

論文審査の結果の要旨

氏名：鶴屋 祐人

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Transcriptional regulation of odontogenic ameloblast-associated protein gene by TNF- α and the effect of miR-200b on TNF- α -induced amelotin gene expression
(TNF- α による ODAM 遺伝子の転写調整と TNF- α 刺激による AMTN 遺伝子発現へのマイクロ RNA-200b の影響)

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

Odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) および Amelotin (AMTN) は、成熟期エナメル芽細胞で発現する分泌エナメルタンパク質で、ODAM は接合上皮で発現し、AMTN は、エナメル芽細胞の基底膜および接合上皮の内側基底膜に局限して発現する。ODAM と AMTN が発現する部位から、両者は接合上皮と歯質の接着に関係することが示唆される。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で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い、歯周炎の発症と進行に重要な役割を果たすと考えられる。

マイクロ RNA (miRNA) は、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に結合することで、遺伝子発現を調節する短い非コード RNA である。miRNA の塩基配列の 5' 末端側から 2~8 番目までの 7 塩基をシード配列と呼び、シード領域と複数のターゲット mRNA の 3'-UTR の塩基対相互作用を通して、部分相補的に結合し、遺伝子発現を抑制する。miRNA の機能は多様で、発生、分化、細胞増殖、炎症、アポトーシスなどの生物学的プロセスに関連する。以前の研究で、日本人における慢性歯周炎患者から採取した炎症歯肉と健常歯肉で発現する miRNA を比較した miRNA マイクロアレイの結果、miR-150、miR-223 および miR-200b が炎症部位で有意に多く発現することを報告した。

本研究では、Ca9-22 ヒト歯肉上皮細胞での tumor necrosis factor- α (TNF- α) による ODAM 遺伝子の転写調整と、TNF- α 刺激による AMTN 遺伝子発現への miR-200b の影響について解析を行った。

Ca9-22 細胞に miR-200b 発現プラスミドを導入し、miR-200b を過剰発現させると、細胞内での miR-200b の発現量が増加した。Ca9-22 細胞を TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると miR-200b の発現が増加した。Ca9-22 細胞を TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激し、miR-200b 発現プラスミドまたは miR-200b 阻害剤を導入すると、TNF- α 刺激で増加した AMTN mRNA 量は、miR-200b 過剰発現で有意に減少し、miR-200b 阻害剤の導入で、有意に増加した。

AMTN の 3'-UTR に miR-200b のシード領域との部分相補配列が 3 カ所認められた (exon9; 1-88、83-707、および 708-1692) ため、これら 3 種類のヒト AMTN 3'-UTR 配列をルシフェラーゼ (LUC) プラスミド (pGL3 basic) の LUC 遺伝子下流に挿入して AMTN 3'-UTR LUC コンストラクトを作成した。3 種類の LUC コンストラクトと miR-200b 発現プラスミドまたはコントロールプラスミドを Ca9-22 細胞に導入し、TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、AMTN 3'-UTR LUC コンストラクトの転写活性は 3 種類とも TNF- α 刺激で上昇し、miR-200b 過剰発現で有意に抑制された。

Ca9-22 細胞を 0.1、1、10 および 50 ng/ml の TNF- α で 12 時間刺激すると、ODAM mRNA 量は全ての濃度で有意に増加し、10 ng/ml で最大となった。Ca9-22 細胞、Sa3 ヒト歯肉上皮細胞および HSY ヒト唾液腺

由来腺癌細胞を TNF- α (10 ng/ml) で 3、6、12 および 24 時間刺激すると、ODAM mRNA 量は全ての時間で有意に増加した。Ca9-22 細胞から総タンパク質を抽出し、ウェスタンブロットで ODA M タンパク質発現量の変化を解析した結果、TNF- α (10 ng/ml) 刺激により、ODAM タンパク質量は 3 時間後に増加し、6、12 および 24 時間後にさらに増加した。Ca9-22 細胞を ODA M 抗体で免疫染色すると、TNF- α (10 ng/ml) 刺激後に、細胞質内での ODA M タンパク質発現増加が認められた。

長さの異なるヒト ODA M 遺伝子プロモーター配列を pGL3 basic LUC プラスミドに挿入し、-85ODA M (-85~+60)、-116ODA M (-116~+60)、-174ODA M (-174~+60)、-200ODA M (-200~+60)、-300ODA M (-300~+60)、-330ODA M (-330~+60)、-480ODA M (-480~+60)、-700ODA M (-700~+60) および-950ODA M (-950~+60) LUC コンストラクトを作製し、LUC アッセイを行った。これらの LUC プラスミドを Ca9-22 細胞に導入し、TNF- α (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、全ての LUC コンストラクトの LUC 活性が有意に上昇し、-330、-480、-700 および-950ODA M の転写活性が最大となった。-85ODA M と-116ODA M、-116ODA M と-174ODA M および-300ODA M と-330ODA M は TNF- α 刺激後の LUC 活性に有意な差が認められたことから、これらのプロモーター配列中に TNF- α 応答配列が存在すると考えられた。TNF- α に対するシグナル伝達経路を解析するために-480ODA M を Ca9-22 細胞に導入し、各種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)、IKK β and α inhibitor (BMS345541; 4 μ M)、IKK β inhibitor (IMD0354; 5 μ M) および NF- κ B (Triptolide; 100 nM) により転写活性の上昇が抑制された。

転写開始点から-330 塩基対上流までのヒト ODA M 遺伝子プロモーター配列中の TNF- α 応答配列と予想されるオリゴヌクレオチドを合成し、経時的に TNF- α (10 ng/ml) で刺激した Ca9-22 細胞からの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。C/EBP1、YY1、C/EBP2 および C/EBP3 配列への Ca9-22 細胞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 時間後に増加し、12 時間後に最大となった。各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ゲルシフトアッセイを行った。結合バンドはいずれも消失したが、C/EBP2 配列への核内タンパク質の結合は、非標識の C/EBP1 で部分的にのみ消失した。C/EBP1、C/EBP2 および C/EBP3 配列と核内タンパク質との結合は、抗 C/EBP β 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 抗体により抑制された。

in vivo での転写因子結合配列と転写因子との結合を解析するため、クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を行った。C/EBP1、C/EBP2 および C/EBP3 配列と C/EBP β の結合、および YY1 配列への YY1 の結合は、Ca9-22 細胞を TNF- α (10 ng/ml) で刺激すると経時的に増加し、12 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 時間刺激すると、C/EBP β の C/EBP1、C/EBP2 および C/EBP3 配列への結合、YY1 の YY1 配列への結合がほぼ完全に抑制された。

本研究の結果、miR-200b は Ca9-22 細胞において、TNF- α 刺激によるヒト AMTN 遺伝子発現の増加を抑制した。Ca9-22 細胞を TNF- α で刺激すると A キナーゼ、チロシンキナーゼ、MEK1/2、PI3 キナーゼおよび NF- κ B 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 ODA M 遺伝子プロモーター配列中の C/EBP1、YY1、C/EBP2 および C/EBP3 配列に結合させ、遺伝子発現を増加させることが明らかとなった。

接合上皮で特異的に発現している AMTN および ODA M は、炎症歯周組織において発現が増加し、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 TNF- α 誘導性 AMTN 遺伝子発現の増加は miR-200b により調節され、ODA M 遺伝子発現は、TNF- α 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病発症の解明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

令和 3 年 12 月 16 日