

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名（本籍） 小 林 冴 子（神奈川県）
博士の専攻分野 博 士（歯 学）
学 位 記 番 号 甲 第 464 号
学位授与年月日 平成 29 年 3 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目 TGF- β 1 Autocrine Signalling and Enamel Matrix Components
(TGF- β 1 のオートクリンシグナル伝達とエナメルマトリックス成分について)
Scientific Reports 6 : 33644, 2016 DOI : 10.1038.
論 文 審 査 委 員 主査 教授 五 味 一 博
副査 教授 山 越 康 雄 副査 教授 朝 田 芳 信

内 容 の 要 旨

【緒 言】

エナメル質形成過程においてエナメルタンパクは重要な役割を有しており、それらはエナメルプロテアーゼによってプロセシングおよび分解を受けることで、最終的にエナメル質から消失していく。さらに形成過程のエナメル質中には生理活性物質であるトランスフォーミング成長因子ベータ 1 (TGF- β 1) も存在しているが、その存在意義については不明である。本研究では、エナメル質形成過程における TGF- β 1 の遺伝子発現、エナメルプロテアーゼによる TGF- β 1 の活性化および不活性化機構、TGF- β 1 とエナメルタンパクとの相互作用について遺伝子レベルおよびタンパクレベルの双方の実験を行って、エナメル質形成における TGF- β 1 の動態を解明することを目的とした。

【方 法】

遺伝子レベル実験は、生後約 5 か月のブタ下顎永久切歯より基質形成期、移行期、成熟期に相当するエナメル器を採取後、トータル RNA を調製し、潜在型 TGF- β 1 (latent TGF- β 1) および I 型 TGF- β 受容体 (TGFBFR1) に対する定量 PCR (qPCR) を行って遺伝子発現を調べた。またエナメルシン (MMP20) およびカリクレイン 4 (KLK4) をそれぞれ基質形成期および成熟期のマーカー遺伝子として用いた。

タンパクレベル実験は、生後約 5 か月のブタ下顎永久第二大臼歯より基質形成期および成熟期に相当する幼若エナメル質および成熟エナメル質を採取後、エナメルタンパク画分を抽出して MMP20, KLK4 を分離精製した。精製した MMP20 および KLK4 をリコンビナント latent TGF- β 1 (rh-latent TGF- β 1) に作用させ、TGF- β 1 活性の変化をヒト歯根膜由来培養細胞 (hPDL 細胞) に対するアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定することで評価した (ALP-HPDL システム)。また、エナメルタンパク抽出画分中に存在する TGF- β 活性も ALP-HPDL システムを用いて測定し、TGF- β と結合しているアメロゲニン (P173, P162, P148, P103) を分離精製した。さらに ELISA にて TGF- β のアイソフォームを特定した。精製した TGF- β ・アメロゲニン複合体に対してさらにリコンビナント TGF- β 1 を結合させ、その最大結合能を ALP-HPDL システムを用いて評価した。また、精製したアメロゲニンのうち、TGF- β と最も多く結合していたアメロゲニンを動的光散乱法 (DLS) を用いて解析し、粒径から算出した分子量を基にして TGF- β ・アメロゲニン複合体の分子状態を調べた。さらに、生後約 5 か月のブタ下顎永久切歯のエナメル器より TGFBFR1 を調製して、蛍光共鳴エネルギー転移ペプチド (FRET ペプチド) と TGF- β ・アメロゲニン複合体と共に作用させて、TGF- β ・アメロゲニン複合体のシグナル伝達を時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法 (TR-FRET) を用いたリン酸化酵素分析にて評価した。

