

原 著

スタチンによるヒト歯根膜細胞の  
TGF- $\beta$  と BMP-2 の発現誘導

鈴木 進 一

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室

(受付日：2005年5月6日 受理日：2005年6月29日)

Induction of TGF- $\beta$  and BMP-2 by Simvastatin in Human  
Periodontal Ligament Cells

Shinichi Suzuki

Department of Periodontics and Endodontics,  
School of Dental Medicine, Tsurumi University

(Received : May 6, 2005 Accepted : June 29, 2005)

**Abstract** : Statins, which are highly effective cholesterol-lowering drugs, induce bone morphogenetic protein (BMP)-2 expression. However, the other growth factors except for BMP-2 and the effects of statins on periodontal tissues have yet to be clarified. We studied the possibility of statins as agents effective in periodontal regeneration using luciferase reporter gene assay and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the alkaline phosphatase (ALP) activity in human periodontal ligament (HPDL) cells. Results showed that simvastatin induced BMP-2 and transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) in HPDL cells and human osteoblastic cells (NHOst). To determine whether TGF- $\beta$  1 and BMP-2 activity are related to production of the cholesterol biosynthetic pathway, HPDL cells were treated with  $10^{-6}$  M of simvastatin in the presence or absence of 1 mM of mevalonic acid (Mev). Results showed that simvastatin promotes TGF- $\beta$  1 and BMP-2 activity by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway. TGF- $\beta$  1 increased ALP activity in HPDL cells, but BMP-2 decreased it even in the presence of TGF- $\beta$  1. The reaction by simvastatin is similar to that for BMP-2 with TGF- $\beta$  1.

These *in vitro* findings suggest that simvastatin may be effective in periodontal regeneration inducing regenerative factors such as TGF- $\beta$  1 and BMP-2. Simvastatin requires more *in vivo* consideration because this study is only the first step in clinical application. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 47 : 168-177, 2005.

**Key words** : simvastatin, human periodontal ligament (HPDL) cells, transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)

**要旨** : 現在, コレステロール合成阻害薬として臨床応用されているスタチンは, 骨芽細胞において骨形成タン

---

連絡先：鈴木進一

〒230-8501 横浜市鶴見区鶴見2-1-3 鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室

Shinichi Suzuki

Department of Periodontics and Endodontics, School of Dental Medicine, Tsurumi University

2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501, Japan

E-mail suzuki-shin@tsurumi-u.ac.jp

パク質-2 (bone morphogenetic protein : BMP-2) を誘導することが知られているが、歯周組織に与える影響および BMP-2 以外の成長因子への関与については明らかにされていない。そこで本研究は、歯周組織に対するスタチンの作用を明らかにすることを目的とし、歯根膜 (HPDL) 細胞におけるスタチンの作用について Luciferase assay, RT-PCR 法, ALP assay を用いて解析した。

その結果, simvastatin 添加群において BMP-2 だけではなくトランスフォーミング増殖因子- $\beta$  1 (transforming growth factor- $\beta$  1 : TGF- $\beta$  1) の誘導も促進され, これらの成長因子の誘導は HPDL 細胞のみならず, ヒト骨芽細胞 (NHOst) においても認められた。さらに,  $10^{-6}$  M simvastatin+1 mM メバロン酸 (Mev) 添加群はコントロール群と同様であり, Mev は simvastatin によるこれらの成長因子の誘導を解除した。また, HPDL 細胞における ALP 活性は TGF- $\beta$  1 添加群で上昇し, BMP-2 添加群で低下し, TGF- $\beta$  1+BMP-2 添加群で低下した。さらに, simvastatin 添加群では ALP 活性の濃度依存的低下が認められ,  $10^{-6}$  M で TGF- $\beta$  1+BMP-2 添加群と同程度の低下を示した。

以上の *in vitro* の結果から, スタチンは歯周組織再生に有効とされる TGF- $\beta$  1 と BMP-2 の両方を誘導することが明らかとなり, 新たな歯周組織再生療法としての可能性が示された。本研究は臨床応用への第一段階であり, 今後さらにスタチンの *in vivo* での成果を検討していく必要がある。

キーワード：スタチン, ヒト歯根膜細胞, トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  1, 骨形成タンパク質-2

## 緒言

HMG-CoA (hydroxymethylglutaryl-coenzyme A) 還元酵素阻害薬であるスタチン系薬剤は, 代表的な高コレステロール血症治療薬として広く臨床に用いられている。スタチン投与により血中 LDL コレステロールが低下することで, 動脈硬化の進行が抑制され心筋梗塞や脳梗塞などの発症を抑制することが可能である。一方, 1999 年 Mundy らは, 齧歯類を用いた実験でスタチン投与により有意に骨量の増加が認められること<sup>1)</sup>を報告した。この骨形成促進作用はスタチンによる BMP-2 の発現上昇が関与し, *in vitro* と *in vivo* においてスタチンの局所投与による骨形成促進作用が報告されている<sup>1,2)</sup>。しかしながら, 歯科領域におけるスタチンに関する研究報告は少なく, 現段階ではスタチンの歯周組織に与える有用性について明らかにされていない点が多い。そこで本研究は, この骨形成促進作用に着目し, スタチンは歯周組織の再生に有用であるかについて, まず *in vitro* でスタチンの歯周組織への影響を検討することを目的としている。

現在, 歯周組織再生療法には組織再生誘導法 (guided tissue regeneration : GTR 法), エナメルマトリックステリパティブ (Emdogain<sup>®</sup> Gel : Emd-Gel), 多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma : PRP) などがあり広く歯科臨床に応用されているが, 適応症は骨欠損の形態等に依存し, 十分な骨量で歯周組織の再生を得ているとは言いがたい。そのため, 効率よくなおかつ安全に歯周組織を再生する治療方法の開発が期待されている。

