

GDNFがヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について

山本, 直秀
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/26330>

出版情報：九州大学, 2012, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

GDNF がヒト歯根膜細胞に及ぼす 影響について

2013 年

山本 直秀

九州大学大学院歯学研究院

口腔機能修復学講座

歯科保存学研究分野

指導教員 赤峰 昭文 教授

目次

1	要旨	1
2	諸言	2
3	材料と方法	5
3-1.	細胞培養	5
3-2.	タンパク発現解析	5
3-2-1.	ラット歯根膜傷害モデルにおける免疫組織化学的染色	
3-2-2.	ヒト歯根膜細胞における免疫細胞化学的染色	
3-2-3.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法	
3-3.	reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法による遺伝子発現解析	6
3-3-1.	半定量的 RT-PCR 法による GDNF レセプターの遺伝子発現解析	
3-3-2.	定量的 RT-PCR 法	
3-4.	HPDLC に対する GDNF の影響	7
3-4-1.	GDNF 刺激による BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現解析	
3-4-2.	走化性試験	
3-4-3.	細胞遊走試験 (スクラッチ試験)	
3-5.	PC12 を用いた神経細胞分化誘導実験	8
3-5-1.	HPDLC 由来の GDNF 含有培地の回収	
3-5-2.	PC12 の培養	
3-6.	統計学的分析	9
4	結果	12
4-1.	ラット歯根膜傷害モデルならびにヒト歯根膜細胞における GDNF の発現	
4-2.	GDNF レセプターの発現	
4-3.	炎症性サイトカインが HPDLCs の GDNF の発現に及ぼす影響	

4-4. GDNF が HPDLCs の走化性に及ぼす影響

4-5. GDNF が BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現に及ぼす影響

4-6. HPDLCs 由来の GDNF が PC12 の神経細胞様分化へ及ぼす影響

5	考察	23
6	総括	26
7	謝辞	27
8	参考文献	28

本研究の一部は

Yamamoto N, Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Kono K, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A.

Expression and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on periodontal ligament cells.

Journal of Clinical Periodontology に投稿し、第 39 卷 6 号に掲載受諾済みである。

1.要旨

Glial Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) は種々の細胞に対して運動能や増殖の促進、組織修復の促進、そして形態発生の誘導など生体に対し多様な生物活性を持つことが知られている。しかしながら現在のところ、歯根膜細胞に対する GDNF の作用について十分な解明はなされていない。そこで本研究では、(1) 歯根膜組織の創傷部位における GDNF の発現および影響の解明、ならびに(2) 歯根膜細胞 (HPDLC) 由来の GDNF が神経細胞分化に及ぼす影響の解明を目的とした。傷害を与えたラット歯根周囲組織での創部近傍の歯根膜細胞は抗 GDNF 抗体に対して強い陽性反応を示した。そこで HPDLC を interleukin-1 beta (IL-1 β) または tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) にて刺激した結果、GDNF の発現が有意に上昇することが明らかとなった。また GDNF で刺激した HPDLC では bone sialo-protein (BSP) ならびに fibronectin の mRNA の有意な発現上昇を認め、さらに約 2~3 倍に走化性が促進した。次に、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞 (PC12) を用いて、GDNF が神経細胞分化に与える影響について検討した。その結果、GDNF は PC12 の神経細胞分化を促進した。また、IL-1 β にて刺激した HPDLC の培養上清を用いて培養した PC12 は神経細胞分化が促進し、この反応は GDNF 中和抗体により抑制された。

本研究の結果から、GDNF は歯根膜組織の創傷治癒に関与する可能性が示唆された。また IL-1 β 刺激により産生が促された歯根膜細胞由来の GDNF は、神経再生に働く可能性が示唆された。

2.緒言

歯根膜 (PDL; periodontal ligament) は、歯槽骨とセメント質の間に介在する密な結合組織であり (Beertsen et al. 2000)、感覚受容や周囲の細胞への栄養供給において重要な役割を果たすと考えられているが、重度の齲蝕や歯周炎などにより喪失することがあり、歯の喪失と密接に関連することが知られている。過去の報告より歯根膜組織において線維芽細胞、骨芽細胞ならびにセメント芽細胞への分化能を有する未分化な細胞が存在し (Ten et al. 1997)、歯根膜組織の再生に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。(Fujii et al. 2008, Seo et al. 2004)。また近年、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Takeda et al. 2005)、basic fibroblast growth factor (bFGF) (Murakami et al. 2003) ならびに transforming growth factor- β 1 (TGF β -1) (Raja et al. 2009) などの成長因子や栄養因子が歯根膜の再生を促すということが報告されている。

Glial Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) は栄養因子のひとつで、レセプターである GDNF family receptor alpha 1 (GFR α 1) と neural cell adhesion molecule (NCAM) (GFR α 1/NCAM) または GFR α 1 と re-arranged during transformation (RET) (GFR α 1/RET) を介して、種々の組織や細胞に対して運動能や増殖そして組織修復促進、また形態発生の誘導など生体に対し多様な生物活性を持つことが知られている (Airaksinen & Saarma 2002)。GFR α 1/NCAM を介した GDNF シグナルは、Fyn kinase/focal adhesion kinase 経路の活性化に関与し、神経形成および細胞遊走を促す (Paratcha et al. 2003)。もう一つのレセプターである GFR α 1/RET を介した GDNF シグナルは、Ras/mitogen-activated protein 経路や phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B 経路を活性化し、細胞の分化ならびに遊走に関与することが知られている (Besset et al. 2000)。現在のところ、ヒト歯根膜細胞 (HPDLCs; human PDL cells) における GDNF レセプターの発現について解析した報告はなされていない。

これまでに GDNF は、正常組織の発達や組織修復に関与することが報告されている。

その役割として、神経細胞の分化促進 (Lin et al. 1993)、腎臓の発生過程における尿管芽の伸長の誘導 (Airaksinen & Saarma 2002)、ならびに精子幹細胞の分化の制御 (Sariola & Saarma 2003) が知られている。

また GDNF は、integrin α V β 3 を介したヒト軟骨肉腫細胞の遊走を促し (Su et al. 2009)、神経芽細胞の走化性因子としての役割についても報告されている (Paratcha et al. 2006)。細胞接着ならびに細胞遊走は、創傷治癒、胚発生および腫瘍細胞の転移など多様な生物学的過程において中心的役割を果たす (Lauffenburger & Horwitz 1996)。細胞と細胞外基質間の接着は細胞遊走に不可欠であり (Huttenlocher et al. 1995)、その多くがレセプターである integrin によって介されている (Barczyk et al. 2010)。また integrin を介した細胞運動は特定の integrin ならびに細胞外基質によって生じると考えられている (Barczyk et al. 2010)。integrin は、18 種の α ならびに 8 種の β サブユニットが報告されており、24 種の異なる $\alpha\beta$ ヘテロ二量体を形成する膜貫通型レセプターであることが知られている (Barczyk et al. 2010, Humphries et al. 2006)。細胞内において integrin は、細胞骨格およびシグナルタンパクと結合しており、これらを介して細胞運動の調節に寄与している (Kim et al. 2011)。integrin の結合部位のうち arginine-glycine-aspartic acid (RGD) 配列は、integrin α V β 1、 α V β 3、 α V β 5、 α I**b β 3、 α 5 β 1 により認識され、結合することが報告されている (Humphries et al. 2006)。この RGD 配列は、bone sialo-protein (BSP)、fibronectin ならびに osteopontin といった特定の細胞外基質タンパクに含まれている (Barczyk et al. 2010)。**

さらに GDNF は、*in vivo* において炎症性サイトカインの発現を抑制し、実験的炎症性腸炎の改善を促す働きを有している (Zhang et al. 2010)。また星状細胞において、interleukin-1 beta (IL-1 β) ならびに tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) により発現が誘導された GDNF は、神経保護作用を示した (Appel et al. 1997, Kuno et al. 2006)。growth-associated protein-43 (Gap-43) は、神経細胞の成長円錐に発現し、神経形成ならびに再生に関与する因子と考えられている (Chen et al. 2010)。ラット坐骨神経切断部位に投与した GDNF は、Gap-43 の発現を上昇し、さらに神経再生を促進した (Chen et al.

2001)。これらの報告から、GDNFは組織修復ならびに神経再生に寄与する働きをもつと考えられる。しかしながらこれまでGDNFが、HPDLCsに与える影響について解析した報告はなされていない。

そこで本研究では、(1) 歯根膜組織の創傷部位におけるGDNFの発現および影響の解明、ならびに(2) HPDLC由来のGDNFが神経細胞分化に及ぼす影響について解析することを目的とした。

3.材料と方法

3-1. 細胞培養

HPDLC は、抜歯を目的として九州大学病院口腔外科を受診した 3 名の患者 (HPDLC-2G: 34 歳女性、HPDLC-3D: 23 歳女性、HPLC-3M: 26 歳男性) から同意を得た後、第一小臼歯または第三大臼歯を抜歯し、これまでの報告を参考に単離した (Fujii et al. 2006)。細胞は、37 °C、5 % CO₂、湿度 100 % 条件下で、50 µg/mL ストレプトマイシンならびに 50 U/mL ペニシリン (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 含有の alpha-minimum essential medium (α-MEM; Gibco-BRL) に 5 % ウシ胎児血清 (FBS; Gibco-BRL) を添加した培地で培養した。細胞がコンフルエントになる前に、0.05 % トリプシン、および 0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) 含有の phosphate-buffered saline (PBS; Gibco-BRL) を用いて細胞を剥離し、同様の条件下で 4~6 継代培養したものを本実験に用いた。またヒト乳腺癌細胞株 (MCF7; Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、HPDLC と同条件にて培養し、RET の遺伝子発現の陽性コントロールとして用いた (Boulay et al. 2008)。ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞 (PC12; Riken Cell Bank) は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-BRL) に 10%FBS ならびに 10%ウマ血清 (HS; Gibco-BRL) を添加した培地中にて培養した。全ての実験は九州大学大学院歯学研究院生命倫理委員会の承認の下で行った。

3-2. タンパク発現解析

3-2-1. ラット歯根膜組織傷害モデルにおける免疫組織化学的染色

0.03 % 抱水クロラール (13ml/kg; Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を 5 週齢の雄性 SD ラット (Kyudo Co. Ltd, Saga, Japan) の腹腔内に投与し、麻酔下にて左側上顎第一臼歯近心口蓋側の歯根および周囲組織に、直径 2 mm の歯科用ラウンドバー (MANI, Inc., Tochigi, Japan) にて傷害を与えた。右側は非傷害側とした。ラットは傷害を与えてから

