

## 論文の内容の要旨

氏名：高井 瑞穂

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$ 1 stimulate amelotin gene expression in gingival epithelial cells

(腫瘍壊死因子  $\alpha$  およびトランスフォーミング増殖因子  $\beta$ 1 は歯肉上皮細胞におけるアメロチン遺伝子発現を促進する)

アメロチン (AMTN) は、近年新たに発見された分泌エナメルタンパク質の 1 つである。AMTN は主にエナメル質形成の成熟期に分泌され、タンパク質発現は成熟期エナメル芽細胞の基底膜および接合上皮の内側基底板に局限していることから、接合上皮と歯質との接着に關与する可能性が示唆されている。接合上皮は軟組織と硬組織の接合部に位置し、ヘミデスマゾーム結合により歯面に付着する特殊な上皮組織であり、歯周組織の健康を維持する役割を担っており、歯周炎の発症および治療において重要な領域であると考えられる。本研究では、歯周組織における AMTN の転写調節機構を解明するため、ヒト歯肉上皮細胞を tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) で、マウス歯肉上皮細胞を transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) でそれぞれ刺激し、AMTN の転写への影響について解析を行った。

ヒト歯肉上皮様細胞株 Ca9-22 および Sa3 と、ヒト唾液腺由来腺癌細胞株 HSY を用いてリアルタイム PCR およびウェスタンブロットを行い、AMTN mRNA およびタンパク質量の変化を解析した。Ca9-22 細胞を濃度の異なる TNF- $\alpha$  で 12 時間刺激すると、AMTN mRNA 量は 1 ng/ml から 50 ng/ml の濃度で有意に増加し、10 ng/ml で最大となった。Ca9-22 細胞および Sa3 細胞を 10 ng/ml TNF- $\alpha$  で刺激すると、AMTN mRNA 量は 6 時間後に増加し、12 および 24 時間後にさらに増加した。HSY 細胞を 10 ng/ml TNF- $\alpha$  で刺激すると、AMTN mRNA 量は 12 時間後に増加し、24 時間後に最大となった。Ca9-22 細胞を TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で刺激すると、AMTN タンパク質量は 6 時間後に増加し、12 および 24 時間後に最大となった。上皮細胞のマーカーである Cytokeratin19 (CK19) のタンパク質量は、TNF- $\alpha$  刺激 12 時間後に増加し 24 時間後に最大となった。

長さの異なるヒト AMTN 遺伝子プロモーター領域を pGL3basic ルシフェラーゼ (LUC) プラスミドに挿入し、-950AMTN (-950~+60)、-769AMTN (-769~+60)、-501AMTN (-501~+60)、-353AMTN (-353~+60)、-211AMTN (-211~+60) および -100AMTN (-100~+60) コンストラクトを作製し、LUC アッセイを行った。-211AMTN、-353AMTN および -501AMTN を Ca9-22 細胞に導入し、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると LUC 活性が上昇し、-353AMTN で転写活性が最大となった。-353AMTN の転写因子結合配列に変異を挿入した -353AMTN mC/EBP1、-353AMTN mC/EBP2 または -353AMTN mYY1 を Ca9-22 細胞に導入し、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で刺激すると、転写活性の上昇は -353AMTN に比べて部分的に抑制され、2 種類の C/EBP 結合配列に変異を挿入した -353AMTN mC/EBP1+mC/EBP2 では、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激による活性の上昇がさらに抑制された。-353AMTN を導入した Ca9-22 細胞にリン酸化阻害剤を作用させ、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、A キナーゼ (KT5720; 100nM)、チロシンキナーゼ (HA; 1  $\mu$ M)、MEK1/2 (U0126; 5  $\mu$ M)、PI3 キナーゼ (LY294002; 10  $\mu$ M)、NF- $\kappa$ B (Triptolide; 100 nM)、p38 (SB203580; 10  $\mu$ M)、および Src チロシンキナーゼ阻害剤 (PP1; 10  $\mu$ M) により転写活性の上昇が抑制された。

ルシフェラーゼアッセイの結果から、-353 から -100 塩基対上流までのヒト AMTN 遺伝子プロモーター配列中に TNF- $\alpha$  に応答する配列が存在すると考えられることから、同領域の転写因子結合配列のオリゴヌクレオチドを合成し、核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイで解析した。Ca9-22 細胞を TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で刺激すると、C/EBP1、C/EBP2 および YY1 配列への核内タンパク質の結合はコントロールに比べて 3 および 6 時間後増加し、12 時間後に最大となった。各結合配列への核内タン

