作製し, 同欠損を次の4群, 欠損のみ(OFD), 吸収性コラーゲンスポンジ(ACS)のみ, 低濃度(L-)BMP-9/ACS, 高濃度(H-)BMP-9/ACSに割り振り, 観察期間終了後, 脱灰薄切標本作製しヘマトキリンエオジン染色を行い歯周組織(セメント質, 歯槽骨, 歯根膜, 上皮)の治療像について組織学的評価と組織形態計測による歯周組織再生の評価を行う.

### 4. 研究成果

#### (1) BMP-9の骨芽細胞におけるシグナル伝達経路の解析

BMP-9はBMP-2に比べて, 早期にGSK3のリン酸化を誘導した. このGSK3のリン酸化は, タンパク合成阻害剤の前処理では抑制されなかった. また, BMP-9によるGSK3のリン酸化は, MAP kinaseの各種阻害薬では抑制されなかったが, PI3K-Akt経路の特異的阻害剤での前処置によって顕著に抑制された. また, EndoglinとGIPC1のsiRNAにおけるノックダウン下では, BMP-9によるAktおよびGSK3のリン酸化は抑制され, 同時にALPの発現誘導も著明に抑制された. 骨芽細胞のBMP-9刺激によって, 直接的に速い経過でGSK3およびAktのリン酸化が誘導されたことから, 同経路はGIPC1とEndoglinに密接に関与し, BMP-9の強力な骨芽細胞分化誘導に関与している可能性が示唆された.

#### (2) BMP-9のhPDLFsにおける作用の解析

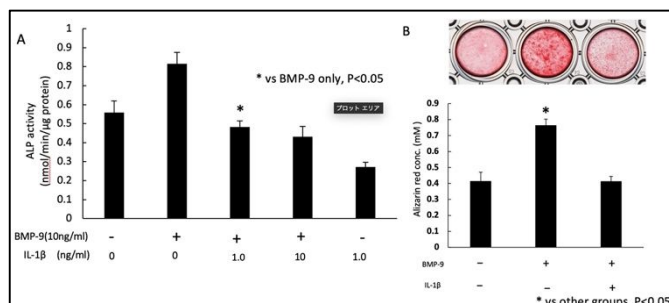
整形外科分野にて応用されているLIPUSは, hPDLFsのBMP-9誘導性骨芽細胞様分化を促進した. また, LPSが惹起する炎症状態下でのBMP-9誘導性骨芽細胞様分化の抑制をLIPUSは解除することが判明した.

炎症環境(IL-1存在下)がhPDLFsのBMP-9誘導性骨芽細胞様分化に与える影響

○BMP-9で促進されたALP活性(A), 石灰化物形成(B)はIL-1の添加により抑制された.

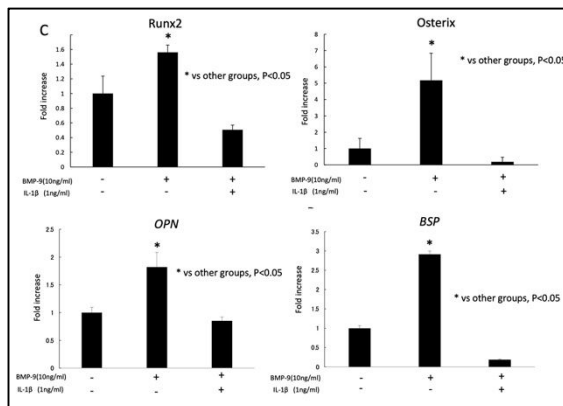
(A) 各種刺激因子存在下でhPDLFs 6日培養後のALP活性

(B) 各種刺激因子存在下でhPDLFs 12日培養後のアリザリンレッドS染色と定量結果



○BMP-9 による骨関連遺伝子(Runx2, Osterix, Osteopontin[OPN], Bone sialoprotein[BSP])の発現上昇は IL-1 により抑制された(C).