72 時間後に、4 % paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) にて灌流固定し、上顎骨を摘出した。摘出した試料は 10 % EDTA (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) で 2 週間の脱灰後、OCT コンパウンド (Sakura Finetek, Inc., Torrance, CA) に包埋し、5 μ m 薄切凍結切片を作製した。免疫組織化学的染色は、これまでの報告を参考に行った (Monnouchi et al, 2011)。非特異的に反応するタンパクを 2 % BSA (Nakarai tesque Inc.) で blocking 後、一次抗体としてヤギ抗ラット/ヒト GDNF 抗体 (anti-GDNF, 1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) ならびにウサギ抗ラット IL-1 β 抗体 (1:100; Santa Cruz Biotechnology) を用い、二次抗体として Alexa Fluor® 568 標識抗ヤギ抗体 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA) ならびに Alexa Fluor® 488 標識抗ウサギ抗体 (1:200; Invitrogen) を用いて二重染色を行った。一次抗体を用いなかった切片を陰性コントロールとした。画像解析には Biozero digital microscope (Keyence Corporation, Osaka, Japan) を使用した。

3-2-2. ヒト歯根膜細胞における免疫細胞化学的染色

0.5 % dimethyl sulfoxide (Wako, Osaka, Japan) 含有の 4 % PFA にて固定した HPDLC-3D における GDNF および GFR α 1 のタンパク発現は、一次抗体として anti-GDNF (1:100; Santa Cruz Biotechnology) ならびにウサギ抗ヒト GFR α 1 抗体 (1:100; Santa Cruz Biotechnology) を用いて、免疫組織化学的染色法と同様の手順で行った。

3-2-3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

HPDLC-3D ならびに-3M を 10 ng/ml の IL-1 β (PeproTech EC, London, UK) または TNF- α (PeproTech EC) にて刺激し 24 時間後において、培養上清を採取した。GDNF ELISA kit (Promega, Madison, WI) を用いて、培養上清中の GDNF のタンパク濃度を定量した。測定は Immuno Mini NJ-2300 (Microtec Co. Ltd, Chiba, Japan) を使用し、450 nm での吸光度を測定した。

3-3. reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法による遺伝子発現解析

3-3-1. 半定量的 RT-PCR 法による GDNF レセプターの遺伝子発現解析

HPDLCs の total RNA は、TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて回収した。First-strand

cDNA 合成、ならびに PCR 解析は、これまでの報告(Maeda et al. 2010, Tomokiyo et al. 2008) に準じて、Thermal Cycler Dice (Takara Bio Inc., Siga, Japan) を用いて行った。PCR 解析は、*Taq* DNA polymerase (Invitrogen) を含む反応液を加えた cDNA をそれぞれ 94 °C 5 分間加熱した後、94 °C 30 秒、各プライマーのアニーリング温度で 30 秒、72 °C 30 秒の加熱を 1 サイクルとし、cDNA の増幅を行った。反応後、PCR 産物を 1 mg/mL ethidium bromide (Invitrogen) 含有の 2 % agarose ゲル (Seakem ME; BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME) にて電気泳動を行い、遺伝子発現解析を行った。内部標準遺伝子である *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)* をコントロールとして用いた。使用したプライマーの塩基配列、各 PCR 産物の塩基対数、アニーリング温度、ならびにサイクル数を Table 1 に示す。

3-3-2. 定量的 RT-PCR 法

First-strand cDNA は、total RNA に ExScript RT Reagent kit (Takara Bio Inc.) の反応液を添加し、42 °C 15 分、次いで 99 °C 2 分加熱し、逆転写反応を行った。PCR 解析は、First-strand cDNA を SYBR Green II (Takara Bio Inc.) 含有の反応液に加え、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio Inc.) を用いて解析した。95 °C で 10 秒間加熱した後、95 °C 5 秒、60 °C 30 秒のサイクルで DNA の増幅を 40 サイクル行った。内部標準遺伝子である *human beta-actin (β -act)* または *rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* をコントロールとし、delta-delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) 値にて目的遺伝子の発現量解析を行った。使用したプライマーの塩基配列、各 PCR 産物の塩基対数、ならびにサイクル数を table 2 に示す。

3-4. HPDLC に対する GDNF の影響

3-4-1. GDNF 刺激による BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現解析

GDNF (50 ng/ml, PeproTech EC)、GDNF 中和抗体 (1 μ g/ml; GeneTex, San Antonio, TX, USA) およびマウスコントロール IgG (1 μ g/ml; Santa Cruz Biotechnology) を用いて、HPDLC-3D ならびに-3M を 3、6 および 9 時間刺激した。刺激後、total RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法にて BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現解析を行った。

3-4-2. 走化性試験

走化性試験は HPDLC-2G、-3D、-3M、セルカルチャーインサート (pore size 8 μm ; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) ならびに 24 ウェル細胞培養用プレート (Becton Dickinson Labware) を用いて行った。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の RGD peptide (sequence: GRGDSP, Genenet, Fukuoka, Japan)、RGE peptide (sequence: GRGESP, Sigma-Aldrich)、integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ 中和抗体 (GeneTex) またはマウスコントロール IgG (SantaCruz Biotechnology) を、それぞれ HPDLCs (細胞濃度: 3.4×10^3 個/200 μl) に添加し 30 分間の前処理後、セルカルチャーインサート上に播種した。インサート底面が浸漬するように 24 ウェルプレートには、コントロール群として PBS、刺激群として GDNF (50 ng/ml) をそれぞれ含有した 750 μl の培地を加え、培養した。48 時間後のインサート下面に移動した HPDLCs をメタノール (Wako) にて固定し、1 % toluidine blue (Sigma) を用いて染色を行った。細胞数の計測は顕微鏡ならびに FlvFs software (FLOVEL Ltd., Tokyo, Japan) を使用し、Scion Image Software (Scion Corporation, Walkersville, MD, USA) を用いて行った。

3-4-3. 細胞遊走試験 (スクラッチ試験)

HPDLC-3D ならびに-3M を 12 ウェル細胞培養用プレート (Becton Dickinson Labware) に播種し、コンフルエントになるまで培養した。200 μl ピペットチップ先端にて、それぞれのウェルに幅 400 μm 程度に細胞を剥離し、PBS にて洗浄した。コントロール群として PBS、刺激群として GDNF (50 ng/ml) を含有した培地に、さらに 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の GDNF 中和抗体 (GeneTex) またはマウスコントロール IgG (SantaCruz Biotechnology) を添加して培養した。培養後 0 および 24 時間後に顕微鏡下で撮影し、剥離した部位に遊走した細胞数を計測した。

3-5. PC12 を用いた神経細胞様分化誘導実験

3-5-1. HPDLC 由来の GDNF 含有培地の回収

HPDLC-3D ならびに-3M を、IL-1 β (10 ng/ml; PeproTech EC) にて 24 時間刺激を行った後、培地を除去し、さらに DMEM に置換して 24 時間培養した上清 (以後 IL-1 β -CM と

称す) を回収した。またコントロールとして PBS を添加し、同様の手順で得た培養上清 (以後 CM と称す) も回収した。

3-5-2. PC12 の培養

PC12 を $\phi 35$ mm 細胞培養用ディッシュ (Becton Dickinson Labware) に播種し、以下の 8 群に分けて培養し、神経細胞様分化に及ぼす影響について解析を行った; ① 10 %FBS+10 %HS 含有 DMEM、② 10 %FBS+10 %HS 含有 DMEM+GDNF (50 ng/ml; PeproTech EC)、③ 10 %FBS+10 %HS 含有 DMEM+GDNF+マウスコントロール IgG (1 μ g/ml; SantaCruz Biotechnology)、④ 10 %FBS+10 %HS 含有 DMEM+GDNF+GDNF 中和抗体 (1 μ g/ml; GeneTex)、⑤ 10 %FBS+10 %HS 含有 CM、⑥ IL-1 β -CM、⑦ IL-1 β -CM+マウスコントロール IgG (1 μ g/ml)、⑧ IL-1 β -CM+GDNF 中和抗体 (1 μ g/ml)。これらを用いて 2 日毎に全量交換し 14 日間培養を行った。培養開始から 3、5、7 日目に、PC12 の細胞形態の画像解析を行い、神経細胞様分化に及ぼす影響について比較検討した。分化判定は、過去の報告に準じて (Vaskovsky et al. 2000)、細胞体の直径の 2 倍以上の神経様突起を形成した PC12 を分化した細胞と判定した。

また、14 日間培養を行った PC12 から total RNA を回収した後、定量的 RT-PCR 法にて、rat Gap-43 の遺伝子発現解析を行った。

3-6. 統計学的分析

全ての値において平均値 \pm 標準偏差にて示した。統計学的解析は Student's t-test を用いて統計学的有意差を検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

Table.1 Specific primer sequence, annealing temperature, cycle numbers, and product size for semi-quantitative RT-PCR

Target gene (abbreviation)	Primer sequence forward/reverse	Annealing temperature (°C)	Cycle numbers	Size of products (bp)
Integrin α V	5'- GCCCATGCCTGTGCCTGTGT -3'	58	32	150
	5'- TGAGGTGGCCGGACCCGTTT -3'			
Integrin α 5	5'- CTACAATGATGTGGCCATCG -3'	60	34	198
	5'- GGATATCCATTGCCATCCAG -3'			
Integrin β 1	5'- CAAAGGAACAGCAGAGAAGC -3'	62	34	520
	5'- GTGGAAAACACCAGCAGC -3'			
Integrin β 3	5'- CCTACATGACGAAAATACCT -3'	53	34	516
	5'- AATCCCTCCCCACAAATACTG -3'			
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	5'- ACCACAGTCCATGCCATCCAC -3'	60	19	452
	5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'			
GDNF family receptor alpha 1 (GFR α 1)	5'- AGACCATCGTGCCTGTGTGTGCT -3'	54	30	216
	5'- GGGTCATGACTGTGCCAATAAG -3'			
Neural cell adhesion molecule (NCAM)	5'- CTCCCACCAACCATCATCTGG -3'	58	33	561
	5'- GGCTTCACAGGTAAGAGTGA -3'			
Re-arranged during transformation (RET)	5'- GAAAAGTGGTCAAGGCAACG -3'	58	30	475
	5'- AAATCTTCATCTCCGCCCC -3'			

Table.2 Specific primer sequence, annealing temperature, cycle numbers, and product size for quantitative RT-PCR

Target gene (abbreviation)	Primer sequence forward/reverse	Annealing temperature (°C)	Cycle numbers	Size of products (bp)
β-actin	5'- ATTGCCGACAGGATGCAGA -3'	60	40	89
	5'- GAGTACTTGCGCTCAGGAGGA -3'			
Bone sialoprotein (BSP)	5'- CTGGCACAGGGTATACAGGGTTAG -3'	60	40	182
	5'- ACTGGTGCCGTTTATGCCTTG -3'			
Fibronectin	5'- ACAGAACTATGATGCCGACCAGAAG -3'	60	40	104
	5'- ACTGATCTCCAATGCGGTACATGA -3'			
Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)	5'- CACCTGGAGTTAATGTCCAACCT -3'	60	40	179
	5'- AGCCACGACATCCCATAACTT -3'			
rat G3PDH	5'- TCGGCACCACCAACTGCTT -3'	60	40	96
	5'- TGGCAGTGATGGCATGGAC -3'			
rat growth-associated protein 43 (Gap-43)	5'- GGCTCTGCTACTACCGATGC -3'	60	40	225
	5'- GGCTTGTTTLAGGCTCCTCCT-3'			

