

論文審査の結果の要旨

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- α and transforming growth factor β 1 stimulate amelotin gene expression in gingival epithelial cells

(腫瘍壊死因子 α およびトランスフォーミング増殖因子 β 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)

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

アメロチン (AMTN) は分泌エナメルタンパク質の 1 つで、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関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モゾーム結合により歯面に付着する特殊な上皮組織で、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- α (TNF- α) で、マウス歯肉上皮細胞を transforming growth factor β 1 (TGF β 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。

ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 を濃度の異なる TNF- α 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 細胞を 10 ng/ml TNF- α 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。Ca9-22 細胞を TNF- α (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- α 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、Ca9-22 細胞における LUC アッセイを行った。TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると -211AMTN (-211~+60)、-353AMTN (-353~+60) および -501AMTN (-501~+60) の 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- α (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- α (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 μ M)、MEK1/2 (U0126; 5 μ M)、PI3 キナーゼ (LY294002; 10 μ M)、NF- κ B (Triptolide; 100 nM)、p38 (SB203580; 10 μ M)、および Src チロシンキナーゼ阻害剤 (PP1; 10 μ 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- α 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- α (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。非標識の 40 倍濃度の同配

列オリゴヌクレオチドで競合させゲルシフトアッセイを行った結果、各結合配列への核内タンパク質の結合はいずれも特異的であった。転写因子に対する抗体を用いたスーパーシフトアッセイの結果、C/EBP1 および C/EBP2 配列には C/EBP β が、YY1 配列には YY1 がそれぞれ結合することが明らかとなった。

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 β の結合、および YY1 配列と YY1 の結合は、Ca9-22 細胞を TNF- α (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 μ M)、U0126 (5 μ M)、および LY294002 (10 μ M) を作用させ、TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激を行うと、C/EBP β 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 β 1 (10 ng/ml) で刺激すると AMTN mRNA 量は 24 時間後に最大となった。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 β 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 β 1 (10 ng/ml、24 時間) 刺激により増加し、TGF β 1 阻害剤である SB525334 (1 μ M) を作用させると TGF β 1 刺激による増加は完全に抑制され、U0126 (5 μ M) および LY294002 (10 μ 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 β 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 β 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 β 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 μ 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- α 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- κ B および p38 シグナル伝達経路を介し、転写因子 C/EBP β 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 β 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- α および TGF β 1 により調節されることが示唆された。本研究の成果は、歯周治療および予防の発展に寄与するものである。

よって本論文は、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