これまでの研究で, Emdogain<sup>®</sup> には上皮の増殖を

抑え<sup>3)</sup>, 無細胞性セメント質を形成すること<sup>4,5)</sup>が知られている。しかしながら, Emd-Gel に含まれる生理活性物質およびその再生機構について詳細には明らかにされていない。それゆえ, 我々は Emd-Gel 中の生理活性物質についてレポーター遺伝子を用いて解析した結果, TGF- $\beta$  1 様活性物質および BMP-2 様活性物質が Emd-Gel 中に含まれること<sup>6)</sup>を明らかにした。一方, Platelet Rich Plasma (PRP) は血管新生を促す Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)<sup>7,8)</sup> および結合組織の蓄積<sup>9-11)</sup>と骨芽細胞の増殖<sup>12-15)</sup>を促す TGF- $\beta$  等を含むこと<sup>16)</sup>が明らかとなり, Emd-Gel と PRP に共通する TGF- $\beta$  が歯周組織の再生に重要な働きをしている可能性があると考えられる。

TGF- $\beta$  は歯根膜細胞および骨芽細胞の増殖を促し<sup>17,18)</sup>, 上皮細胞に対しては増殖を抑制する<sup>19)</sup>ことが報告されている。また, BMP-2 は未分化細胞に作用して骨芽細胞やセメント芽細胞への分化を促進する可能性がある<sup>20)</sup>ことが報告されている。Emd-Gel はこれらの成長因子様活性物質を含んでいることから, 歯周組織再生に有用であることが示唆される。しかしながら, Emd-Gel の適応症は骨欠損の形態等に依存しているなどの問題点を解決しておらず, また Emd-Gel を用いても十分な骨量が得られていない場合もある。骨欠損の形態は, PRP にトレフィンバーで採骨しボーンミルで細粒化した骨を混ぜて移植する方法<sup>21)</sup>を用いて治療することで解決できるかもしれないが, 外科的侵襲は大きいためできる限り侵襲の少ない処置法を考えなければならない。そのためには, 1 : 歯周組織再生に関与する成長因子を明確にし, 歯周組織に対する成長因子の作用機序を明らかにすること, 2 : 歯周組織再生に有効な生体材料を開発すること, 3 :

細胞培養施設をシステム化し普及していくこと（細胞をより積極的に欠損部に補填する目的で、生体外で細胞を培養し移植する方法があるが、コストおよび安全性の問題から現段階では広く普及していないため）等を解決していく必要がある。

これからの再生療法として、リコンビナントタンパクを応用する方法が考えられるが、今のところリコンビナントの成長因子を臨床応用することは安全性などの問題から認められていない。そこで、より安全で効果的な歯周組織再生療法を開発するために、骨形成因子 BMP を誘導するスタチン<sup>1)</sup>に着目した。スタチンを応用することにより、他部位からの採骨を必要とせずに効果的に骨を再生することが可能になれば、将来的には外科的侵襲をより少なくなおかつ効率よく歯周組織を再生できる可能性があると考えられる。また、スタチンを用いることで誘導される BMP は細胞自体から産生されるため、安全である可能性が高い。本研究は、骨形成に有用であると考えられているスタチンのヒト歯根膜 (HPDL) 細胞への影響を検討し、スタチンによって誘導される生理活性物質の作用について明らかにした。なお、今回の実験は臨床応用への第一段階であり、分子レベルでスタチンの作用を明らかにした実験である。

## 材料と方法

### 1. 細胞培養

細胞培養のための実験には鶴見大学歯学部倫理委員会の規定に基づき、鶴見大学歯学部付属病院保存科、矯正科を受診し、実験への付与に同意の得られた健全な歯周組織を有する患者の便宜抜去歯を使用した。その歯周組織から Somerman らの方法に従い<sup>22,23)</sup>、ヒト歯根膜 (HPDL) 細胞を得た。また、正常ヒト骨芽 (NH0st) 細胞は Bio Whittater 社 (Walkersville, MD) から購入した。各細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS; Asahi Technoglass, Chiba, Japan) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Pn-St; 50 U/ml ペニシリン G, 50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン; GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, USA) 含有  $\alpha$ -Modification of Eagle's Medium ( $\alpha$ -

MEM; GIBCO-BRL) にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。継代培養にはトリプシン-EDTA (0.05% トリプシン, 0.53 mM EDTA; GIBCO-BRL) を用いて継代数 5 回以下の細胞を実験に使用した。

### 2. RT-PCR

各細胞を直径 6 cm シャーレに  $1 \times 10^5$ /ml の細胞数で播種後、24 時間後に各シャーレの培養液を 10 nM 活性型ビタミン D<sub>3</sub> (CALBIOCHEM Bioscience inc, La Jolla, CA, USA) を 10% FBS および 1% Pn-St 含有  $\alpha$ -MEM に加えた培養液に交換し、simvastatin (Wako, Osaka, Japan) を添加した。スタチン系薬剤として広く実験に用いられている simvastatin を使用し、購入した粉末状の simvastatin は 100% エタノールにより  $10^{-2}$  M に溶解し、その後滅菌水で各濃度に希釈して使用した。Simvastatin 添加 6, 12, 24 時間後に RNA-zol B (TEL-TEST INC, TX, USA) を用いてトータル RNA を分離し、分離した RNA を基に Ready to go You-primed First-Strand Beads kit (Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を用いて PCR テンプレートを調整した。グリセロアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (Clontech, Palo Alto, CA, USA) をコントロールとし、simvastatin による各細胞の TGF- $\beta$ 1 と BMP-2 の遺伝子発現状態を確認するため、各種プライマー (表 1) を用いて PCR を行い特定の遺伝子を増幅した (Perkin-Elmer/GeneAmp PCR system 9600)。PCR 反応 (94°C 5 分間/94°C 30 秒間, 55°C 30 秒間, 72°C 30 秒間) を 1 サイクルとして、計 30 サイクル/72°C 10 分間) 終了後、4.5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて染色、紫外線下で PCR プロダクトを確認した。