【結 果】

TGF- β 1 および TGFBR1 は移行期および基質形成期においてそれぞれ遺伝子が発現が強く見られたが、全体的にはエナメル質形成を通して発現していることが確認された。また、MMP20 は TGF- β 1 の活性化、KLK4 は不活化にそれぞれ関与していた。次に形成過程にあるエナメル質中に存在する TGF- β のアイソフォームは TGF- β 1 であることが同定された。精製した P173, P162, P148, P103 アメロゲニンは TGF- β 1 と結合しているタイプが存在し、*in vivo* では P103 アメロゲニンが最も多く TGF- β 1 と結合していた。しかしながら、各アメロゲニンが保有している TGF- β 1 に対する最大結合量はほぼ同じであった。P103 アメロゲニン・TGF- β 1 複合体は水溶液中では、三量体の P103 アメロゲニンに 1 分子の TGF- β 1 が結合している分子状態を示し、rh-latent TGF- β 1 のみと比較して KLK4 に対する分解抵抗性を示した。さらにエナメル器の細胞膜画分から抽出された TGFBR1 は P103 アメロゲニン・TGF- β 1 複合体と結合することで FRET ペプチドに対する TR-FRET シグナルを上昇させた。

【考 察】

以上の結果より、TGF- β 1 は潜在型 TGF- β 1 として基質形成期エナメルマトリックス内に合成・分泌され、MMP20 によって活性化された後、P173, P162, P148 の主要アメロゲニンと結合することで活性が維持される。そしてそれら疎水性のアメロゲニン・TGF- β 1 複合体が MMP20 によって水溶性の P103 アメロゲニン・TGF- β 1 複合体にプロセッシングされると、幼若エナメル質中の水相を移動してエナメル芽細胞表面の TGFBR1 に結合してシグナルを伝達することが考えられた。そして移行期および成熟期に合成・分泌される KLK4 によってアメロゲニンが分解されると共に TGF- β 1 も分解され失活していくことが考えられた。

このように本研究では、エナメル質形成過程における TGF- β 1 のオートクリンに関する動態を解明した。

審査の結果の要旨

エナメルタンパク質はエナメル質の形成過程において重要な役割を演じている。TGF- β 1 もこの形成過程においてエナメルタンパクと同時に存在しているが、その存在意義については不明である。本研究では、エナメル質形成過程におけるエナメルプロテアーゼ (MMP20, KLK4) の TGF- β 1 への作用および TGF- β 1 のエナメルタンパクとの相互作用について遺伝子およびタンパクレベルで検討した。

エナメルタンパク画分より MMP20, KLK4 を抽出しリコンビナント latent TGF- β 1 (rh-latent TGF- β 1) に作用させ、TGF- β 1 の活性をアルカリホスファターゼ (ALP) 活性により測定し評価したところ MMP20 は TGF- β 1 の活性化に、KLK4 は不活化にそれぞれ関与することを示した。また、主要エナメルタンパクであるアメロゲニン (P173, P162, P148, P103) を分離精製し TGF- β との結合状態を調べたところ P103 に最も多く TGF- β 1 が結合していた。また、P103 について動的光散乱法 (DLS) を用いて TGF- β ・アメロゲニン複合体の分子状態を調べたところ水溶液中では三量体の P103 アメロゲニンに 1 分子の TGF- β 1 が結合している分子状態を示し活性型リコンビナント TGF- β 1 のみと比較して KLK4 に対する分解抵抗性を示した。さらに、ブタ歯胚のエナメル器より I 型 TGF- β 受容体 (TGFBR1) を調製して、蛍光共鳴エネルギー転移ペプチド (FRET ペプチド) と TGF- β ・アメロゲニン複合体と共に作用させて TGF- β ・アメロゲニン複合体のシグナル伝達を時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法 (TR-FRET) を用いたリン酸化酵素分析で評価したところ TGFBR1 は P103 アメロゲニン・TGF- β 1 複合体と結合することで FRET ペプチドに対する TR-FRET シグナルを上昇させた。

以上より latent TGF- β 1 は MMP20 によって活性化された後、主要アメロゲニンと結合することで活性が維持される。そして疎水性のアメロゲニン・TGF- β 1 複合体が MMP20 によって水溶性の P103 アメロゲニン・TGF- β 1 複合体にプロセッシングされることで、幼若エナメル質中の水相を移動しエナメル芽細胞表面の TGFBR1 に結合してシグナルを伝達することでエナメル形成に関与することが考えられた。

本研究によりエナメル質形成過程における TGF- β 1 のオートクリンに関する動態および役割を明らかにすることができた。

本研究は遺伝以外の因子によるエナメル質形成のメカニズムの存在を示すだけでなく、新たなエナメル質形成機構の解明の進歩につながるものと考えられる。

よって、本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。