

論文の内容の要旨

氏名：岩井 泰伸

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effects of tumor necrosis factor- α on follicular dendritic cell secreted protein (FDC-SP) gene transcription in gingival epithelial cells, and localization and expression pattern of FDC-SP in the junctional epithelium of inflamed gingiva

(歯肉上皮細胞における FDC-SP 遺伝子の転写に対する TNF- α の効果と炎症性歯肉の接合上皮における FDC-SP の局在と発現変化)

慢性歯周炎は、細菌、宿主および環境要因によって引き起こされる炎症性疾患であり、腫脹、出血および歯槽骨吸収等の症状を引き起こす。Lipopolysaccharide やタンパク分解酵素等の細菌の産生物質に対する免疫応答、炎症性サイトカインおよび炎症性メディエーターの産生等が歯周炎の進行に重要な役割を果たすと考えられる。腫瘍壊死因子- α (TNF- α) は、閉経後骨粗鬆症、関節リウマチおよび歯周疾患における急性および慢性炎症反応に関与する重要なサイトカインである。

濾胞性樹状細胞分泌タンパク質 (follicular dendritic cell secretory protein ; FDC-SP) は、ヒト扁桃腺の濾胞性樹状細胞から分泌され、唾液タンパク質であるスタセリンおよびヒスタチンと類似した分子特性を有し、耳下腺、歯根膜および接合上皮で発現し、抗菌活性を有することが示唆されている。FDC-SP は活性化 B 細胞に特異的に結合し、B 細胞応答を調節する。また、歯根膜細胞において FDC-SP を過剰発現させると、骨形成分化が抑制され破骨細胞形成が増強された。

接合上皮は、歯肉とエナメル質との接合部に存在する歯肉上皮である。エナメル質への付着はヘミデスモゾーム結合による上皮性付着であり、歯周組織の免疫防御システムの重要な役割を担っている。

アメロチン (AMTN) は、成熟期エナメル芽細胞および接合上皮の内側基底板上に発現するエナメルタンパク質であり、歯原性エナメル芽細胞関連タンパク質 (ODAM) は、接合上皮の内側および外側基底板上に発現している。AMTN および ODA M は接合上皮の歯面への接着および外的刺激からの防御因子としての機能が示唆されている。

炎症性サイトカインによるヒト FDC-SP 遺伝子の転写調節機構を解明するために、歯肉上皮細胞における FDC-SP の転写に対する TNF- α の影響を解析した。さらに、*Porphyromonas gingivalis* および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 感染マウスにおける FDC-SP、AMTN および ODA M の発現および局在を解析した。

TNF- α (10 ng/ml) でヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22、Sa3) およびヒト耳下腺由来細胞 (HSY) を刺激すると、FDC-SP mRNA 量は刺激 3 時間後から増加し、12 時間後に最大となった。また、FDC-SP タンパク質量は TNF- α 刺激 3 時間後から増加し、12 および 24 時間後に最大となった。-116FDCSP (-116~+60)、-210FDCSP (-210~+60)、-345FDCSP (-345~+60)、-501FDCSP (-501~+60)、-717FDCSP (-717~+60) および -948FDCSP (-948~+60) の長さのヒト FDC-SP 遺伝子プロモーターを含むルシフェラーゼコンストラクトを作成し、Ca9-22 細胞に導入後、TNF- α (10 ng/ml) で刺激すると、全てのコンストラクトで Control と比較して転写活性が上昇した。また、TNF- α で刺激後の各コンストラクトの転写活性を比較すると、-116FDCSP から -345FDCSP までは段階的に活性が増加したが、-501FDCSP 以降の活性は変化しなかった。ヒト FDC-SP 遺伝子プロモーターの -345 塩基対上流内の *YY1*、*GATA*、*C/EBP2* および *C/EBP3* 応答配列に 3 塩基対の変異を挿入した *mYY1*、*mGATA*、*mC/EBP2* および *mC/EBP3* を Ca9-22 細胞に導入すると、TNF- α による転写活性の上昇は部分的に抑制された。*mC/EBP2* と *mC/EBP3* の 2 ヶ所に変異を挿入した -345FDCSP *mC/EBP2+mC/EBP3* を Ca9-22 細胞に導入すると、転写活性の上昇はさらに抑制された。-345FDCSP を導入した Ca9-22 細胞にリン酸化阻害剤を作用させ TNF- α で刺激すると、プロテインキナーゼ A、チロシンキナーゼ、MEK1/2 キナーゼ、PI3 キナーゼ阻害剤により転写活性の上昇が抑制された。ゲルシフトアッセイの結果、*YY1* と核内タンパク質の結合は TNF- α (10 ng/ml) 刺激 3 時間後から増加し、6 および 12 時間後で最大に達した。*GATA* および *C/EBP3* と核内タンパク質の結合は 3 時間後から増加し、6 時間後で最大に達した。*C/EBP2* と核内タンパク質の結合は 3 時間後から増加し、12 時間後まだ同レベルを維持した。競合ゲルシフトアッセイの結果、40 倍濃度の非標識の同配列をそれぞれ加えると、*YY1*、*GATA*、*C/EBP2* および *C/EBP3* と核内タンパク質の結合バンドは消

失し、それぞれの結合が特異的であることが確認された。40倍濃度の非標識 *C/EBP3* で、*C/EBP2* と核内タンパク質の結合は消失したが、非標識の *C/EBP2* を加えても *C/EBP3* と核内タンパク質の結合に変化はなかった。クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) の結果、*YY1*、*GATA*、*C/EBP2* および *C/EBP3* 配列への *YY1*、*GATA* および *C/EBPβ* 転写因子の結合は、TNF- α 刺激 3 時間後に増加し、24 時間後に最大となった。リン酸化阻害剤を用いた ChIP アッセイを行った結果、*YY1*、*GATA*、*C/EBP2* および *C/EBP3* 配列への *YY1*、*GATA* および *C/EBPβ* の結合は、チロシンリン酸化、MEK1/2 および PI3 キナーゼ阻害剤によって抑制された。

HE 染色および免疫染色の結果、AMTN および ODAM の局在は、マウス第二臼歯の接合上皮および下顎切歯のエナメル芽細胞で検出された。*A. actinomycetemcomitans* で 15 日間感染し 30 日後のマウスでの AMTN、ODAM および FDC-SP 発現および局在はほとんど変化しなかったが、*P.gingivalis* を 8 または 15 日間感染させ 1 日後のマウスでは、AMTN および FDC-SP の発現の増加が観察された。15 日間感染させ 30 日後のマウスでは、長期間の炎症による内側基板の破壊に伴い、AMTN および FDC-SP の発現は減少した。一方、ODAM は、8 または 15 日間感染させ 1 日後のマウスと 15 日感染させ 30 日後のマウスで発現量の増加が観察された。

以上の研究の結果、歯肉上皮細胞を TNF- α 刺激すると、チロシンキナーゼ、MEK1/2 および PI3K 経路を介して、*YY1*、*GATA*、*C/EBP2* および *C/EBP3* 配列への *YY1*、*GATA* および *C/EBPβ* の結合を増加させ、*FDC-SP* の転写を増加させることが明らかになった。さらに、接合上皮における AMTN、ODAM および FDC-SP の発現パターンは炎症の進行に伴って変化し、これらの 3 つのタンパク質が炎症に対する接合上皮の抵抗性において重要な役割を果たす可能性があることが示唆された。