パク質の結合の特異性を解析するため、非標識の40倍濃度の同配列オリゴヌクレオチドでそれぞれ競合させゲルシフトアッセイを行った結果、結合バンドはいずれも消失した。C/EBP1およびC/EBP2配列と核内タンパク質との結合は、抗C/EBP $\beta$ 抗体を加えると部分的に抑制され、YY1配列と核内タンパク質との結合は、抗YY1抗体によりほぼ完全に消失した。

転写因子結合配列と転写因子との結合をクロマチン免疫沈降法(ChIPアッセイ)で解析した。C/EBP1またはC/EBP2配列とC/EBP $\beta$ の結合、およびYY1配列とYY1の結合は、Ca9-22細胞をTNF- $\alpha$ (10 ng/ml)で刺激すると増加し、12および24時間後に最大となった。Ca9-22細胞にKT5720(100 nM)、HA(1  $\mu$ M)、U0126(5  $\mu$ M)、およびLY294002(10  $\mu$ M)を作用させ、TNF- $\alpha$ (10 ng/ml)で12時間刺激を行うと、C/EBP $\beta$ のC/EBP1およびC/EBP2配列への結合とYY1のYY1配列への結合はほぼ完全に抑制された。

マウス歯肉上皮細胞株GE1をTGF $\beta$ 1(10 ng/ml)で刺激するとAMTNおよびLam $\beta$ 3 mRNA量は24時間後に最大となった。CK19 mRNA量はTGF $\beta$ 1(10 ng/ml)で刺激6時間後に減少し、その後経時的に増加して48時間後にコントロールと同レベルまで回復した。Caspase3 mRNA量はTGF $\beta$ 1(10 ng/ml)刺激48時間後に有意に増加した。抗AMTN抗体を使用してGE1細胞を免疫染色した結果、AMTNタンパク質の発現はTGF $\beta$ 1(10 ng/ml)刺激で増加し、主に細胞質で検出された。GE1細胞において、AMTN mRNA量はTGF $\beta$ 1(10 ng/ml、24時間)刺激により増加し、TGF $\beta$ 1阻害剤であるSB525334(1  $\mu$ M)を作用させるとTGF $\beta$ 1刺激による増加は完全に抑制され、U0126(5  $\mu$ M)およびLY294002(10  $\mu$ M)により部分的に抑制された。

長さの異なるマウスAMTN遺伝子プロモーター配列を含むLUCコンストラクトをGE1細胞に導入し、TGF $\beta$ 1(10 ng/ml)で24時間刺激すると、-1651AMTNおよび-2200AMTNの転写活性が上昇した。TGF $\beta$ 1(10 ng/ml)による-1651AMTNの転写活性上昇はU0126およびLY294002により部分的に抑制され、SB525334により完全に抑制された。さらに-1651AMTNおよび-2200AMTNの転写活性はSmad3を同細胞で過剰発現させると増加した。

GE1細胞におけるAMTN mRNA量はTGF $\beta$ 1(10 ng/ml)で24時間刺激すると増加し、Smad3発現プラスミドを導入し刺激を行うとさらに増加した。TUNEL染色の結果、GE1細胞に2および4  $\mu$ g/mlのSmad3発現プラスミドを導入すると、アポトーシスが誘導された。

本研究の結果、ヒト歯肉上皮細胞を炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ で刺激すると、Aキナーゼ、Srcチロシンキナーゼ、MEK1/2、PI3キナーゼ、NF- $\kappa$ Bおよびp38シグナル伝達経路を介し、転写因子C/EBP $\beta$ およびYY1をヒトAMTN遺伝子プロモーター配列中のC/EBP1、C/EBP2およびYY1配列に結合させ、遺伝子発現を増加させることが示唆された。さらに、マウス歯肉上皮細胞においてAMTN遺伝子発現はTGF $\beta$ 1によるアポトーシス誘導に伴って上昇し、Smad3の発現増加によりさらに増加することが明らかとなった。

歯周組織を外界から遮蔽・保護している接合上皮に特異的に発現するタンパク質であるAMTNは、歯周組織の恒常性を維持する役割を担う可能性がある。本研究の結果、歯肉上皮細胞におけるAMTN遺伝子発現はTNF- $\alpha$ およびTGF $\beta$ 1により調節されることが示された。AMTN遺伝子転写調節機構を解明することは、歯周病の発症メカニズムおよび予防の観点から非常に意義深いと考える。