### 3. ルシフェラーゼアッセイ

TGF- $\beta$ 1 の Assay は各細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$ /ml の細胞数で播種後、10% FBS および 1% Pn-St 含有  $\alpha$ -MEM にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、24 時間後 TGF- $\beta$ 1 に反応する PAI-1 調節領域を有するレポーター遺伝子と内部対照である SV 40 プラスミドベクターを各細胞に無血清下で Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA,

表 1 PCR プライマー

TGF- $\beta$ 1 (1067 bp)	Sense : 5'GACATGGAGCTGGTGAA 3' Antisense : 5'TCAGCTGCACTTGCAGG 3'
BMP-2 (185 bp)	Sense : 5'GTGGTGGAAAGTGGCCCACTT 3' Antisense : 5'CTGTTTGTGTTTGGCTTGACG 3'

USA) を用いて遺伝子導入して評価した。遺伝子導入開始から4時間後2.5% FBS および1% Pn-St 含有  $\alpha$ -MEM に交換し  $10^{-9}$  M~ $10^{-6}$  M simvastatin を加え、10 ng/ml リコンビナント TGF- $\beta$  1 (R & D Systems Inc, MN, USA) と 500 ng/ml リコンビナント BMP-2 (Osteogenetics GmbH, Germany) を添加した群と比較した。24時間後、Dual-Luciferase Reporter assay (Promega) により測定した。測定方法は、遺伝子導入した細胞を PBS で洗浄し、その後1×PLB (Passive Lysis Buffer: 細胞溶解液) を加え、室温で30分間振とうし、溶解を促す目的で、凍結 ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) と解凍 (室温) を2回行った。その細胞抽出液に Luciferase Assay Buffer (Luciferase Assay Substrate 添加) を加え MiniLumat LB 9506 で測定した。さらに、Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer (Stop & Glo<sup>®</sup> Substrate 添加) を加え同様に測定した。

BMP-2 の Assay は同様な条件下で細胞を培養し、BMP-2 に反応する Id1 調節領域を有するレポーター遺伝子を各細胞に遺伝子導入し、同様に実験を行った。

また、TGF- $\beta$  1 と BMP-2 の阻害実験として  $10^{-6}$  M simvastatin に  $10^{-5}$  M SB 431542<sup>24-26)</sup> (TOCRIS, MO, USA) と  $1.3 \mu\text{g/ml}$  noggin<sup>27,28)</sup> (recombinant mouse noggin/FC chimera, Genzyme-Techne, Minneapolis, MN, USA) のそれぞれを添加して調べ、さらに、simvastatin による TGF- $\beta$  1 と BMP-2 の誘導が、メバロン酸の代謝経路を介しているのかについて明らかにするために、 $10^{-6}$  M simvastatin に  $1 \text{ mM}$  メバロン酸を添加して検討した。

#### 4. アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定

各細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^5/\text{ml}$  の細胞数で播種後、10% FBS および1% Pn-St 含有  $\alpha$ -MEM にて  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  存在下で培養し、24時間後に各ウェルの培養液を  $10 \text{ nM}$  活性型ビタミン  $\text{D}_3$  (CAL-BIOCHEM Bioscience inc, La Jolla, CA, USA) を加えた培養液に交換した。 $10^{-9}$  M~ $10^{-6}$  M simvastatin 添加群は  $10 \text{ ng/ml}$  TGF- $\beta$  1,  $500 \text{ ng/ml}$  BMP-2,  $10 \text{ ng/ml}$  TGF- $\beta$  1+ $500 \text{ ng/ml}$  BMP-2 を添加した群と比較した。サンプル添加5, 10日後に各ウェルは PBS で洗浄し、 $10 \text{ mM}$  パラニトロフェニルリン酸,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $100 \text{ mM}$  2-アミノ 2-メチル 1,3 プロパンジオール塩酸緩衝液 (pH 10.0) からなる反応液  $100 \mu\text{l}$  を加えて10分間室温でインキュベーションし、反応停止に  $0.2 \text{ M}$  NaOH  $50 \mu\text{l}$  を加えた。生成されたパラニトロフェノールはマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Model 450, Hercules, CA,

USA) を用い、波長  $405 \text{ nm}$  にて吸光度を測定した。5, 10日後の ALP 活性はそれぞれのコントロール群を基準とし、simvastatin, TGF- $\beta$  1, BMP-2 による影響を相対的に評価している。本方法では1吸光度 (O.D.) あたり  $0.0027 \text{ U}$  の ALP が存在する。

