

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第	号	学位申請者	江部 由佳梨
審査委員	主査	松口 徹也	学位	博士(医学・ <span style="border: 1px solid black;">歯学</span> ・学術)
	副査	佐藤 友昭	副査	南 弘之
	副査	白方 良典	副査	犬童 寛子

**Interleukin-1 $\beta$  inhibits bone morphogenetic protein-9- induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts**

(ヒト歯根膜線維芽細胞における IL-1 $\beta$  の BMP-9 誘導性骨芽細胞様分化抑制作用について)

Bone morphogenetic proteins (BMPs) は、高い骨形成能を持つことが報告されており、歯周組織再生に有用であることが示唆されている。BMP-9 は、Growth differentiation factor (GDF) -2 としても知られており、現在同定されている少なくとも 14 の BMP の中で最も高い骨形成能を持つことが報告されている (Kang Q *et al.* 2004)。また、BMP アンタゴニストとして知られる noggin の影響を受けないなど、BMP-2 とは異なる特徴を有しているが、歯周炎の病態に関与している炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  が BMP-9 へ及ぼす影響は不明である。そこで学位申請者は、ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLFs) を用い、IL-1 $\beta$  が BMP-9 誘導骨芽細胞様分化に与える影響について明らかにすることとした。

hPDLFs は、ヒト抜去歯より採取した歯根膜組織を酵素処理法にて分離培養した。添加因子はリコンビナントヒトタンパクの BMP-9、activin A (ActA)、follistatin (FST)、IL-1 $\beta$  を用いた。骨関連遺伝子発現解析はリアルタイム PCR 法にて解析し、Alkaline phosphatase (ALP) 活性および Alizarin Red S 染色にて表現型解析を行った。ActA および FST の細胞培養液上清中のタンパク濃度を ELISA 法にて測定し、IL-1 $\beta$  の ActA を産生するシグナル伝達経路の解析は、MAPK および NF- $\kappa$ B inhibitor 存在下にて、IL-1 $\beta$  刺激による ActA 遺伝子発現を解析した。その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

1. BMP-9 によって誘導された ALP 活性および石灰化物形成能、骨関連遺伝子発現は、IL-1 $\beta$  により抑制された。
2. IL-1 $\beta$  刺激下での ActA と FST の変化を解析したところ、IL-1 $\beta$  によって ActA 遺伝子発現は有意に上昇し、上清中の ActA タンパク濃度も上昇を認めた。一方 FST の遺伝子およびタンパク発現は、同様の条件下において、IL-1 $\beta$  刺激によって抑制された。
3. IL-1 $\beta$  により抑制された BMP-9 誘導性の ALP 活性は、外因性の FST により回復した。
4. 外因性の ActA により ALP 活性、*Id-1* や初期分化マーカー *SP7* の発現が抑制され、FST の添加で抑制が解除された。
5. p38、ERK および NF- $\kappa$ B のインヒビター (SB203580 10  $\mu$ M、SP600125 10  $\mu$ M、U0126 10  $\mu$ M、Crucmin 1  $\mu$ M) 添加により IL-1 $\beta$  の誘導性 ActA 遺伝子発現が抑制された。

本研究結果より、hPDLFs において IL-1 $\beta$  は BMP-9 誘導骨芽細胞様分化を抑制し、その抑制に ActA-FST 機構が部分的に関与しており、ActA の産生には MAPK (p38 および ERK1/2) 経路と NF- $\kappa$ B 経路が関与している可能性が示唆された。本研究結果は、今後 BMP-9 を用いた歯周組織再生療法の確立および BMP-9 の作用を最大限に発揮するための歯周基本治療やメンテナンスのあり方を考える上で大変重要であり、hPDLFs において BMP-9 の作用が IL-1 $\beta$  で抑制され、その機構に ActA および FST が関与していたということについて新規性があり非常に興味深い。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。