4.結果

4-1. ラット歯根膜組織傷害モデルならびに HPDLCs における GDNF の発現

傷害を与えたラット歯根膜組織における GDNF の発現を解析するため、免疫組織化学的染色を行った。その結果、傷害側では創部近傍の歯根膜組織において、抗 GDNF 抗体ならびに抗 IL-1 β 抗体に対し、強陽性反応が観察された (Fig. 1A, C)。一方、非傷害側では抗 GDNF 抗体に対して弱陽性反応を示し、抗 IL-1 β 抗体に対する陽性反応は認めなかった (Fig. 1B, E, F)。また傷害側第二臼歯における抗 GDNF 抗体に対する陽性反応は、非傷害側と同程度であった (Fig. 1D)。一次抗体を用いなかったコントロール群では、これらの陽性反応は認められなかった (データ省略)。

次に HPDLCs における GDNF および GFR α 1 の発現について検討するため免疫細胞化学的染色を行った。HPDLC-3D は抗 GDNF 抗体および抗 GFR α 1 抗体に対して陽性反応を示した (Fig. 2A, C)。一次抗体を用いなかったコントロール群では、歯根膜細胞における陽性反応は認められなかった (Fig. 2B, D)。

4-2. GDNF レセプターの発現

HPDLCs における GDNF のレセプター発現について半定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、HPDLC-2G、-3D ならびに-3M において GFR α 1 ならびに NCAM の mRNA 発現が認められたが、RET の mRNA 発現は認められなかった (Fig. 2E)。対照的に MCF7 は GFR α 1 ならびに RET の mRNA を発現し、NCAM の mRNA 発現は認められず、過去の報告と合致していた (Bouley et al. 2008)。

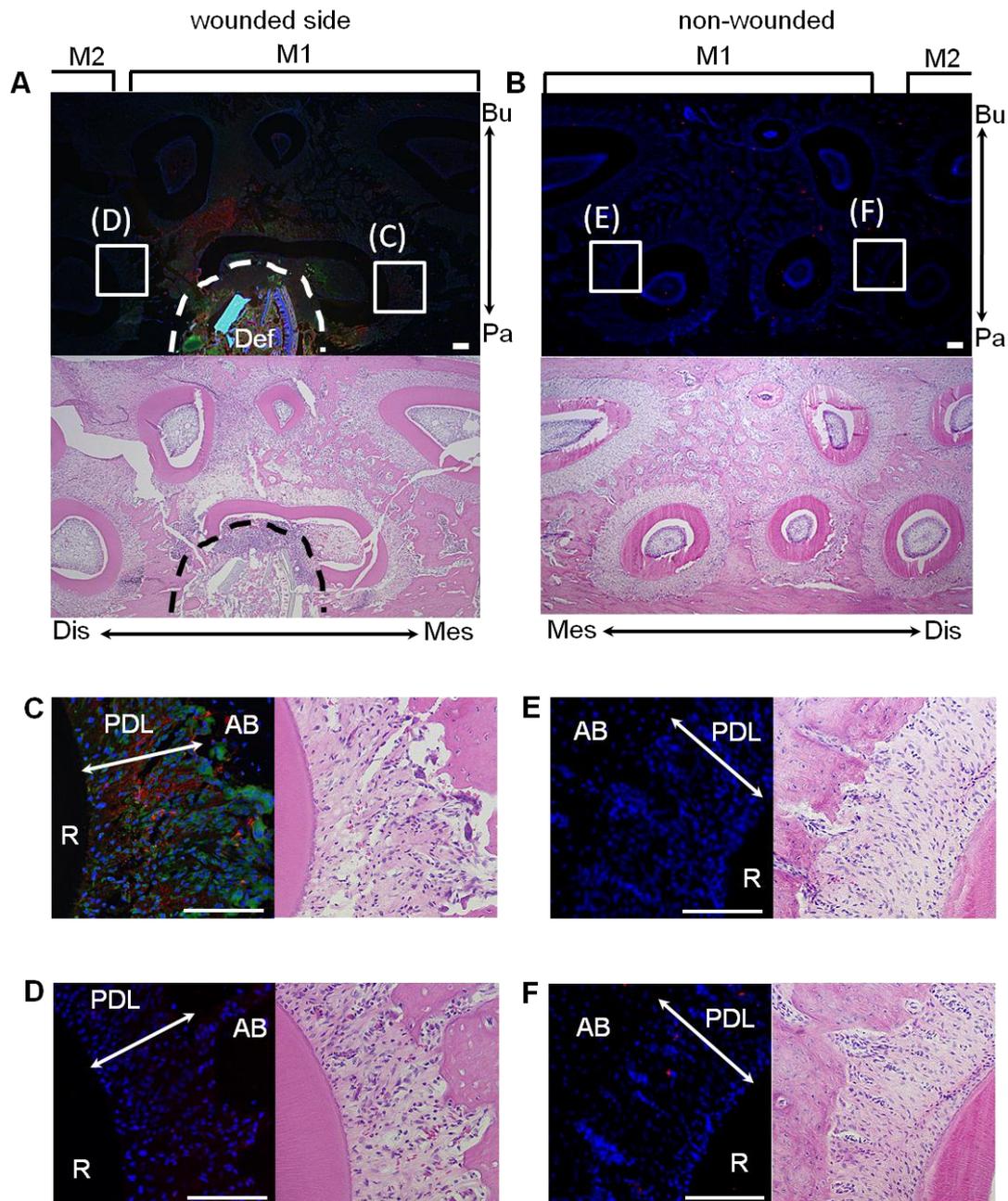


Figure 1. 傷害を与えたラット歯根膜組織における GDNF ならびに IL-1 β の免疫組織化学的染色法による解析

左側を傷害側 (A, C, D)、右側を非傷害側 (B, E, F)とし、ラット上顎第一臼歯近心口蓋側の歯根および周囲組織に傷害を与えて72時間後の GDNF の発現について、免疫組織化学的染色法を用いて解析を行った。抗 GDNF 抗体 (赤)ならびに抗 IL-1 β 抗体 (緑)に対して、傷害側第一臼歯の創部近傍の歯根膜組織 (C)において強陽性反応を認めた。これと比較し、傷害側第二臼歯 (D)および非傷害側 (E, F)においては、抗 GDNF 抗体に対する弱陽性反応を認め、抗 IL-1 β 抗体に対する陽性反応は認めなかった。細胞核は DAPI (青)にて対比染色した。全ての切片はヘマトキシリン-エオジン染色を行った (A-F)。Scale bars = 100 μ m、M1: 第一臼歯、M2: 第二臼歯、Bu: 頬側、Dis: 遠心、Mes: 近心、Pa: 口蓋側、AB: 歯槽骨、Def: 傷害部位、PDL: 歯根膜、R: 歯根

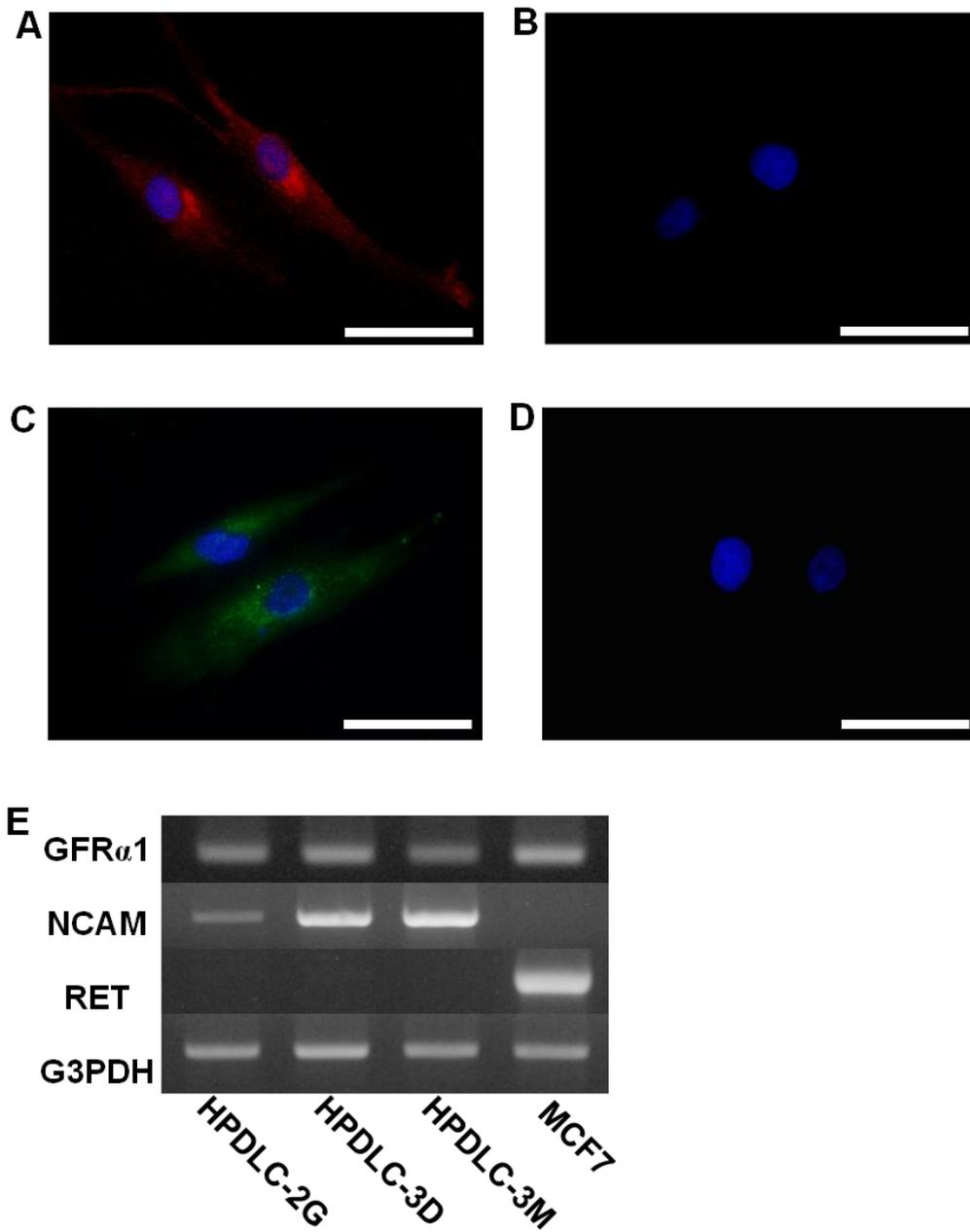


Figure 2. HPDLCs における GDNF 及びレセプター発現の解析

培養した HPDLC-3D を固定後、抗 GDNF 抗体 (赤、A) ならびに抗 GFR α 1 抗体 (緑、C) を用いて免疫細胞化学的染色を行った結果、細胞質に陽性反応を認めた。それぞれの一次抗体を反応させなかった場合、陽性反応は検出されなかった (B、D)。細胞核は DAPI (青) にて対比染色した。Scale bars = 50 μ m

