

## 論文の内容の要旨

氏名：能田 佳祐

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and TGF $\beta$ 1 regulate mouse amelotin gene transcription in gingival epithelial cells

(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  および TGF $\beta$ 1 は歯肉上皮細胞においてマウスアメルチン遺伝子の転写を調節する)

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上皮組織である。接合上皮中の細胞は、活発な代謝を示し、炎症および外傷などの歯肉損傷の迅速な修復に寄与する。また接合上皮は歯と歯肉を結合することで歯周組織の健康を維持する役割を担っている。

アメルチン (AMTN) は、分泌エナメルタンパク質の1つであり、成熟期の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。AMTNの局在は、接合上皮の歯面への接着因子としての機能を示唆している。

慢性歯周炎は、歯周病原細菌に起因する炎症性疾患であり、歯槽骨吸収、歯肉腫脹、出血、歯の動揺、疼痛および歯の喪失を引き起こす。リポポリサッカライド (LPS) やタンパク質分解酵素などの細菌の産生物質に対する免疫応答や、炎症性サイトカインおよびその他の炎症性メディエーターの産生が歯周炎の破壊に重要な役割を果たしている。インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) は、細胞増殖、分化、アポトーシスおよび歯周病の病態生理に応答する炎症性メディエーターである。歯肉溝滲出液中のIL-1 $\beta$ 濃度は歯周病の重症度を反映し、歯周炎症の臨床パラメーターであるプロービングポケット深さおよびプロービング時の出血よりも感度が高いことが報告されている。腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は、閉経後骨粗鬆症、関節リウマチおよび歯周炎などの多くの疾患での急性および慢性の炎症反応の重要なサイトカインである。以前、我々はAMTN遺伝子発現が、歯肉上皮細胞においてSmad3シグナル伝達経路を介してトランスフォーミング成長因子 $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) によって誘導されるアポトーシスの開始時に一時的に増加することを報告している。また、炎症歯肉中でAMTN遺伝子発現が有意に増加することを報告した。以上の結果は、AMTNが接合上皮の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかしながら、歯肉上皮細胞における炎症性サイトカインによるAMTN遺伝子転写の調節についての報告はない。本研究では、マウス歯肉上皮細胞 (GE1) におけるAMTN遺伝子発現に対するIL-1 $\beta$  およびTNF- $\alpha$  の影響を解析した。さらに、マウス歯肉上皮細胞でのアポトーシスの進行中にTGF $\beta$ 1が誘導するAMTN遺伝子発現が抑制されるメカニズムを解析するため、アポトーシス促進因子であるBaxの過剰発現によるAMTN遺伝子発現の変化を解析した。

IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) またはTNF- $\alpha$  (10 ng/ml) でGE1細胞を刺激すると、刺激後6時間でAMTN mRNA発現量は上昇し、12および24時間後に発現量は最大となった。AMTNタンパク質量はIL-1 $\beta$  (1 ng/ml) およびTNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激6時間後に増加し、12および24時間後に最大となった。-238AMTN (-238~+60)、-460AMTN (-460~+60)、-705AMTN (-705~+60) および-800AMTN (-800~+60) の長さのマウスAMTN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GE1細胞にそれぞれ導入し、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) またはTNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で刺激すると全てのコンストラクトで転写活性は上昇した。マウスAMTN遺伝子プロモーターの-460塩基対上流内のC/EBP1、C/EBP2およびYY1応答配列に3塩基対の変異を挿入した-460AMTN mC/EBP1、-460AMTN mC/EBP2 および-460AMTN mYY1をGE1細胞に導入すると、IL-1 $\beta$  およびTNF- $\alpha$  による転写活性の上昇は部分的に抑制され、-460AMTN mC/EBP1+ mC/EBP2を導入すると転写活性の上昇はほぼ完全に抑制された。-460AMTNを導入したGE1細胞にリン酸化阻害剤を作用させIL-1 $\beta$  またはTNF- $\alpha$  で刺激すると、チロシンキナーゼ (HA)、MEK1/2キナーゼ (U0126)、PI3キナーゼ (LY294002) 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、C/EBP1 と核内タンパク質の結合は IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) または TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激後 12 時間で増加した。C/EBP2 と核内タンパク質の結合は両刺激後 3 時間から増加し、12 時間まで同じレベルを維持した。YY1 と核内タンパク質の結合は両刺激後 6 および 12 時間で増加した。競合ゲルシフトアッセイの結果から、上記 3 つの応答配列と核内タンパク質との結合は特異的であることが確認された。転写因子とマウス AMTN 遺伝子プロモーターの相互作用を明らかにするためにクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を行った。C/EBP1 配列に結合する C/EBP $\beta$  は、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  によって 12 時間で増加し、24 時間で減少した。C/EBP2 配列への C/EBP $\beta$  の結合は IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  刺激後 3 時間で増加し、12 時間で最大となり、24 時間で減少した。YY1 配列への YY1 の結合は IL-1 $\beta$  刺激により 12 時間で増加し、24 時間で減少した。TNF- $\alpha$  刺激では、YY1 への YY1 の結合を 6 時間で増加させ、12 時間および 24 時間で最大となった。IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  刺激後の、C/EBP1、C/EBP2 および YY1 配列への C/EBP $\beta$  および YY1 の結合を調節するシグナル伝達経路を調べるためにリン酸化阻害剤を用いた ChIP アッセイを行った。C/EBP1、C/EBP2 および YY1 配列への C/EBP $\beta$  および YY1 の結合は、HA、U0126 および LY294002 によってほぼ完全に阻害された。

マウス AMTN、Smad3 および Bax mRNA および AMTN タンパク質発現量に対する TGF $\beta$ 1 の影響をリアルタイム PCR およびウエスタンブロットで解析を行った。AMTN mRNA 発現量および AMTN タンパク質は TGF $\beta$  刺激後 24 時間で最大となり、その後減少した。一方 Smad3 および Bax mRNA 発現量は刺激後 72 時間まで持続的に上昇した。TUNEL 染色によるアポトーシス解析より、Bax の過剰発現によりアポトーシスの誘導が認められた。GE1 細胞において Bax を過剰発現させると AMTN mRNA 発現量および転写活性の上昇は抑制された。またウエスタンブロットの結果から Bax の過剰発現は Smad3 のタンパク質発現は抑制しなかった。ChIP アッセイから、Bax の過剰発現は TGF $\beta$ 1 が誘導する Smad3 と Smad 応答配列 (SBE) との結合を抑制した。

以上の結果から、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  が誘導する AMTN 遺伝子の転写に必要なマウス AMTN 遺伝子プロモーター領域は、C/EBP1、C/EBP2 および YY1 配列であることが考えられた。IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  が誘導する AMTN 遺伝子の転写は、チロシンキナーゼ、MEK1/2 および PI3K 阻害剤によって阻害された。さらに、C/EBP $\beta$  および YY1 転写因子は、AMTN 遺伝子転写に対する IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の影響の重要な調節因子であると考えられた。さらに、TGF $\beta$ 1 が誘導する SBE への Smad3 結合を介した AMTN mRNA 発現量の上昇は Bax により阻害されることを明らかとなった。これは、Smad3 と Bax の発現との間の間接的な相互作用に関与するアポトーシスの進行中に負のフィードバック機構の存在を示唆する。Smad3 は、歯肉上皮細胞のアポトーシス期における AMTN 遺伝子発現の安定な調節に重要な役割を果たすことが考えられた。