#### 5. 統計学的分析

データの分析には Student-t 検定を用い、有意水準を  $p < 0.01$  とした。

## 結 果

### 1. Simvastatin による BMP-2 と TGF- $\beta$ 1 のシグナル伝達経路に対する効果

BMP-2 と TGF- $\beta$  1 のシグナル伝達経路に各々反応するレポーター遺伝子を HPDL 細胞に遺伝子導入し、simvastatin 添加24時間後における効果を調べた。その結果、TGF- $\beta$  1 のシグナル伝達経路に反応する PAI-1 プロモーター領域の転写活性は濃度依存的に上昇が認められ (図 1 a), BMP-2 のシグナル伝達経路に反応する Id1 プロモーター領域の転写活性も濃度依存的に上昇が認められた (図 1 b)。また、この効果がオートクラインまたはパラクラインによるのか、それともレセプターを介さない細胞内の作用によるのかについて明らかにするため、ALK 4, 5, 7 に作用し smad 2, 3 のリン酸化を阻害することにより TGF- $\beta$  1 の作用を抑制する SB 431542<sup>24-26)</sup> と BMP-2, 4 と結合することでその作用を抑制する noggin<sup>27,28)</sup> を用いて調べた。その結果、simvastatin のみを添加した群と比較し、simvastatin+SB 431542 添加群 (図 2 a) および simvastatin+noggin 添加群における転写活性は低下した (図 2 b)。このことから、これまでの転写活性促進効果は、BMP-2 と TGF- $\beta$  1 のそれぞれのレセプターを介していることが明らかとなった。

### 2. Simvastatin による BMP-2 と TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現

HPDL 細胞における BMP-2 と TGF- $\beta$  1 のシグナル伝達経路の活性化が mRNA の発現を介しているかについて、活性型ビタミン  $\text{D}_3$  添加による HPDL 細胞の分化誘導条件下において simvastatin を添加し、遺伝子発現を RT-PCR 法で調べた。その結果、Simvastatin 添加群において、BMP-2 と TGF- $\beta$  1 の遺伝子発現増強効果が認められた (図 3)。このことから今までのレポーター遺伝子の転写活性促進効果は、mRNA の発現を介したタンパクが合成され、それがオートクラインまたはパラクラインで作用していることが示唆された。

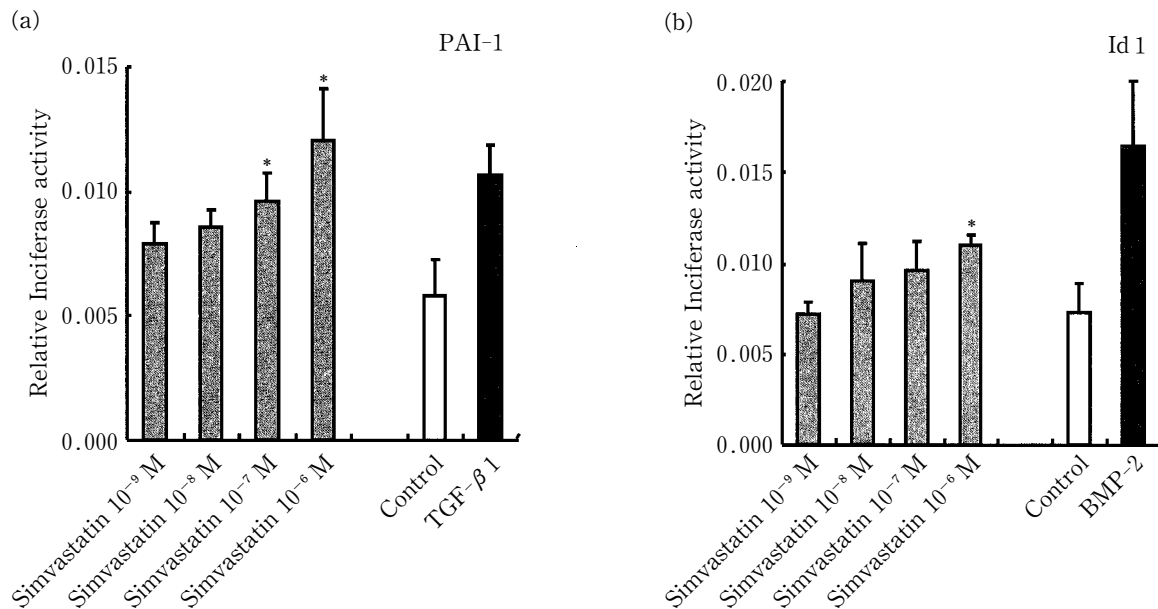


図1 レポーター遺伝子による simvastatin の TGF- $\beta$  1 (a) と BMP-2 (b) のシグナル伝達経路の転写活性  
Simvastatin は HPDL 細胞において、TGF- $\beta$  1 (a) と BMP-2 (b) の両方のレポーター遺伝子の転写活性を濃度依存的に促進する。平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=4)。\* $p$ <0.01。

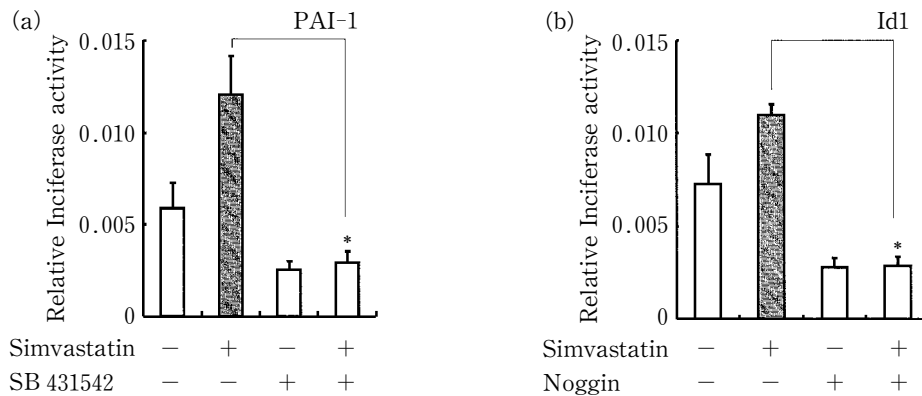


図2 SB 431542 と noggin を用いた TGF- $\beta$  1 (a) と BMP-2 (b) の阻害実験  
Simvastatin によって誘導された TGF- $\beta$  1 (a) と BMP-2 (b) のレポーター遺伝子の転写活性は、SB 431542 (a) と noggin (b) の添加によりそれぞれ抑制される。平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=4)。\* $p$ <0.01。