HPDLC-2G、-3D、-3M ならびに MCF7 における GFR α 1、NCAM および RET の遺伝子発現について、半定量的 RT-PCR 解析を行った (E)。

4-3. 炎症性サイトカインが HPDLCs の GDNF 発現に及ぼす影響

in vivo の実験結果から炎症性サイトカインが、GDNF の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで、*in vitro* において IL-1 β ならびに TNF- α にて刺激した HPDLCs における GDNF タンパクの発現に与える影響について解析するために、ELISA 法により解析を行った。その結果、IL-1 β 刺激をした HPDLC-3D ならびに-3M の培養上清中にはそれぞれ 57.56 ± 10.21 、 69.85 ± 3.68 pg/ml の GDNF 発現が認められた (Fig. 3A)。無刺激群では HPDLC-3D において 15.48 ± 2.57 pg/ml、また-3M において 7.15 ± 1.39 pg/ml の GDNF 発現が検出された。また、TNF- α 刺激群では HPDLC-3D ならびに-3M においてそれぞれ 29.19 ± 1.67 、 38.77 ± 3.47 pg/ml、無刺激群においてそれぞれ 19.40 ± 1.53 、 16.69 ± 4.17 pg/ml の GDNF 発現が検出された (Fig. 3B)。

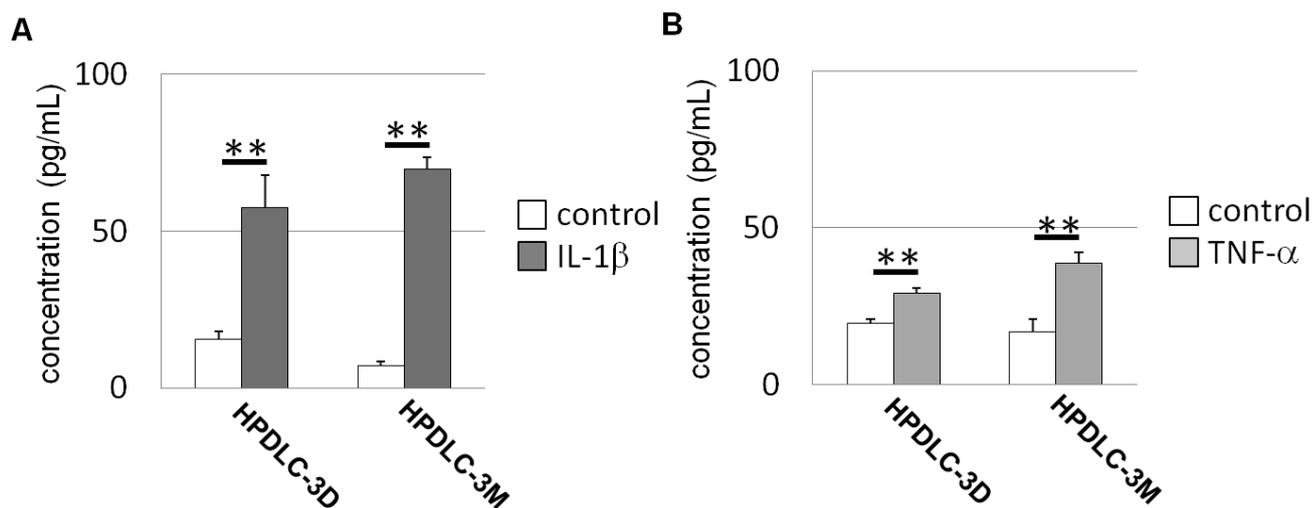


Figure 3. 炎症性サイトカインが HPDLCs の GDNF 発現に与える影響

HPDLC-3D ならびに-3M を PBS、IL-1 β (10 ng/ml、A) または TNF- α (10 ng/ml、B) で 24 時間刺激した。培養上清中の GDNF 発現について ELISA 法による解析を行った ($n = 3$ 、errors, s.d.)。** $p < 0.01$ vs. control (PBS)

4-4. GDNF が HPDLCs の走化性に及ぼす影響

GDNF が HPDLC の走化性に及ぼす影響を調べるため、インサートを用いた走化性試験ならびに細胞遊走試験を行った。予備実験において GDNF は濃度依存的に HPDLC-2G の走化性を促進し、50 ng/ml で最大の促進効果が認められたため、この濃度にて以後の

実験を行った (Fig. 4A)。

48 時間 GDNF 刺激した HPDLC-2G、-3D ならびに-3M は、無刺激群と比較して走化性が有意に促進した (Fig. 4A-F)。また、これらの HPDLCs における integrin α V β 3 ならびに integrin α 5 β 1 の mRNA 発現を調べた結果、integrin α V β 3 と比較して、integrin α 5 β 1 の発現量は低かったことから (Fig. 4G)、GDNF による HPDLC の走化性の促進には integrin α V β 3 が関与することが推察された。そこで integrin α V β 3 中和抗体による前処理後に GDNF 刺激を行い、走化性について検討した。その結果、integrin α V β 3 中和抗体による前処理によって、GDNF による走化性の促進が抑制された (Fig. 4B, D, F)。一方、マウスコントロール IgG による前処理は、GDNF による走化性の促進に影響を及ぼさなかった (Fig. 4B, D, F)。

次に、RGD 配列の関与について、RGD peptide ならびに RGE peptide にて前処理後、走化性試験を行った。その結果、RGD peptide による前処理によって、GDNF による走化性の促進が抑制された (Fig. 4C, E, F)。また RGE peptide による前処理は GDNF による走化性の促進に影響を及ぼさなかった (Fig. 4C, E, F)。

走化性試験と同様に、細胞遊走試験では GDNF 刺激によって HPDLCs の遊走は有意に促進した (Fig. 5)。さらに GDNF 中和抗体の添加により、この細胞遊走は非刺激群と同程度まで抑制された。

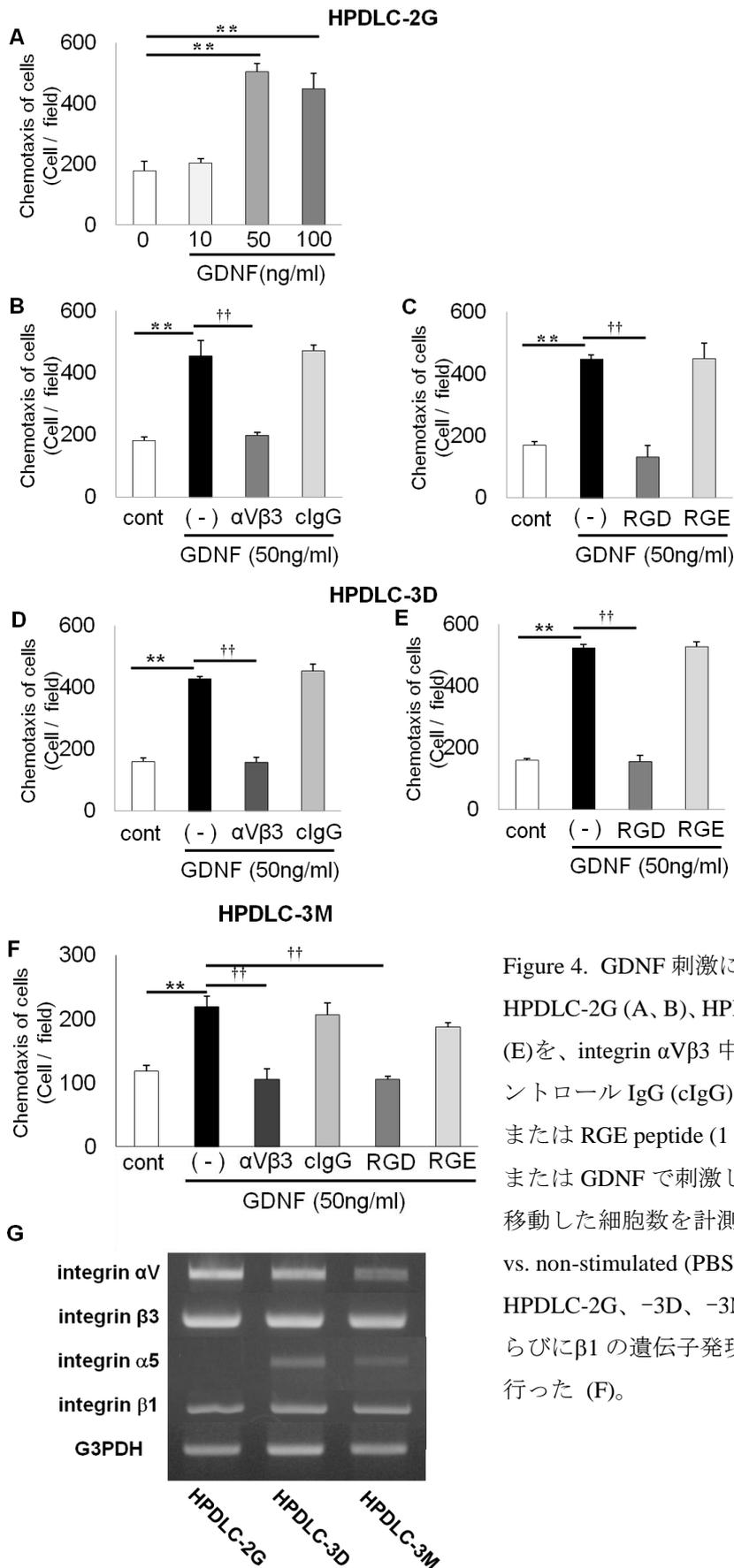


Figure 4. GDNF 刺激による HPDLCs の走化性の解析
 HPDLC-2G (A, B)、HPDLC-3D (C, D)ならびに HPDLC-3M (E)を、integrin α V β 3 中和抗体 (α V β 3) (1 μ g/ml)、マウスコントロール IgG (cIgG) (1 μ g/ml)、RGD peptide (1 μ g/ml)、または RGE peptide (1 μ g/ml)で 30 分前処理し、PBS (cont) または GDNF で刺激した。48 時間後、インサート下面に移動した細胞数を計測した ($n = 4$, errors, s.d.)。** $p < 0.01$ vs. non-stimulated (PBS)、 $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. GDNF
 HPDLC-2G、-3D、-3M における integrin α V、 β 3、 α 5 ならびに β 1 の遺伝子発現について半定量的 RT-PCR 解析を行った (F)。

