

論文審査の結果の要旨

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）

審査委員：（主査） 教授 吉垣 純子

（副査） 教授 小方 頼昌

教授 松島 潔

慢性歯周炎は、細菌、宿主および環境要因によって惹起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、耳下腺、歯根膜および接合上皮で発現する。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することから、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マ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板に局限して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板に発現している。AMTN および O DAM 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。

ヒト FDC-SP 遺伝子発現に対する TNF- α の影響を解明するために、歯肉上皮細胞を TNF- α で刺激し、FDC-SP の転写制御機構を解析した。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 O DAM の発現および局在を解析した。

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 TNF- α (10 ng/ml) で刺激すると、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。長さのヒト FDC-SP 遺伝子プロモーターを含む 6 種類のルシフェラーゼコンストラクト -116FDCSP (-116~+60)、-210FDCSP (-210~+60)、-345FDCSP (-345~+60)、-501FDCSP (-501~+60)、-717FDCSP (-717~+60) および -948FDCSP (-948~+60) を作成し、Ca9-22 細胞に導入後、TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、全てのコンストラクトで転写活性が上昇した。-116FDCSP、-210FDCSP および -345FDCSP の転写活性は段階的に増加したが、-501FDCSP 以降の転写活性はそれ以上増加しなかった。-345FDCSP コンストラクト中の *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、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 キナーゼ阻害剤で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 $\text{TNF-}\alpha$ 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刺激 3 時間後に増加し、6 時間後に最大に達した。*C/EBP2* と核内タンパク質の結合は 3 時間後から増加し、12 時間後まで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/EBP* β 転写因子の結合は、 $\text{TNF-}\alpha$ 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 アッセイの結果、*YY1*、*GATA*、*C/EBP2* および *C/EBP3* 配列への *YY1*、*GATA* および *C/EBP* β 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 染色と免疫染色の結果、AMTN および ODAM 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局在が認められた。*A. actinomycetemcomitans* で 15 日間感染し、30 日後のマウスでは、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 日間感染させた直後は、AMTN と FDC-SP の発現増加が観察された。15 日間感染し、30 日後のマウスでは、炎症に伴う内側基板の破壊により、AMTN および FDC-SP の発現は減少したが、ODAM は、8 または 15 日間感染直後と 15 日感染後 30 日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、 $\text{TNF-}\alpha$ で歯肉上皮細胞を刺激すると、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/EBP* β の結合が増加し、FDC-SP の転写が増加することが明らかになった。さらに、接合上皮での FDC-SP、AMTN および ODAM の発現は炎症の進行と時期に伴って変化し、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示唆された。

慢性歯周炎での FDC-SP、AMTN および ODAM の発現の変化は、接合上皮の恒常性の維持や、歯周組織の防御機構に関与することが示唆された。これらの研究成果は、歯周病の予防および治療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は、博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成30年2月22日