### 3. メバロン酸によるシグナル伝達経路への影響

Simvastatin による BMP-2 と TGF- $\beta$  1 の誘導が、コレステロール合成経路を介するものであるかを検討するためにレポーター遺伝子を各細胞に遺伝子導入し、simvastatin 非添加群、simvastatin 添加群、simvastatin+Mev 添加群、Mev 添加群における効果を検討した。その結果、simvastatin 添加群における BMP-2 と TGF- $\beta$  1 の反応は、Mev の添加により simvastatin 非添加群と同様の反応を示した (図 4

a, 4b)。このことから simvastatin による BMP-2 と TGF- $\beta$  1 の誘導は、コレステロール合成経路を介して起きていることが示唆された。

### 4. Simvastatin による ALP 活性の効果

HPDL 細胞を活性型ビタミン D<sub>3</sub> 添加による分化誘導条件下で培養し 10<sup>-9</sup>~10<sup>-6</sup> M simvastatin 添加群、BMP-2 添加群、TGF- $\beta$  1 添加群、BMP-2+TGF- $\beta$  1 添加群における 5, 10 日後の ALP 活性を測定した。コントロール群の O.D. 値は 5 日後 : 0.211, 10

日後:0.509であり,5,10日後のALP活性はそれぞれのコントロール群を基準として補正している。5,10日後ともにTGF- $\beta$ 1添加群で活性は上昇し,BMP-2添加群で低下し,TGF- $\beta$ 1+BMP-2添加群で低下した。さらに,simvastatin添加群ではALP活性の濃度依存的低下が認められ, $10^{-6}$ MでTGF- $\beta$ 1+BMP-2添加群と同程度の低下を示した(図5a,5b)。これらは,simvastatin添加群とTGF- $\beta$ 1+BMP-2添加群は同じ挙動を示していることを表している。

## 考 察

コレステロールの合成阻害薬であるスタチンは,肝臓でのコレステロール合成を抑制することにより血液中のコレステロールを低下させ<sup>29,30</sup>,動脈硬化に伴う心筋梗塞や脳卒中などの発症を抑制する治療薬として臨床応用されている。また,この作用以外に抗炎症作用<sup>31,32</sup>,骨形成作用<sup>33</sup>,血管新生促進作用<sup>34</sup>などが報告されている。これらの作用は歯周組織の再生に有効な作用であり,スタチンの作用をさらに解明していくことは,これからの新たな再生療法の開発にあたり重要であると思われる。我々は,スタチンの骨形成促進作用に注目し,スタチンの歯周組織への影響について検討した。スタチンはこれまでの研究で,骨芽細胞株MC3T3-E1におけるBMP-2のmRNA発現を促進し,ALP活性を上昇させ<sup>2)</sup>骨形成を促進させることが報告されている。このBMP-2の発現は,スタチンによってメバロン酸の代謝経路におけるファルネシルピロリン酸(FPP)からゲラニルゲラニルピロリ

ン酸(GGPP)への変換が阻害され,さらにその下流のRho-kinaseの不活化を介して発現が誘導されること<sup>35)</sup>が示されている。

本研究においてもこれまで報告されているようにBMP-2のシグナル伝達経路の活性化が観察されたが,それだけではなくTGF- $\beta$ 1のシグナル伝達経路も活性化されることが新たに明らかとなった。このTGF- $\beta$ 1の効果はmRNAの発現を介するかについて,simvastatin添加6,12,24時間後をRT-PCR

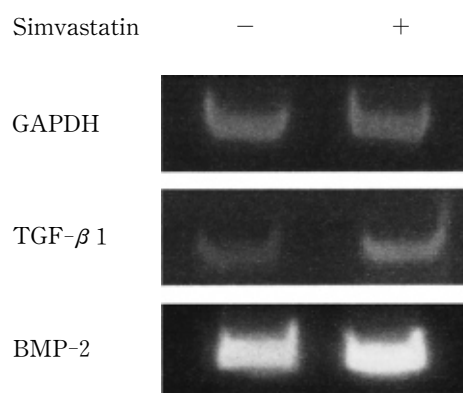


図3 SimvastatinによるTGF- $\beta$ 1とBMP-2の遺伝子発現

HPDL細胞を骨芽細胞への分化誘導条件下で培養後,トータルRNAを抽出し,GAPDH発現量で標準化したPCRテンプレートを用いてPCRを行った結果を示す。TGF- $\beta$ 1は12時間後,BMP-2は24時間後の電気泳動像を図示する。 $10^{-6}$ M simvastatin添加群にTGF- $\beta$ 1とBMP-2の遺伝子発現の増強が認められる。

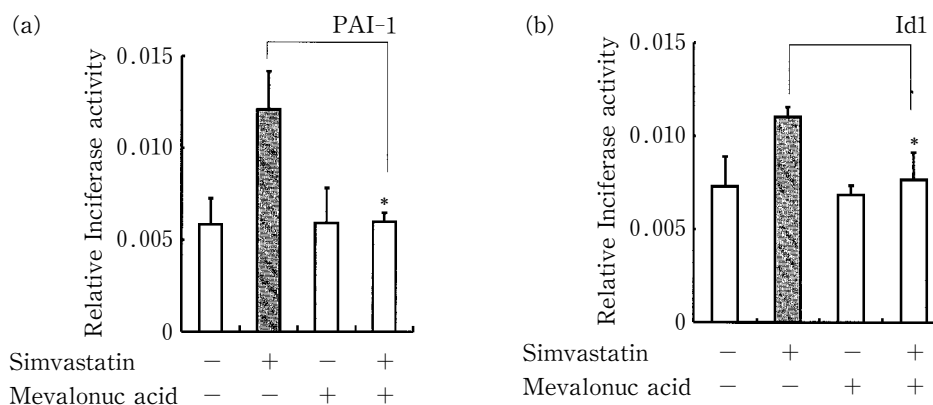


図4 Simvastatinの作用に対するメバロン酸の影響

Simvastatinによって誘導されたTGF- $\beta$ 1(a)とBMP-2(b)のレポーター遺伝子の転写活性は,メバロン酸の添加によりコントロール群と同程度まで抑制される。平均値±標準誤差(n=4)。\* $p$ <0.01。