各種刺激因子存在下で hPDLFs 48 時間(Runx2, Osterix)または 12 日間(OPN, BSP)培養後の遺伝子発現

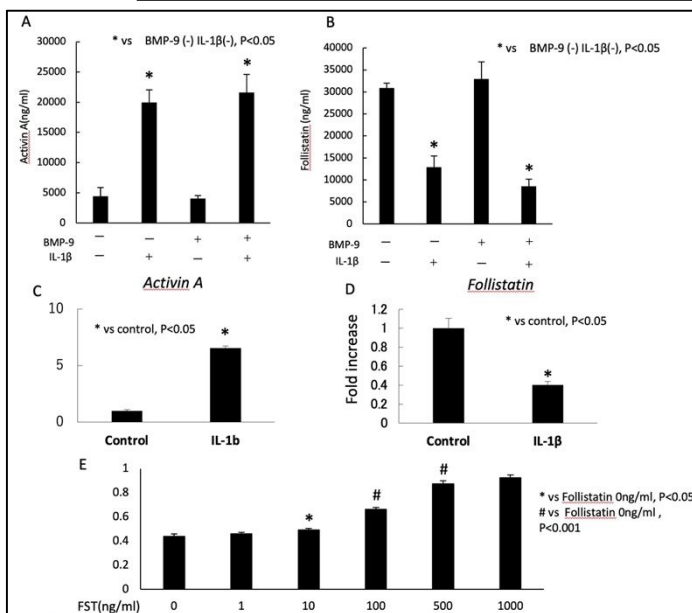


○BMP-9 を抑制する作用が報告されている Activin A(ActA)の遺伝子発現(C)及び培養上清中の ActA 濃度(A)は IL-1 刺激下において上昇し,同時に ActA を阻害する Follistatin (FST)の遺伝子(D)および蛋白濃度(B)は減少した. また, BMP-9 と IL-1 の共刺激下では, 外因性に FST を添加することで ALP 活性が上昇した(E).

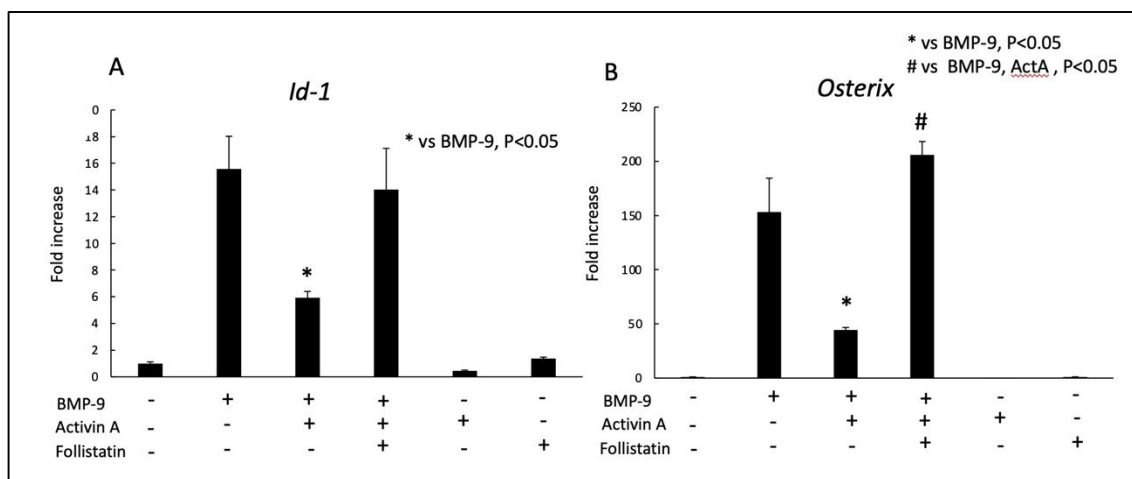
(A,B)各種刺激因子存在下で hPDLFs 3 日間(A)または 6 日間(B)培養後の培養上清中の ELISA による ActA, FST 蛋白濃度.

