

学位研究紹介

Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) の機能とその制御機構に関する研究 Functions and signaling mechanism of Growth/differentiation factor-5.

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座 小児口腔科学
飯澤 二葉子
Division of Pediatric Dentistry
Department of Oral Health Science
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
Futabako Iizawa

【目 的】

歯根膜は靭帯組織の一種であるが、外傷や歯周病等で失ってしまうと、再生が難しい組織である。歯根膜線維芽細胞を含む靭帯、腱細胞は間葉細胞由来の細胞である。他の間葉細胞由来の細胞には骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞などがあり、近年、これらの細胞特異的な分化誘導遺伝子やマーカー遺伝子が解明されつつあるが、靭帯細胞、腱細胞については特異的遺伝子が不明であり、発育や制御に関する分子メカニズムは明らかでない。効果的な治療法を確立する上で、細胞内での機能制御機構を解明することが必要だが、細胞株が樹立されておらず、あまり研究が進んでいない状態であった。歯根膜についても多くの研究が行われてきたが、複数の異なる性格を持つ細胞成分が含まれるため、歯根膜の特性の主体となる細胞がはっきりせず、統一した見解が得られていない。歯根膜は、硬組織に挟まれ咬合力に曝されているにもかかわらず、一定の厚みを保っていることから、靭帯組織にはosteoblasticな分化を抑制する等、独特の制御機構が存在する可能性がある。近年、細胞機能制御学分野にて樹立されたマウス歯根膜線維芽細胞株PDL-L2は、BMP-2など強力な外因性刺激が加わると石灰化し得るが、通常は石灰化抑制機構が働くため骨芽細胞の分化段階の初期にとどまっている細胞と考えることができることから、歯根膜の特性と合致した細胞株であり、靭帯細胞の研究モデルとして適していると考えられる。この制御メカニズムを解明していくことを目的とし、靭帯や腱において特有の機能をもつと考えられるGrowth differentiation factor-5(GDF-5)に着目した。GDF-5はBMPファミリーに

属するGrowth factorである。GDF-5も含めBMPは、骨の発生や成長などに関与しているが、近年、GDF-5を異所的移植することで、靭帯や腱様の組織形成が誘導される等、GDF-5が靭帯や腱の発育や成熟に関与する可能性を示唆する報告がされている。この研究の目的は、PDL-L2を用いてGDF-5の作用機序を調査することで、靭帯細胞有の機能制御機構の一端を解明することである。

【方 法】

In vitroにおけるGDF-5発現状態の調査には、PDL-L2および各種培養細胞から抽出したTotal RNAを使用し、RT-PCRを行った。In vivoでの発現状態はマウス歯周組織とアキレス腱を使用したin situ hybridizationにより調査した。発色にはNBT/BICP、核染色にメチルグリーンを使用した。石灰化の進行とGDF-5の発現量の変化の関係についての調査のために、石灰化促進培地で0～30日間PDL-L2と骨芽細胞系細胞株MC3T3-E1を培養し、RT-PCRにてGDF-5、各種骨マーカー遺伝子の発現変化を調査した。また、alizarin-red 染色により石灰化基質形成状態を調査した。recombinant GDF-5、BMP-2添加したものについても同様の調査を行った。PDL-L2、MC3T3-E1における各種TGF Type I、IIレセプターの発現状態についてもRT-PCR Southern hybridizationで比較した。

【結果と考察】

In vitroにおいてGDF-5はアキレス腱、C3H10T1/2、PDL-L2に強く発現していた。MC3T3-E1は、未分化な状態では発現が強く、分化の進行に伴い弱くなった。(図1) In vivoでGDF-5は歯根膜線維芽細胞と腱細胞に強く発現しており、骨芽細胞とセメント芽細胞では弱い発現のみ認められた。(図2) この結果から、石灰化が弱い細胞にGDF-5が強く発現していると考えられる。次に、MC3T3-E1とPDL-L2を用い、分化に伴うGDF-5の発現変化を調査したところ、GDF-5は、骨芽細胞の石灰化の進行に伴い減少した。PDL-L2はosteoblasticな分化、石灰化が起こらず、GDF-5の発現が高い状態であった。(図3) このことから、通常、骨芽細胞分化後期にGDF-5はほとんど作用していないと考えられる。GDF-5発現が強い歯根膜線維芽細胞では、骨誘導活性以外の働きをしていると考えられる。MC3T3-E1とPDL-L2におけるGDF-5の骨形成誘導能の違いについて検討するために、石灰化基質形成状態を調べたところ、rmGDF-5はMC3T3-E1の石灰化基質形成を促進したが、作用はrhBMP-2に比べて弱かった。rhBMP-2はPDL-L2の石灰