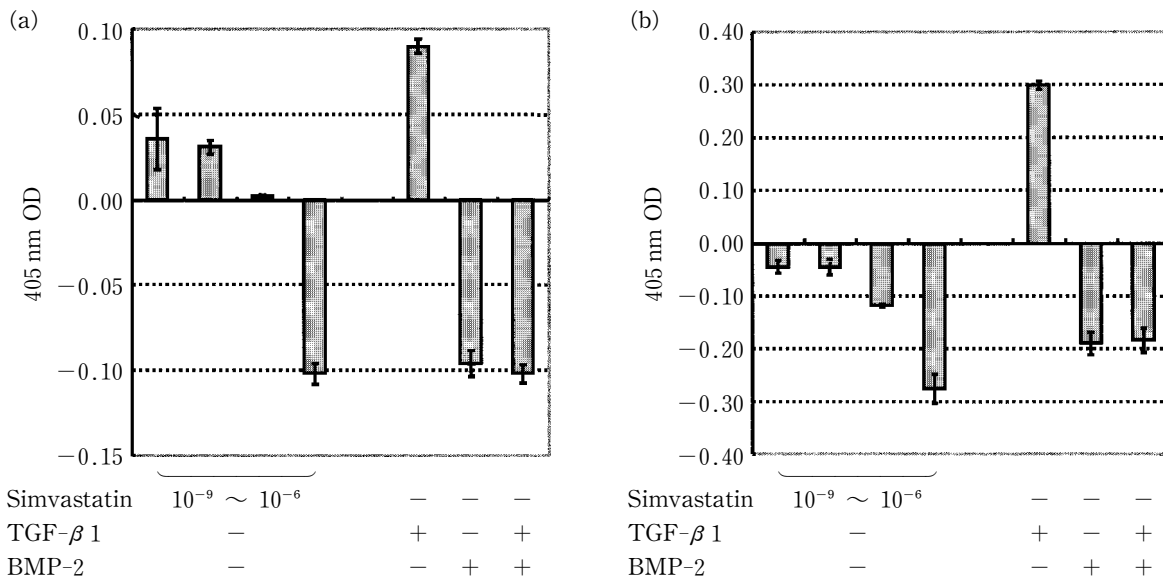


図 5 Simvastatin 添加 5 (a), 10 (b) 日後の ALP 活性への影響

5 (a), 10 (b) 日後共に HPDL 細胞における ALP 活性は, TGF- $\beta$  1 により上昇し, BMP-2 により ALP 活性は低下した。また, TGF- $\beta$  1+BMP-2 では ALP 活性の低下が認められ, 10<sup>-6</sup>M simvastatin においては TGF- $\beta$  1+BMP-2 と同様の反応を示した。平均値±標準誤差 (n=3)。

法で調べたところ, TGF- $\beta$  1 は特に simvastatin 添加 12 時間後で強い発現上昇が認められた。さらに, simvastatin のみを添加した群と simvastatin にメバロン酸を添加した群を TGF- $\beta$  1 および BMP-2 のシグナル伝達経路で比較検討した結果, simvastatin による TGF- $\beta$  1 および BMP-2 のレポーター遺伝子の転写活性はメバロン酸の添加によりコントロール群と同程度まで抑制されたことから, これらの成長因子の発現上昇がメバロン酸の合成経路の抑制過程の結果であることが確認された。また, TGF- $\beta$  1 の受容体に拮抗的に結合し TGF- $\beta$  1 の作用を阻害する SB 43154224-26 (図 2 a) と BMP-2 に結合し BMP-2 の受容体との結合を妨げる noggin<sup>27,28)</sup> (図 2 b) による阻害実験 (図 6) からも, simvastatin で誘導される活性物質は TGF- $\beta$  1 および BMP-2 である可能性が高いことが示唆された。さらに, ヒト骨芽細胞株 NHOst を用いて同様に実験を行った結果, HPDL 細胞と同様に TGF- $\beta$  1 および BMP-2 の作用を検出することができた。

ALP 活性についての simvastatin による作用をリコンビナント BMP-2, TGF- $\beta$  1 と比較検討した。その結果, TGF- $\beta$  1 の刺激により HPDL 細胞の ALP 活性は上昇し, BMP-2 では低下した。また, TGF- $\beta$  1+BMP-2 では BMP-2 と同様に ALP 活性の低下が認められ, 10<sup>-6</sup> M simvastatin の反応は TGF- $\beta$  1+BMP-2 と同様の効果を示した。しかしな