(C,D) 各種刺激因子存在下で hPDLFs 3 日間培養後の ActA(C), FST(D)の遺伝子発現

(E) BMP-9 と IL-1 の共刺激下で hPDLFs 6 日間培養後の ALP 活性に与える FST の影響



○hPDLFs において BMP-9 により誘導された Id-1(A), Osterix(B)遺伝子の発現は, 外因性に添加した ActA により抑制され,さらに FST を外因性に添加することによりその抑制は解除された.



これらより hPDLFs において IL-1 は, 一部 ActA を介することにより BMP-9 が誘導する骨芽細胞様分化を抑制しており, ActA-FST 機構は BMP-9 の制御機構として機能している可能性が示唆された.

(3)ビーグル犬 2 壁性歯周組織欠損モデルを用いた BMP-9 の歯周組織再生効果の検討

ビーグル犬 4 頭を用い, OFD, ACS, L-BMP-9/ACS, H-BMP-9/ACS 各群を術後 8 週にて評価を行った. 観察期間を通じて有害事象は認められず, 歯根吸収またはアンキローシスは認められなかった. また, L および H-BMP-9/ACS 群は, OFD, ACS 群と比較して新生骨, 新生セメント質, 新付着量共に増加傾向が認められた. 現在, さらに実験頭数を追加して検討している.

これら研究成果(1)-(3)より歯周組織を構成する歯根膜・骨における BMP-9 の分子制御メカニズムの一部が明らかとなり, また in vivo において歯周組織再生の可能性が示唆された.

<引用文献>

- (1) Corre, P., et al. Acta Biomaterialia, 26(C), 306-317, 2015.
- (2) Chen, FM., et al. Stem Cell Res Ther, 7, 1-11, 2016.
- (3) Cheng, H., et al. J Bone and Joint Surg, 85-A(8), 1544-1552, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Joji Kusuyama, Toshiaki Nakamura, Tomokazu Ohnishi, Brent G. Albertson, Yukari Ebe, Nahoko Eiraku, Kazuyuki Noguchi and Tetsuya Matsuguchi	4. 巻 120
2. 論文標題 Low intensity pulsed ultrasound promotes bone-morphogenetic protein-9-induced osteogenesis and suppresses inhibitory effects of inflammatory cytokines on cellular responses through Rho-associated kinase 1 in human periodontal ligament-derived fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 14657-14669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.28727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 中村利明, 白方良典, 篠原敬哉, 野口和行	4. 巻 61(1)
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein-9 (BMP-9)の歯周・骨組織再生療法への応用の可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯周病学会会誌	6. 最初と最後の頁 9-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2329/perio.61.9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yukari Ebe, Toshiaki Nakamura, Kozue Hasegawa Nakamura, Kazuyuki Noguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of interleukin 1 on bone morphogenetic protein 9 induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eos.12792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榮樂 菜保子, 千葉 紀香, 大西 智和, 中村 利明, 松口 徹也, 野口 和行
2. 発表標題 BMP9のClass1 PI3K-Akt経路を介した直接的な骨芽細胞分化誘導
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榮樂 菜保子、中村 利明、野口 和行、松口 徹也
2. 発表標題 骨芽細胞分化におけるBMP-9の特異的シグナル伝達経路の解明
3. 学会等名 日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榮樂 菜保子、中村 利明、野口 和行、松口 徹也
2. 発表標題 BMP9のWnt非依存的Gsk3 / -cateninシグナル伝達経路を介した骨芽細胞分化
3. 学会等名 平成30年度 日本歯周病学会九州五大学 日本臨床歯周病学会九州支部 合同研修会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長谷川 梢 (中村梢)  (Hasegawa Kozue)  (00404492)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	
研究分担者	白方 良典  (Shirakata Yoshinori)  (60359982)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授   (17701)	
研究分担者	江部 由佳梨  (Ebe Yukari)  (30790266)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・歯科衛生士   (17701)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------