化を誘導するが、rmGDF-5はしなかった。(図4) GDF-5を含めBMPsはBMPレセプターファミリーの複合体を介して、細胞内へ刺激を伝達し、SmadやMAPKを介してターゲット遺伝子の発現を行っているが、異なるリガンドでもレセプターやパスウェイを共有している部分もあり、どこに決定的な違いがあつて機能の違いが現れるのか不明な部分が多い。まず、MC3T3-E1とPDL-L2における各種レセプター発現状態を調査したところ、発現量に差があつたのはALK-1のみで、PDL-L2で認められるがMC3T3-E1ではほとんど発現していなかった。(図5)本研究において、GDF-5は靭帯、腱細胞において強く発現しているが、osteoblasticな分化が進行した細胞ほど、減少すること、MC3T3-E1においてGDF-5はBMP-2より弱い石灰化誘導能を持っているが、PDL-L2にGDF-5を添加しても石灰化が促進されないことが明らかになった。PDL-L2におけるGDF-5の独特の役割についてはわかっていないが、その作用は、GDF-5の石灰化促進機構とは別の経路でおこなっている可能性が高い。ALK-1を介した別の下流シグナリング機構を介した作用という可能性もあるが、GDF-5のALK-1への結合性については不明である。現在、詳細を解明するために、GDF-5刺激時のPDL-L2とMC3T3-E1のSmad, MAPK

pathwayにおけるリン酸化と核内移行、ALK-1を過剰発現・発現抑制したMC3T3-E1, PDL-L2へのGDF-5の作用の変化について検討中である。

本研究は、新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座細胞機能制御学分野にて行ったものである。

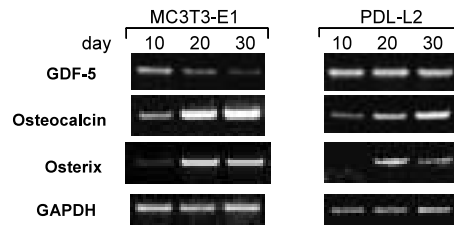


図3. 分化に伴うGDF-5と各種骨マーカー遺伝子の発現状態の変化

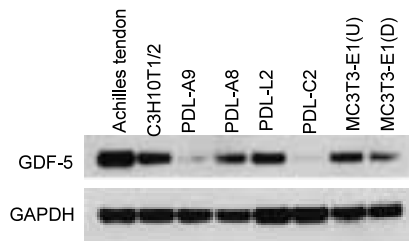
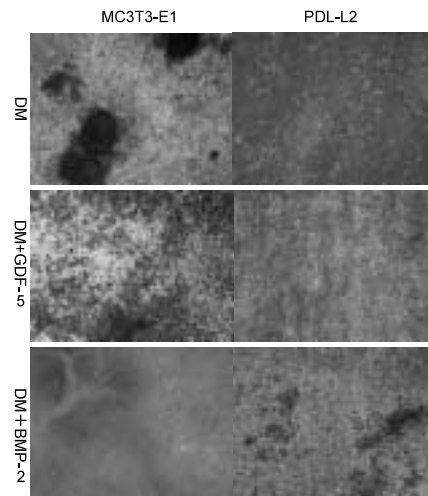


図1. 各種間葉系細胞のGDF-5mRNA発現状態



Recombinant mouse GDF-5: 240ng/ml
Recombinant human BMP-2: 200ng/ml

図4. recombinant GDF-5が細胞の石灰化に及ぼす影響

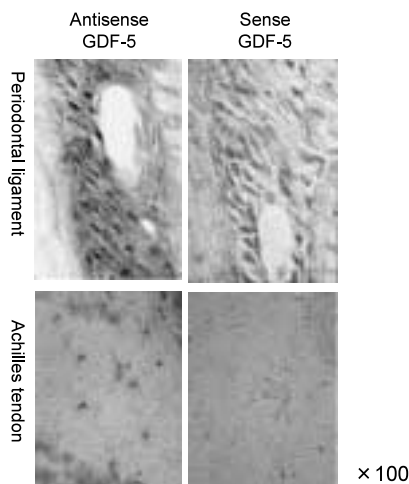


図2. In vivoにおけるGDF-5の発現状態

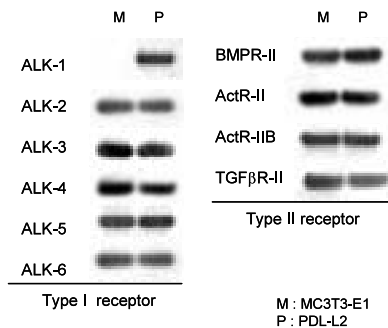


図5. MC3T3-E1,PDL-L2におけるBMPレセプターの発現状態

【参考文献】

- 1) 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.*, 115:4191-4200, 2002.
- 2) 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.*, 24: 3460-3472, 2004