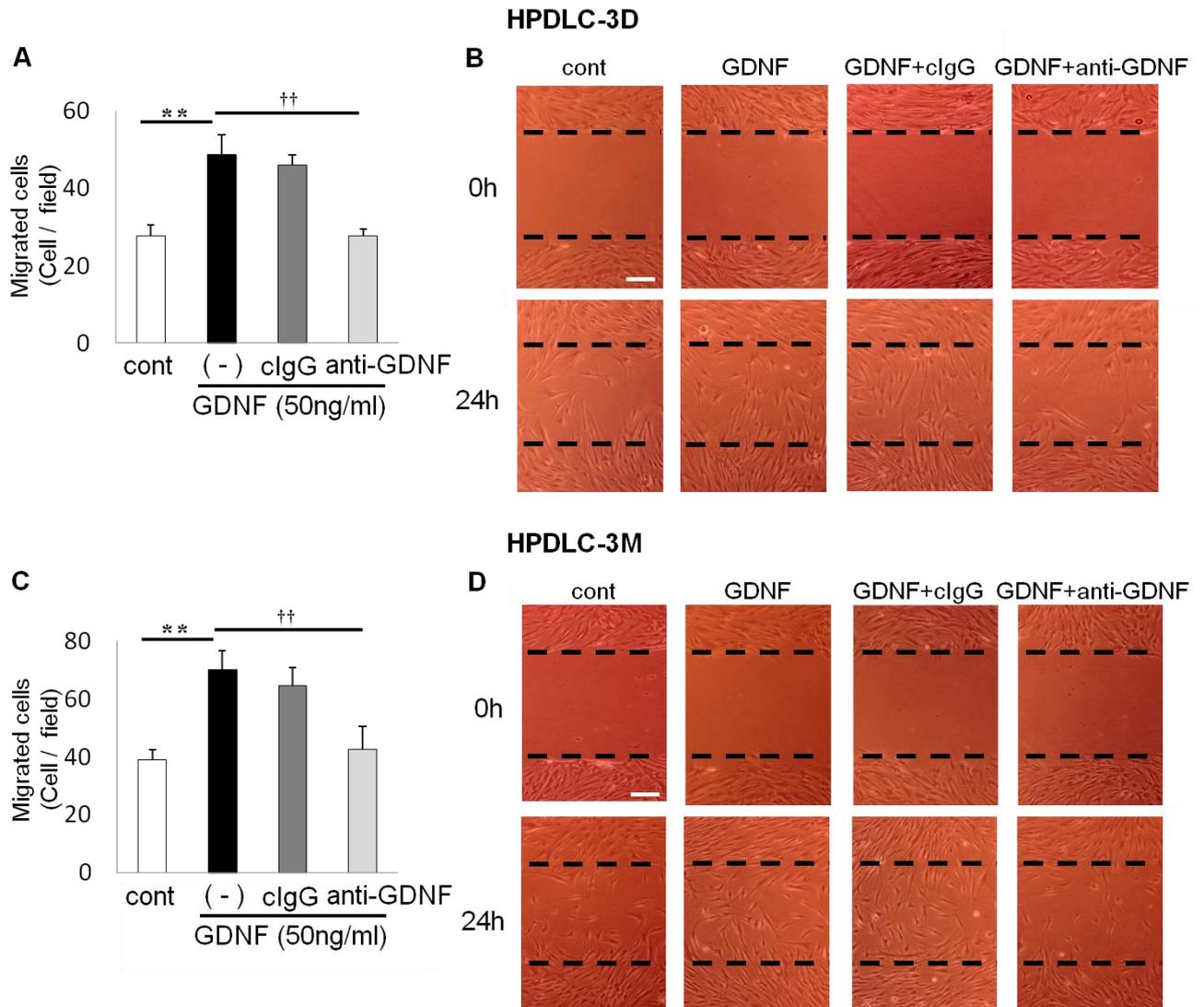


Figure 5. GDNF 刺激による HPDLCs 遊走能の解析

HPDLC-3D (A, B)ならびに HPDLC-3M (C, D)をマウスコントロール IgG (cIgG) (1 μ g/ml)または GDNF 中
 和抗体 (anti-GDNF) (1 μ g/ml)にて前処理後、PBS (cont)または GDNF (50 ng/ml)で刺激し、24 時間後に細胞
 を剥離した部位に遊走した細胞数を計測した ($n = 3$, errors, s.d.)。 ** $p < 0.01$ vs. non-stimulated (PBS)、 †† $p <$
 0.01 vs. GDNF + anti-GDNF

二本の破線間は細胞を剥離した部位に相当する (B、D)。 Scale bars = 100 μ m

4-5. GDNF が BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現に及ぼす影響

走化性試験の結果から、GDNF による HPDLC の遊走促進効果は、integrin α V β 3 および RGD 配列を分子内に含む細胞外基質タンパクを介することが示唆された。そこで GDNF 刺激が、HPDLC-3D ならびに-3M における BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現に及ぼす影響について解析を行った。BSP ならびに fibronectin は分子中に RGD 配列を有することが知られている (Barczyk et al. 2010)。GDNF 添加から 3、6、9 時間後に定量的 RT-PCR 法にて、これらの遺伝子発現を解析した。非刺激群と比較して、GDNF は 6 時間後をピークとして、これらの遺伝子発現を有意に促進する傾向が観察された (Fig. 6)。さらに GDNF 中和抗体を GDNF 刺激群に添加した結果、BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現は非刺激群と同程度まで抑制された。

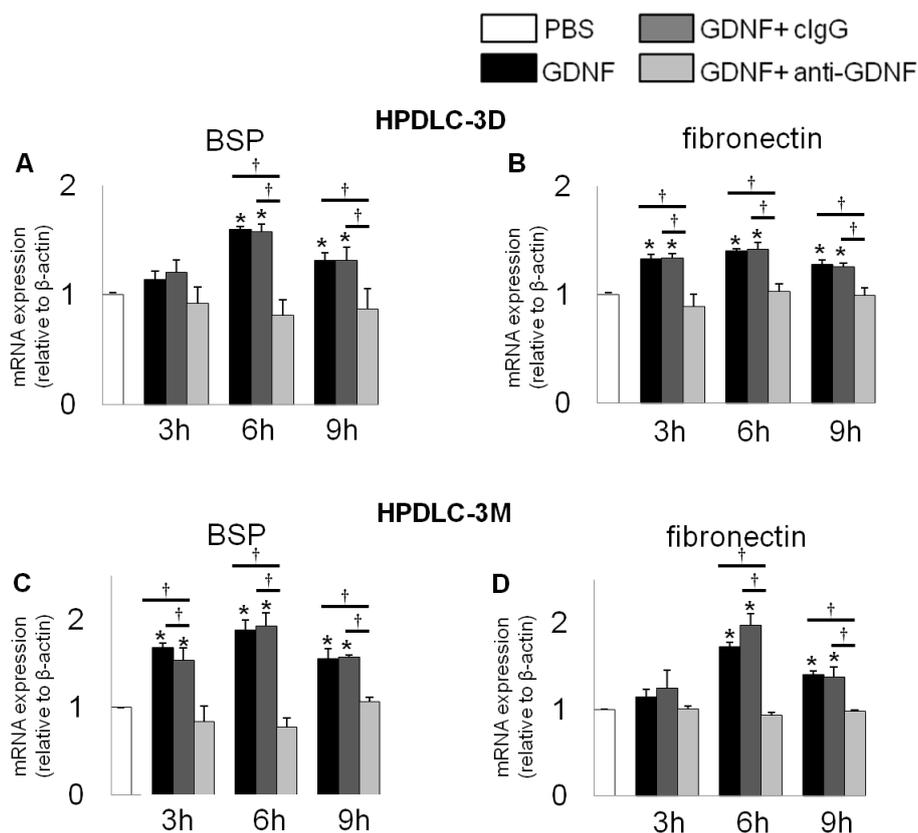


Figure 6. GDNF が HPDLCs の BSP ならびに fibronectin の発現に与える影響

HPDLC-3D (A, B) ならびに-3M (C, D) を PBS、GDNF (50 ng/ml)、GDNF (50 ng/ml)+マウスコントロール IgG (cIgG) (1 μ g/ml) または GDNF (50 ng/ml)+GDNF 中和抗体 (anti-GDNF) (1 μ g/ml) で刺激し、3、6 および 9 時間後の BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現について定量的 RT-PCR 解析を行った ($n = 3$, errors, s.d.). * $p < 0.05$ vs. non-stimulated (PBS)、† $p < 0.05$ vs. GDNF+anti-GDNF

4-6. HPDLCs 由来の GDNF が PC12 の神経細胞様分化へ及ぼす影響

HPDLCs 由来の GDNF が神経細胞様分化に及ぼす影響を検討するため、PC12 を用いて分化誘導実験を行った。PC12 は GDNF 存在下では、多数の神経様突起を伸長して神経細胞様細胞へと分化することが知られている (Garbayo et al. 2007, Wissel et al. 2008)。本実験においても GDNF 刺激により突起の伸長を認め、神経細胞の表現型を示した (Fig. 7)。ELISA 法によるタンパク発現解析の結果 (Fig. 3) に基づいて、IL-1 β にて 24 時間刺激した HPDLC-3D ならびに-3M の培養上清 (IL-1 β -CM) を用いて PC12 の培養を行った。その結果、GDNF 刺激群と比較して突起を伸長した PC12 が有意に増加した (Fig. 7)。また GDNF 刺激群ならびに IL-1 β -CM 群に、GDNF 中和抗体を添加した PC12 では、突起の伸長は抑制された (Fig. 7)。さらに 14 日間培養した PC12 における Gap-43 mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した結果、GDNF 刺激群ならびに IL-1 β -CM 群において有意な発現上昇を認め、この効果は GDNF 中和抗体の添加により抑制された (Fig. 8)。