が, simvastatin 刺激による HPDL 細胞の ALP 活性は濃度により反応性が異なるが, これは simvastatin の濃度によって誘導される TGF- $\beta$  1 と BMP-2 の割合が異なることによると考えられる。また, マウスの骨芽細胞株 MC 3 T 3-E 1 を用いてリコンビナント BMP-2, TGF- $\beta$  1 に対する反応性について同様に実験を行ったが, TGF- $\beta$  1 により ALP 活性は低下し, BMP-2 では上昇を示し, HPDL 細胞とは逆の効果を示した。これらの結果は, HPDL 細胞と骨芽細胞では成長因子に対する反応性が異なることを示し, 歯根膜がセメント質と歯槽骨という硬組織間に介在しているにも関わらず石灰化を生じないのは, この反応性の違いにより制御されている可能性が考えられる。Simvastatin を骨芽細胞に作用させると, ALP 活性の上昇に伴う石灰化誘導の促進作用が報告されているが, simvastatin を歯根膜細胞に長期間作用させても ALP 活性の上昇は認められないことから, simvastatin を *in vivo* で応用してもアンキロシスを起こさずに作用することが予想される。

歯周組織再生において大切なことは, 再生部位の根面に最初に付着した細胞が歯根膜細胞であることであり, そのためには歯根膜細胞を他の細胞よりもいかに早く増殖, 遊走, 伸展させることができるかどうか重要である。この作用を持つ成長因子のひとつに TGF- $\beta$  があり, その有用性が報告されている<sup>36,37)</sup>。スタチンは歯周組織の再生に重要であると考えられる

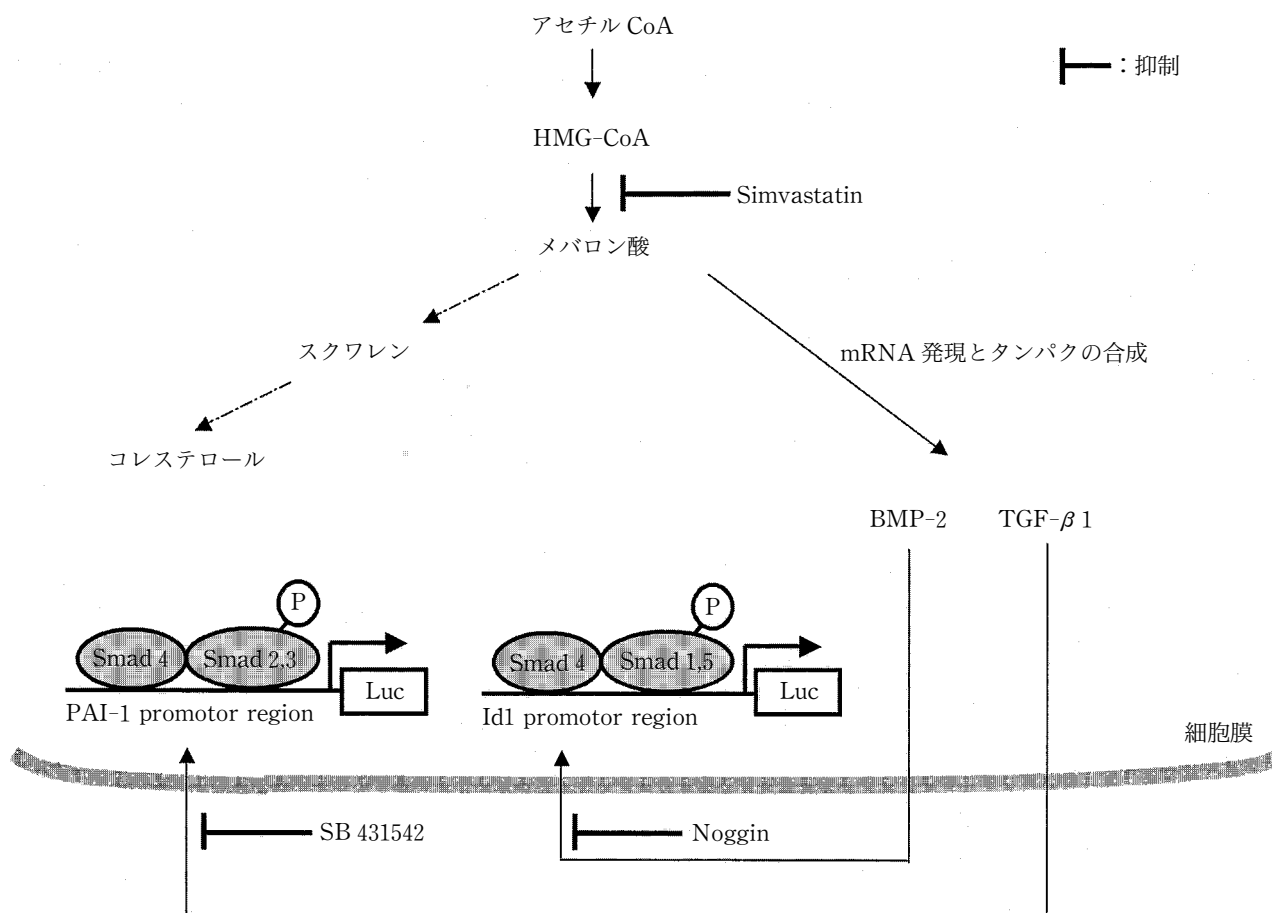


図 6 Simvastatin の作用機構と SB 431542 と noggin を用いた阻害実験の模式図

TGF- $\beta$  と BMP-2 を誘導することが明らかとなり、骨組織再生および歯周組織再生に有効である可能性が示唆された。しかしながら、本研究は臨床応用への第一段階となる *in vitro* の実験であるため、今後さらにスタチン単体、スタチン+PRP、スタチン+Emd-Gel 等の様々な組み合わせを *in vivo* で検討し、歯周組織再生に最適な条件を解明していくことが必要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なるご指導、ご校閲を賜りました本学第二歯科保存学教室新井高教授に謹んで深甚なる謝意を表するとともに、ご指導、ご校閲を賜りました本学生化学教室深江允教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に対し多くの御指導、ご助言を賜りました本学生化学教室大井田新一郎助教授に心より感謝致します。さらに研究の遂行にあたり、ご指導とご理解を頂きました本学第二歯科保存学教室五味一博助教授ならびに本学生化学教室唐木田丈夫博士に深く感謝致します。最後に本

