

## 論文審査の結果の要旨

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)

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

接合上皮は、歯肉とエナメル質との接合部に位置する歯肉上皮であり、接合上皮の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、歯周組織の健康を維持する役割を担っている。

アメルチン (AMTN)は、成熟期のエナメル芽細胞および接合上皮の内側基底板に限局して発現する分泌エナメルタンパク質の1つであり、その局在から、接合上皮の歯面への付着および防御因子としての機能が示唆されている。

慢性歯周炎は、歯周病原細菌の感染により惹起される炎症性疾患である。細菌感染に対する生体の炎症反応は、免疫担当細胞により制御され、歯周組織内で炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼが過剰に産生されると、結合組織の破壊や骨吸収等の臨床症状が生じる。インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )は、歯周病の病態生理にตอบสนอง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等の多くの疾患での急性および慢性炎症反応の重要なサイトカインである。AMTN 遺伝子発現は炎症歯肉中で有意に増加し、歯肉上皮細胞におい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、AMTN 遺伝子発現が一時的に増加することが報告されている。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 遺伝子発現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 6 時間後に AMTN mRNA 量は上昇し、12 および 24 時間後に最大となった。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。-116AMTN (-116~+60)、-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。-460AMTN コンストラクト中の 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、2ヶ所に 3 塩基対ずつの変異を挿入した-460AMTN mC/EBP1+mC/EBP2 を GE1 細胞に

導入すると、転写活性の上昇は完全に抑制された。-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、C/EBP2 および YY1 と核内タンパク質の結合は、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  刺激 12 時間後に増加した。C/EBP1、C/EBP2 および YY1 と核内タンパク質の結合は、40 倍濃度の非標識の同配列をそれぞれ加えると結合バンドは消失した。クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)の結果、C/EBP1、C/EBP2 および YY1 配列への C/EBP $\beta$  および YY1 の結合は、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  刺激 12 時間後に増加した。リン酸化阻害剤を用いた ChIP アッセイの結果、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 によって抑制された。

マウス AMTN、Smad3 および Bax mRNA 量に対する TGF $\beta$ 1 の影響をリアルタイム PCR で解析した結果、AMTN mRNA 量は TGF $\beta$ 1 刺激 24 時間後に最大となり、その後減少した。Smad3 および Bax mRNA 量は、TGF $\beta$ 1 刺激 72 時間まで継続的に上昇した。ウエスタンブロットの結果、AMTN タンパク質量は TGF $\beta$ 1 刺激 48 時間後に最大となった。TUNEL 染色の結果、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 Bax 発現ベクターを導入すると、TGF $\beta$ 1 が誘導する AMTN mRNA 量および AMTN 転写活性の上昇は抑制された。Bax 過剰発現による Smad3、リン酸化 Smad3 および Bax タンパク質発現への影響をウエスタンブロットで解析すると、Bax の過剰発現の結果、Bax タンパク質は核内では発現せず、TGF $\beta$ 1 が誘導する Smad3 およびリン酸化 Smad3 タンパク質発現量の増加を抑制しなかった。ChIP アッセイの結果、Bax 発現ベクターを GE1 細胞に導入すると、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- $\alpha$  はチロシンキナーゼ、MEK および PI3K 経路を介して、C/EBP $\beta$  および YY1 転写因子を誘導し、マウス AMTN 遺伝子プロモーター中の C/EBP1、C/EBP2 および YY1 配列への結合を増加させることで AMTN 遺伝子発現量を上昇させることが明らかになった。また、TGF $\beta$ 1 が誘導する Smad3 と SBE との結合を介した AMTN mRNA 量の上昇は、TGF $\beta$ 1 が誘導する Bax により阻害され、Smad3 と Bax 間には、間接的な抑制作用が存在することを明らかにした。炎症性サイトカインによる AMTN の発現の増加は、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 29 年 1 2 月 2 1 日