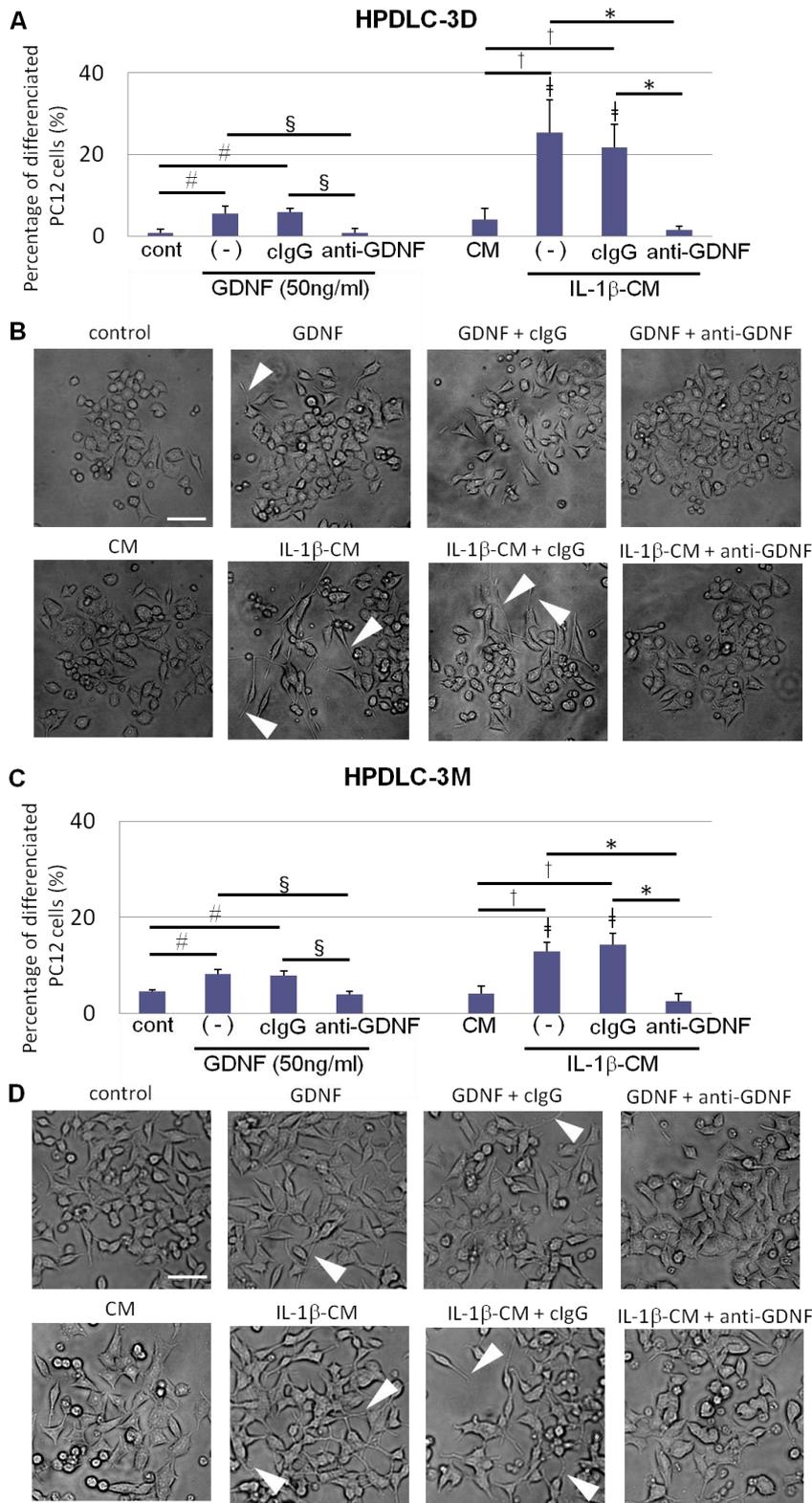


Figure 7. HPDLCs 由来の GDNF が PC12 の神経細胞様分化に及ぼす影響

HPDLC-3D (A, B)ならびに-3M (C, D)から採取した培養上清を用いて、PC12 を DMEM (control)、DMEM+GDNF (GDNF、50 ng/ml)、GDNF+マウスコントロール IgG (cIgG) (1 μg/ml)、GDNF+GDNF 中和抗体 (anti-GDNF) (1 μg/ml)、CM、IL-1β-CM、IL-1β-CM+cIgG または IL-1β-CM+anti-GDNF の条件下で 5 日間培養を行った。それぞれの条件下で神経細胞様分化した PC12 の細胞数の割合を計測した (A、C、 $n = 3$ 、errors, s.d.)。# $p < 0.05$ vs. cont、§ $p < 0.05$ vs. GDNF+anti-GDNF、† $p < 0.05$ vs. GDNF、‡ $p < 0.05$ vs. CM、* $p < 0.05$ vs.

IL-1β-CM+anti-GDNF それぞれの条件下における PC12 の位相差顕微鏡観察像を示す (B、D)。矢頭は神経様突起の伸長を認め、分化した PC12 を示す。Scale bars = 100 μm

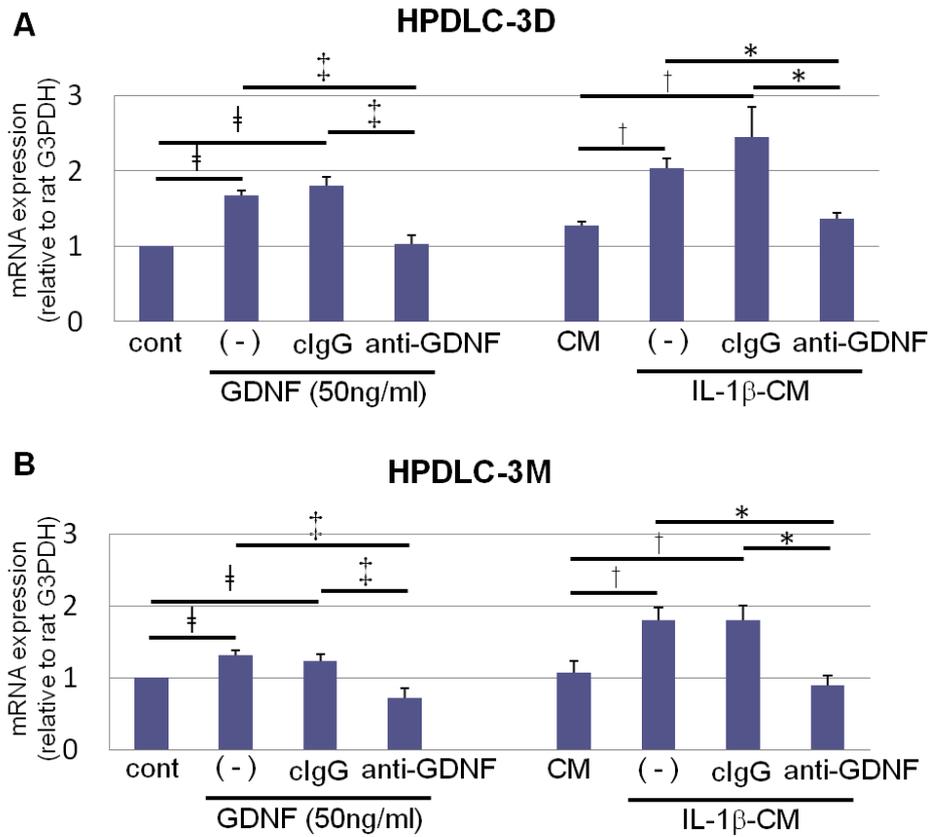


Figure 8. HPDLC 由来の GDNF が PC12 の Gap-43 の発現に及ぼす影響

HPDLC-3D (A)ならびに HPDLC-3M (B)から採取した培養上清を用いて、PC12 をそれぞれの条件下で 14 日間培養し、Gap-43 の遺伝子発現について定量的 RT-PCR 解析を行った ($n = 3$, errors, s.d.). † $p < 0.05$ vs. control, ‡ $p < 0.05$ vs. GDNF + anti-GDNF, † $p < 0.05$ vs. CM, * $p < 0.05$ vs. IL-1β-CM+anti-GDNF

5. 考察

本研究の結果から、以下のようなことが明らかになった； 1) 傷害を与えたラット歯根膜組織において GDNF の発現上昇を認め、HPDLC では炎症性サイトカインである IL-1 β ならびに TNF- α 刺激により GDNF タンパクの分泌が促された、 2) HPDLC では GFR α 1 ならびに NCAM の発現を認め、GDNF 刺激は HPDLC における BSP ならびに fibronectin の発現上昇を認め、integrin α V β 3 および RGD 配列を介した走化性の促進を誘導した、 3) PC12 を用いた神経細胞様分化誘導実験では、IL-1 β -CM は GDNF と同様に分化を促した。

GDNF レセプターは GFR α 1/NCAM ならびに GFR α 1/RET の 2 種類が報告されている (Sariola & Saarma 2003)。MCF7 は GFR α 1/RET を発現することが知られており (Boulay et al. 2008)、本研究においても同様の結果が得られた。したがって HPDLCs は GFR α 1/NCAM を発現し、GDNF のシグナルを伝達すると推察された。

創傷治癒は炎症期、増殖期、組織修復期の過程から構成される (Guo & Dipietro 2010)。創部近傍の歯根膜における GDNF 発現の上昇は、傷害により惹起された炎症反応に起因したものと推察される。歯周炎の早期において IL-1 β ならびに TNF- α が発現し、これらのサイトカインは炎症反応の調節に重要な役割を果たすと考えられている (Bartold & Narayanan 2000)。本研究では、HPDLCs において IL-1 β ならびに TNF- α が GDNF の発現を促進する結果が得られた。またこれまでに、GDNF が小腸粘膜において炎症反応を抑制し (Zhang et al. 2010)、さらに GDNF の持続的投与により神経組織の再生が促進することが報告がされている (Boyd & Gordon 2003)。これらのことから GDNF は、歯根膜組織の炎症病態下で発現が促進し、創傷治癒に貢献する可能性があることが示唆された。

組織の治癒過程において細胞の遊走は重要なステップであることから、GDNF の細胞走化性および遊走能について検討した。過去の報告で、GDNF は integrin α V β 3 を介して、軟骨肉腫細胞の遊走を促す働きを有することが示されている (Su et al. 2009)。本研究に

においても同様に GDNF は、integrin α V β 3 ならびに RGD 配列を介して HPDLC の走化性を促進した。そこで GDNF が、RGD 配列を有する細胞外基質の発現に及ぼす影響について検討することにした。歯根膜組織中に発現する RGD 配列を含む細胞外基質タンパクには、BSP、fibronectin ならびに osteopontin が知られており、いずれも integrin α V β 3 と結合することが報告されている (Abdullah & Larry 2006, Uitto & Larjava 1991)。BSP は、セメント質と象牙質間の接着に関与し (Harahashi et al. 2010)、BSP および integrin α V β 3 はヒト骨髄間質細胞ならびに前骨芽細胞の遊走を促すことが知られている (Abdullah and Larry 2006)。fibronectin は、歯根膜組織において細胞接着や遊走を促進することで創傷治癒に重要な役割を果たし (Uitto and Larjava 1991)、またマウス血管平滑筋細胞の integrin α V β 3 と結合し、その遊走を促すことが報告されている (Kappert et al. 2001, Keri et al. 2010)。これらの報告と併せて、GDNF は integrin α V β 3 ならびに BSP または fibronectin を介した歯根膜細胞の走化性の促進に関与することで、歯根膜組織の創傷治癒に貢献することが推察された。さらに *in vivo* での実験結果から、傷害を与えた歯根膜組織では、24 ならびに 72 時間後において GDNF の発現が上昇した (Yamamoto et al. 2012)。この結果は、GDNF が創傷治癒の早期の段階で何らかの重要な役割を担っていることを示唆するものである。歯根膜組織の創傷治癒における GDNF の関与については、今後さらなる検討が必要であると考えている。