研究に御理解と御支援を頂きました本学第二歯科保存学教室員各位ならびに本学生化学教室員各位に厚く御礼を申し上げます。

本論文の緒言は、第 46 回春季日本歯周病学会学術大会 (2004 年 5 月 21 日、鹿児島) において発表した。

なお、本研究の一部はバイオベンチャープロジェクトの補助を受け、鶴見大学歯学部ハイテクリサーチセンターにおいて実施された。

文 献

- 1) Mundy G., Garret R, Harris S, Chen J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G : Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. Science, 286 : 1946-1949, 1999.
- 2) Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N : Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC 3 T 3-E 1 cells. Biochem Biophys Res Commun, 280 : 874-877, 2001.



- 3) Kawase T, Okuda K, Momose M, Kato Y, Yoshie H, Burns DM : Enamel matrix derivative (EM-DOGAIN®) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad 2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodontal Res*, 36 : 367-376, 2001.
- 4) Hammarström L : Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 24 : 658-668, 1997.
- 5) Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S : Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, 24 : 669-677, 1997.
- 6) Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, Katagiri T, Oida S : Emdogain® Gel Stimulates Signal Transduction of BMP and TGF- $\beta$ . *J Dent Res*, 84 : 510-514, 2005.
- 7) Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF : The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46 : 155-169, 1986.
- 8) Stiles CD : The molecular biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 33 : 653-655, 1983.
- 9) Ignatz RA, Massague J : Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 261 : 4337-4345, 1986.
- 10) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al : Transforming growth factor type  $\beta$  : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83 : 4167-4171, 1986.
- 11) Wrana JL, Sodek J, Ber RL, Bellows CG : The effects of platelet-derived transforming growth factor  $\beta$  on normal human diploid gingival fibroblasts. *Eur J Biochem*, 159 : 69-76, 1986.
- 12) Ibbotson KJ, Orcutt CM, Anglin AM, D'Souza SM : Effects of transforming growth factors  $\beta$  1 and  $\beta$  2 on a mouse clonal, osteoblastlike cell line MC 3 T 3-E 1. *J Bone Miner Res*, 4 : 37-45, 1989.
- 13) Centrella M, McCarthy TL, Canalis E : Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem*, 262 : 2869-2874, 1987.
- 14) Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) *in vitro*. *J Cell Biol*, 105 : 457-463, 1987.
- 15) Centrella M, McCarthy TL, Canalis E : Human platelet-derived transforming growth factor- $\beta$  stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology*, 119 : 2306-2312, 1986.
- 16) Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells *in vitro*. *J Periodontol*, 74 : 849-857, 2003.
- 17) Hoang AM, Oates TW, Cochran DL : *In vitro* wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 71 : 1270-1277, 2000.
- 18) Schwartz Z, Carnes DL Jr, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD : Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2 T 9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG 63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol*, 71 : 1287-1296, 2000.
- 19) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM : Anti-TGF- $\beta$  antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21 WAF 1/cip 1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontal Res*, 37 : 255-262, 2002.
- 20) Saito E, Saito A, Kawanami M : Favorable healing following space creation in rhBMP-2-induced periodontal regeneration of horizontal circumferential defects in dogs with experimental periodontitis. *J Periodontol*, 74 : 1808-1815, 2003.
- 21) Schmitz JP, Hollinger JO : The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*, 59 : 1119-1121, 2001.
- 22) Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. *J Dent Res*, 67 : 66-70, 1988.
- 23) Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H : Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol*, 66 : 1025-1031, 1995.
- 24) Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, Reese ED, Herbstreith MH, Laping NJ, Friedman HS, Bigner DD, Wang XF, Rich JN : SB-431542, a small molecule transforming growth factor- $\beta$ -receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol*

- Cancer Ther, 3 : 737-745, 2004.
- 25) Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS : SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK 4, ALK 5, and ALK 7. *Mol Pharmacol*, 62 : 65-74, 2002.
- 26) Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan JF, Olson BA : Inhibition of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- $\beta$  type I receptor kinase activity : SB-431542. *Mol Pharmacol*, 62 : 58-64, 2002.
- 27) Chang C, Hemmati-Brivanlou A : Xenopus GDF 6, a new antagonist of noggin and a partner of BMPs. *Development*, 126 : 3347-3357, 1999.
- 28) Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM : The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 86 : 599-606, 1996.
- 29) Endo A : The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*, 33 : 1569-1582, 1992.
- 30) Goldstein JL, Brown MS : Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343 : 425-430, 1990.
- 31) Ni W, Egashira K, Kataoka C, Kitamoto S, Koyanagi M, Inoue S, Takeshita A : Antiinflammatory and antiarteriosclerotic actions of HMG-CoA reductase inhibitors in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circ Res*. 89 : 415-421, 2001.
- 32) Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, Gotto AM Jr ; Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators : Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med*, 344 : 1959-1965, 2001.
- 33) Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F : Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med*, 6 : 1399-1402, 2000.
- 34) Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefler DJ, Sessa WC, Walsh K : The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*, 6 : 1004-1010, 2000.
- 35) Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y, Takayanagi R : Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 287 : 337-342, 2001.
- 36) Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE, Vrotsos IA : Proliferative effect of growth factors TGF- $\beta$  1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontol*, 5 : 63-70, 2003.
- 37) 長野孝俊 : ヒト培養歯根膜 (HPDL) 細胞におけるブタエナメルタンパク分画画分の石灰化誘導能に関する影響. *日歯周誌*, 45 : 384-393, 2003.