神経細胞の分化は、種々の細胞外基質や神経栄養因子により誘導されることが知られている (Lamoureux et al. 1992)。また歯根膜に存在する神経は、歯根膜組織の恒常性の維持ならびに歯周組織再生に関して重要な意義を持つと考えられている (Fujiyama et al. 2004, Tomokiyo et al. 2012)。そこで炎症性サイトカインによって刺激した HPDLCs から分泌された GDNF が、神経細胞分化に及ぼす影響について検討するため、PC12 を用いて分化誘導実験を行った。IL-1 β -CM にて培養した PC12 は、上清中に含まれる GDNF によって突起を伸長し、神経細胞様細胞へ分化することが示唆された。さらに IL-1 β -CM 中の GDNF は、PC12 における Gap-43 の発現促進にも関与した。また Gap-43 は、ラット神経細胞の軸索終末の伸長過程で強発現し、シナプス形成に関与しており (Morita &

Miyata 2012)、また傷害を与えた末梢神経では Gap-43 の発現が上昇し、神経突起の伸長ならびに神経再生に関与すると考えられている (Huebner & Strittmatter 2009)。以上のことから、IL-1 β 刺激により産生された HPDLC 由来の GDNF は神経細胞分化に促進的に働くことが推察された。

今後さらに GDNF ノックアウトマウスにおける歯根膜の発生過程での GDNF 発現や、傷害モデルにおける創傷治癒の比較、アニマルモデルを用いた歯根膜組織再生に及ぼす影響について検証する計画である。

6.総括

本研究では、**GDNF** が歯根膜細胞に及ぼす影響について検討した。以下のように総括する。

1. **GDNF** は歯根膜細胞に働き、歯根膜組織の創傷治癒に関与する可能性が示唆された。
2. **IL-1 β** 刺激により産生が促された歯根膜細胞由来の **GDNF** は、神経再生に働く可能性が示唆された。

7.謝辞

本研究は、九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野 赤峰昭文教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の懇篤な御指導、御助言、ならびに御校閲に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり終始御指導を賜りました九州大学病院歯内治療科 前田英史診療准教授に深甚なる謝意を表します。さらに実験手法の御指導及び御助言を賜りました九州大学病院歯内治療科 和田尚久講師、University of Adelaide, Department of Dentistry 友清 淳先生、大阪大学大学院医学系研究科分子病態生化学教室 藤井慎介先生ならびに九州大学病院歯内治療科 門野内 聡助教に厚く感謝致します。また、当研究をサポートして下さった九州大学歯学研究院歯科保存学研究分野 郡 勝明先生、寺松 陽子先生、長谷川 大学先生、濱野 さゆり先生、祐田 明香先生、杉井 英樹先生、吉田 晋一郎先生、最後に、九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野、ならびに九州大学病院歯内治療科教員の皆様に心より御礼申し上げます。

8.参考文献

1. Abdullah Karadag, Larry W Fisher. 2006. Bone Sialoprotein Enhances Migration of Bone Marrow Stromal Cells Through Matrices by Bridging MMP-2 to $\alpha V\beta 3$ -Integrin. *J Bone Miner Res* 21:1627–1636.
2. Airaksinen MS, Saarma M. 2002. The GDNF family: signaling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3:383–394.
3. Appel E, Kolman O, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C. 1997. Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. *Neuroreport* 8:3309–3312.
4. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. 2010. *Cell Tissue Res* 339:269–280.
5. Bartold PM, Narayanan AS. 2000. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 40:29–49.
6. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. 2000. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 13:20–40.
7. Besset V, Scott RP, Ibáñez CF. 2000. Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 275:39159–39166.
8. Boulay A, Breuleux M, Stephan C, Fux C, Brisken C, Fiche M, Wartmann M, Stumm M, Lane HA, Hynes NE. 2008. The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer. *Cancer Res* 68:3743–3751.
9. Boyd JG, Gordon T. 2003. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons *in vivo*. *Exp Neurol* 183:610–619.
10. Chen LJ, Ren YH, Liu L, Zhang XQ, Zhao Y, Wu WT, Li F. 2010. Upregulated expression of Gap-43 mRNA and protein in anterior horn motoneurons of the spinal cord after brachial

- plexus injury. Arch Med Res 41:513-518.
11. Chen ZY, Chai YF, Cao L, Lu CL, He C. 2001. Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats. Brain Res 902:272-276.
 12. Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y, Akamine A. 2006. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and hTERT gene transfer. Cell Tissue Res 324:117-125.
 13. Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. 2008. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line *in vitro* and *in vivo*. J Cell Physiol 215:743–749.
 14. Fujiyama K, Yamashiro T, Fukunaga T, Balam TA, Zheng L, Takano-Yamamoto T. 2004. Denervation resulting in dento-alveolar ankylosis associated with decreased Malassez epithelium. J Dent Res 83:625-629.
 15. Garbayo E, Ansorena E, Lanciego JL, Aymerich MS, Blanco-Prieto MJ. 2007. Purification of bioactive glycosylated recombinant glial cell line-derived neurotrophic factor. Int J Pharm 344:9-15.
 16. Guo S, Dipietro LA. 2010. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 89:219–229.
 17. Harahashi H, Odajima T, Yamamoto T, Kawanami M. 2010. Immunohistochemical analysis of periodontal reattachment on denuded root dentin after periodontal surgery. Biomed Res 31:319–328.
 18. Huebner EA, Strittmatter SM. 2009. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. Results Probl Cell Differ 48:339-351.
 19. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. 2006. Integrin ligands at a glance. J Cell Sci 119:3901–3903.
 20. Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. 1995. Adhesion in cell migration. Curr Opin Cell Biol 7:697–706.

21. Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359–369.
22. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130–1132.
23. Kappert K, Blaschke F, Meehan WP. 2001. Integrins α v β 3 and α v β 5 mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. *Basic Res Cardiol* 96:42–49.
24. Keri Seymour, Xuan Han, Benjamin Sadowitz, Kristopher G, Vivian Gahtan. 2010. Differential effect of nitric oxide on thrombospondin-1-, PDGF- and fibronectin-induced migration of vascular smooth muscle cells. *The American Journal of Surgery* 200,615–619.
25. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 209:139-151.
26. Kuno R, Yoshida Y, Nitta A, et al. 2006. The role of TNF- α and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res* 1116:12–18.
27. Lamoureux P, Zheng J, Buxbaum RE, Heidemann SR. 1992. A cytomolecular investigation of neurite growth on different culture surfaces. *J Cell Biol* 118:655-661.
28. Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A. 2010. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J Endod* 36:647–652.
29. Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Kono K, Akamine A. 2011. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. *J Dent Res* 90:181–185.
30. Morita S, Miyata S. 2012. Synaptic localization of growth-associated protein 43 in cultured hippocampal neurons during synaptogenesis. *Cell Biochem Funct*
31. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. 2003. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J*

- Periodontal Res 38:97–103.
32. Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. 2003. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113:867–879.
 33. Paratcha G, Ibanez CF, Ledda F. 2006. GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci* 31:505–514.
 34. Raja S, Byakod G, Pudakalkatti P. 2009. Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hyg* 7:82–89.
 35. Sariola H, Saarma M. 2003. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116:3855–3862.
 36. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149–155.
 37. Su CM, Lu DY, Hsu CJ, Chen HT, Huang CY, Yang WH, Su YC, Yang SN, Fong YC, Tseng WP, Tang CH. 2009. Glial cell-derived neurotrophic factor increases migration of human chondrosarcoma cells *via* ERK and NF-kappaB pathways. *J Cell Physiol* 220:499–507.
 38. Takeda K, Shiba H, Mizuno N, Hasegawa N, Mouri Y, Hirachi A, Yoshino H, Kawaguchi H, Kurihara H. 2005. Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng* 11:1618–1629.
 39. Ten Cate, A.R. 1997. The development of the periodontium--a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol* 2000 13:9-19.
 40. Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A. 2008. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line. *Differentiation* 76:337–347.
 41. Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A. 2012. A multipotent clonal human periodontal ligament cell line with neural crest cell phenotypes promotes neurocytic differentiation, migration, and survival. *J Cell Physiol* 227:2040-2050.

42. Uitto VJ, Larjava H. 1991. Extracellular matrix molecules and their receptors: an overview with special emphasis on periodontal tissues. *Crit Rev Oral Biol Med* 2:323–354.
43. Vaskovsky A, Lupowitz Z, Erlich S, Pinkas-Kramarski R. 2000. ErbB-4 activation promotes neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurochem* 74:979-987.
44. Wissel K, Stöver T, Hofmann NS, Chernajovsky Y, Daly G, Sasse S, Warnecke A, Lenarz T, Gross G, Hoffmann A. 2008. Fibroblast-mediated delivery of GDNF induces neuronal-like outgrowth in PC12 cells. *Otol Neurotol* 29:475-481.
45. Yamamoto N, Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Kono K, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A. 2012. Expression and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on periodontal ligament cells. *J Clin Periodontol* 39:556-564.
46. Zhang DK, He FQ, Li TK, Pang XH, Cui de J, Xie Q, Huang XL, Gan HT. 2010. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* 222:213–222.

Figure Legends

Figure 1. 傷害を与えたラット歯根膜組織における GDNF ならびに IL-1 β の免疫組織化学的染色法による解析

左側を傷害側 (A, C, D)、右側を非傷害側 (B, E, F) とし、ラット上顎第一臼歯近心口蓋側の歯根および周囲組織に傷害を与えて 72 時間後の GDNF の発現について、免疫組織化学的染色法を用いて解析を行った。抗 GDNF 抗体 (赤) ならびに抗 IL-1 β 抗体 (緑) に対して、傷害側第一臼歯の創部近傍の歯根膜組織 (C) において強陽性反応を認めた。これと比較し、傷害側第二臼歯 (D) および非傷害側 (E, F) においては、抗 GDNF 抗体に対する弱陽性反応を認め、抗 IL-1 β 抗体に対する陽性反応は認めなかった。細胞核は DAPI (青) にて対比染色した。全ての切片はヘマトキシリン-エオジン染色を行った (A-F)。

Scale bars = 100 μ m、M1: 第一臼歯、M2: 第二臼歯、Bu: 頬側、Dis: 遠心、Mes: 近心、Pa: 口蓋側、AB: 歯槽骨、Def: 傷害部位、PDL: 歯根膜、R: 歯根

Figure 2. HPDLCs における GDNF 及びレセプター発現の解析

培養した HPDLC-3D を固定後、抗 GDNF 抗体 (赤、A) ならびに抗 GFR α 1 抗体 (緑、C) を用いて免疫細胞化学的染色を行った結果、細胞質に陽性反応を認めた。それぞれの一次抗体を反応させなかった場合、陽性反応は検出されなかった (B, D)。細胞核は DAPI (青) にて対比染色した。Scale bars = 50 μ m

HPDLC-2G、-3D、-3M ならびに MCF7 における GFR α 1、NCAM および RET の遺伝子発現について、半定量的 RT-PCR 解析を行った (E)。

Figure 3. 炎症性サイトカインが HPDLCs の GDNF 発現に与える影響

HPDLC-3D ならびに -3M を PBS、IL-1 β (10 ng/ml、A) または TNF- α (10 ng/ml、B) で 24 時間刺激した。培養上清中の GDNF 発現について ELISA 法による解析を行った ($n = 3$, errors, s.d.). ** $p < 0.01$ vs. control (PBS)

Figure 4. GDNF 刺激による HPDLCs の走化性の解析

HPDLC-2G (A, B)、HPDLC-3D (C, D)ならびに HPDLC-3M (E)を、integrin $\alpha V\beta 3$ 中和抗体 ($\alpha V\beta 3$) (1 $\mu\text{g/ml}$)、マウスコントロール IgG (cIgG) (1 $\mu\text{g/ml}$)、RGD peptide (1 $\mu\text{g/ml}$)、または RGE peptide (1 $\mu\text{g/ml}$)で 30 分前処理し、PBS (cont)または GDNF で刺激した。48 時間後、インサート下面に移動した細胞数を計測した ($n = 4$, errors, s.d.)。 $**p < 0.01$ vs. non-stimulated (PBS)、 $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. GDNF

HPDLC-2G、-3D、-3M における integrin αV 、 $\beta 3$ 、 $\alpha 5$ ならびに $\beta 1$ の遺伝子発現について半定量的 RT-PCR 解析を行った (F)。

Figure 5. GDNF 刺激による HPDLCs 遊走能の解析

HPDLC-3D (A, B)ならびに HPDLC-3M (C, D)をマウスコントロール IgG (cIgG) (1 $\mu\text{g/ml}$) または GDNF 中和抗体 (anti-GDNF) (1 $\mu\text{g/ml}$)にて前処理後、PBS (cont)または GDNF (50 ng/ml)で刺激し、24 時間後に細胞を剥離した部位に遊走した細胞数を計測した ($n = 3$, errors, s.d.)。 $**p < 0.01$ vs. non-stimulated (PBS)、 $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. GDNF + anti-GDNF

二本の破線間は細胞を剥離した部位に相当する (B, D)。 Scale bars = 100 μm

Figure 6. GDNF が HPDLCs の BSP ならびに fibronectin の発現に与える影響

HPDLC-3D (A, B)ならびに-3M (C, D)を PBS、GDNF (50 ng/ml)、GDNF (50 ng/ml)+マウスコントロール IgG (cIgG) (1 $\mu\text{g/ml}$)または GDNF (50 ng/ml)+GDNF 中和抗体 (anti-GDNF) (1 $\mu\text{g/ml}$)で刺激し、3、6 および 9 時間後の BSP ならびに fibronectin の遺伝子発現について定量的 RT-PCR 解析を行った ($n = 3$, errors, s.d.)。 $*p < 0.05$ vs. non-stimulated (PBS)、 $^{\dagger}p < 0.05$ vs. GDNF+anti-GDNF

Figure 7. HPDLCs 由来の GDNF が PC12 の神経細胞様分化に及ぼす影響

HPDLC-3D (A, B)ならびに-3M (C, D)から採取した培養上清を用いて、PC12 を DMEM

(control)、DMEM+GDNF (GDNF、50 ng/ml)、GDNF+マウスコントロール IgG (cIgG) (1 μ g/ml)、GDNF+GDNF 中和抗体 (anti-GDNF) (1 μ g/ml)、CM、IL-1 β -CM、IL-1 β -CM+cIgG または IL-1 β -CM+anti-GDNF の条件下で 5 日間培養を行った。それぞれの条件下で神経細胞様分化した PC12 の細胞数の割合を計測した (A、C、 $n = 3$ 、errors, s.d.)。[#] $p < 0.05$ vs. cont、[§] $p < 0.05$ vs. GDNF+anti-GDNF、[‡] $p < 0.05$ vs. GDNF、[†] $p < 0.05$ vs. CM、^{*} $p < 0.05$ vs. IL-1 β -CM+anti-GDNF

それぞれの条件下における PC12 の位相差顕微鏡観察像を示す (B、D)。矢頭は神経様突起の伸長を認め、分化した PC12 を示す。Scale bars = 100 μ m

Figure 8. HPDLC 由来の GDNF が PC12 の Gap-43 の発現に及ぼす影響

HPDLC-3D (A)ならびに HPDLC-3M (B)から採取した培養上清を用いて、PC12 をそれぞれの条件下で 14 日間培養し、Gap-43 の遺伝子発現について定量的 RT-PCR 解析を行った ($n = 3$ 、errors, s.d.)。[‡] $p < 0.05$ vs. control、[§] $p < 0.05$ vs. GDNF + anti-GDNF、[†] $p < 0.05$ vs. CM、^{*} $p < 0.05$ vs. IL-1 β -CM+anti-GDNF

Fig. 1. Immunohistochemical analysis of GDNF and IL-1 β in PDL tissue in the surgically wounded side (A, C, D) and the non-wounded side (B, E, F) 3 day after surgery. Horizontal sections through the first and second molars in rat maxilla were prepared. Immunopositive

cells were visualized by anti-GDNF (red), and anti-IL-1 β (green). Higher-magnification views of the rectangles shown in panels A and B are provided in panels C–F. More intensely staining are recognizable near the wounded area (C, left), when compared with normal PDL tissue from the second molar in the wounded side (D, left) or the first (E, left) and second (F, left) molars from the non-wounded side, which show weak staining. The tissue was counterstained with DAPI (blue). Hematoxylin and eosin staining of all sections were shown (A-F). Scale bars = 100 μ m. M1, first molar; M2, second molar; Bu, buccal; Dis, distal; Mes, mesial; Pa, palatal; AB, alveolar bone; Def, defect site; PDL, periodontal ligament; R, tooth root.

Fig. 2. Expression of GDNF and its receptor subunits in cultured HPDLCs.

Immunocytochemical staining for GDNF (red; A) and GFR α 1 (green; C) was performed using cultured HPDLC-3D cells. For a negative control, the primary antibody was omitted (B, D). The cells in all conditions were counterstained with DAPI (blue). Scale bars = 50 μ m. Expression of genes encoding GFR α 1, NCAM, and RET in HPDLC-2G, HPDLC-3D, HPDLC-3M, and MCF7 cells was examined using semi-quantitative RT-PCR (E).

Fig. 3. Expression of GDNF in HPDLC-3D and HPDLC-3M stimulated with pro-inflammatory cytokines. HPDLCs were treated with PBS, IL-1 β (10 ng/ml, A), or TNF- α (10 ng/ml, B) for 24 h. Expression of GDNF was examined using an ELISA ($n = 3$; errors, s.d.). ** $p < 0.01$ vs. control (PBS).

Fig. 4. Comparison of the chemotactic activity of HPDLCs after stimulation with GDNF (50 ng/ml) using Transwell chambers. HPDLC-2G (A, B), HPDLC-3D (C, D) and HPDLC-3M (E) were pretreated with anti-integrin α V β 3 (α V β 3) (1 μ g/ml), normal mouse control IgG (cIgG) (1 μ g/ml), RGD peptide (1 μ g/ml), or RGE peptide (1 μ g/ml) for 30 min followed by stimulation with PBS (as a control, cont) or GDNF (50 ng/ml). Cells that traversed the chamber were counted after 48 h of culture ($n = 4$; errors, s.d.). ** $p < 0.01$ vs. non-stimulated group (PBS) and $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. GDNF-treated group. (F) Expression of genes encoding integrin α V and β 3 subunits in HPDLCs was examined by semi-quantitative RT-PCR.

Fig.5. Comparison of the migratory activity of HPDLCs by using a scratch wound healing assay. HPDLC-3D (A, B) and HPDLC-3M (C, D) were treated with PBS (as a control, cont) or GDNF (50 ng/ml) with or without anti-GDNF neutralizing antibody (1 μ g/ml) or normal mouse control IgG (cIgG) (1 μ g/ml, $n = 3$; errors, s.d.). ** $p < 0.01$ vs. non-stimulated (PBS) and $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. GDNF + anti-GDNF group. (B, D) The dashed lines delimit the initially wounded regions. At 24 h after wounding, the number of cells

migrated into the wound space were counted. Results are representative of three separate experiments. Scale bars = 100 μ m.

Fig. 6. Expressions of genes encoding BSP and fibronectin in HPDLCs stimulated with GDNF. HPDLC-3D (A, B) and HPDLC-3M (C, D) were treated with PBS or GDNF (50 ng/ml) with or without anti-GDNF neutralizing antibody (1 μ g/ml), and normal mouse control IgG (cIgG) (1 μ g/ml). After 3, 6, and 9 h of treatment, gene expression was examined using quantitative RT-PCR ($n = 3$; errors, s.d.). $*p < 0.05$ vs. non-stimulated (PBS) and $^{\dagger}p < 0.05$ vs. GDNF + anti-GDNF group.

Fig. 7. Effects of GDNF secreted from HPDLCs on neurocytic differentiation of PC12cells. Neurocytic differentiation of PC12cells was examined after culturing in DMEM (control), DMEM+ GDNF (50ng/ml) with or without normal mouse control IgG (cIgG) and anti-GDNF neutralizing antibody (1 μ g/ml), CM, IL-1 β -CM with or without normal mouse control IgG (cIgG) and anti-GDNF neutralizing antibody for 7 days. Culture of PC12cells on GDNF synthesized by HPDLC-3D (A, B) and HPDLC-3M (C, D). The percentage of differentiated PC12cells for each culture condition (A, C) ($n = 3$; errors, s.d.). $^{\dagger}p < 0.05$ vs. GDNF, $^{\ddagger}p < 0.05$ vs. CM and $*p < 0.05$ vs. IL-1 β -CM+anti-GDNF group. Phase-contrast microscopic images of each culture condition are shown (B, D). Arrowheads show differentiated PC12 cells that extended neurite-like processes. Results are representative of three separate experiments. Scale bars = 100 μ m.

Fig. 8. Expressions of gene encoding Gap-43 in PC12cells. HPDLC-3D (A) and HPDLC-3M (B) were cultured with DMEM (control), DMEM+ GDNF (50ng/ml) with or without normal mouse control IgG (cIgG) and anti-GDNF neutralizing antibody (1 μ g/ml), CM, IL-1 β -CM with or without normal mouse control IgG (cIgG) and anti-GDNF neutralizing antibody for 14 days. Gene expression was examined using quantitative RT-PCR ($n = 3$; errors, s.d.). $^{\ddagger}p < 0.05$ vs. control, $^{\dagger}p < 0.05$ vs. GDNF + anti-GDNF, $^{\ddagger}p < 0.05$ vs. CM and $*p < 0.05$ vs. IL-1 β -CM+anti-GDNF group.

Table 1. Primer sequence, product size, annealing temperature, cycle numbers for semi-quantitative RT-PCR

Table 2. Primer sequence, product size, annealing temperature for quantitative RT-PCR