

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）	島 崎 絵 美（千葉県）
博士の専攻分野	博 士（歯 学）
学 位 記 番 号	甲 第 468 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 and Physiological Root Resorption of Deciduous Teeth （乳歯生理的歯根吸収の歯根周囲組織における TGF- β の作用） International Journal of Molecular Sciences 第 18 巻 第 1 号 49 頁掲載 平成 29 年 1 月発行
論 文 審 査 委 員	主査 教授 奥 村 敏 副査 教授 山 越 康 雄 副査 教授 朝 田 芳 信

内 容 の 要 旨

【緒 言】

ヒト乳歯生理的歯根吸収歯は後続永久歯との交換のために起こる現象で、吸収の進行には歯根周囲組織が産生する破歯細胞が関与している。破歯細胞は構造的および代謝的特性において破骨細胞と類似した機能を有していることから、破歯細胞の分化も破骨細胞同様に RANK（receptor activator of NF- κ B）とそのリガンドである RANKL によって誘導され、RANKL のデコイ受容体であるオステオプロテゲリン（OPG）によって誘導が抑制されると考えられている。この RANK-RANKL による分化誘導および OPG による分化抑制のバランスは、様々なサイトカインによって制御されていることが知られている。本研究では、サイトカインの一つであるトランスフォーミング成長因子ベータ（TGF- β ）が歯根膜に多く存在していることに着目し、乳歯生理的歯根吸収における TGF- β の動態を調べ、RANK-RANKL および OPG による破歯細胞分化誘導制御を解明することを目的とした。

【方 法】

生後約 5 か月のブタ下顎骨から歯根吸収（R）および非吸収（N）乳切歯を抜去し、歯頸部（1）、歯根部（2）、歯根先端部（3）の周囲軟組織（R1, R2, R3 および N1, N2, N3）を調製し、タンパクレベルおよび遺伝子レベルの双方の実験を行って、TGF- β の動態および破骨細胞の分化誘導について調べた。

タンパクレベル実験は、それぞれの周囲軟組織からタンパク質を TritonX 溶液・NP40 細胞溶解液・SDS 溶液を用いて連続的に抽出し、SDS-電気泳動（SDS-PAGE）によって各画分の抽出タンパク質の比較を行った。また、各画分中の TGF- β 活性をヒト歯根膜細胞由来培養細胞（HPDL 細胞）に対するアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を測定した。一方、破歯細胞の産生能は酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP）活性を測定することで評価した。さらに TGF- β 受容体阻害剤である SB431542 の存在有無の下で、TGF- β 活性を多く有していた抽出画分のそれぞれの試料を RAW264 細胞に添加し、*in vitro* における破骨細胞分化誘導能を産生された TRAP 活性値から評価した。

次に遺伝子レベル実験は、それぞれの周囲軟組織中の TGF- β 遺伝子（TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3）と各種破骨細胞分化促進遺伝子（RANK, RANKL, TRAP, CALCR, NFATc1）および抑制因子遺伝子（OPG）の発現量を定量的 PCR にて調べた。

【結 果】

SDS-PAGE におけるタンパク質の変化は各抽出画分ともに歯根吸収先端部 (R3) 試料に著しい減少が観察された。TritonX 抽出によるタンパク画分では、TGF- β 活性が歯根非吸収試料全般 (N1, N2, N3) において、また、内在性の TRAP 活性が吸収歯根部 (R2) において上昇していた。このタンパク画分を用いた RAW264 細胞から破骨細胞への *in vitro* 分化誘導実験では、各画分中の TGF- β 活性の量に応じた TRAP 活性の産生が見られた。さらに TRAP 活性の産生は SB431542 の存在下では、ほぼ完全に抑制された。次に遺伝子解析では、TGF- β 1 および TGF- β 2 と OPG 遺伝子が歯根非吸収試料全般 (N1, N2, N3) に、TGF- β 3 が吸収歯頸部 (R1) で優位な発現を認めた。破骨細胞マーカーである RANK, RANKL, TRAP, CALCR, NFATc1 遺伝子は吸収歯根部 (R2) および吸収歯根先端部 (R3) で優位に発現が見られた。また、RANKL/OPG 比は歯根吸収の進行に伴って高い値を示した。

【考 察】

タンパクレベル実験において、TGF- β 活性は歯根非吸収試料全般 (N1, N2, N3) に多く見られ、内在性の TRAP 活性が高かった吸収歯根部 (R2) および吸収先端部 (R3) には低かったことより、TGF- β は RANK-RANKL 誘導性の破骨細胞分化の主要因子ではないことが考えられた。このことは TritonX 画分を用いた RAW264 細胞に対する破骨細胞への *in vitro* での分化誘導実験においても、TGF- β 活性の量が少なかった吸収歯根部 (R2)、吸収先端部 (R3) 試料で分化誘導能が低かったことに一致している。また、SB431542 存在下において、それぞれの試料中の分化誘導がほぼ完全に抑制されたことより、破骨細胞分化に影響を与えている TritonX 画分中の主サイトカインが TGF- β であることが考えられた。

遺伝子レベル実験では、TGF- β 1 および TGF- β 2 と OPG 遺伝子が歯根非吸収試料中で優位に発現を示したことより、TGF- β が OPG の遺伝子発現および産生に関わっているかもしれないことが示唆された。そして、RANK, RANKL, TRAP, CALCR, NFATc1 が歯根吸収試料中で優位に発現が認められたことより、TGF- β 以外のサイトカインが歯根吸収に関連する遺伝子の発現を誘導していることが考えられた。以上のことから、生理的歯根吸収における乳歯の歯根周囲軟組織中の TGF- β は、OPG や RANKL の mRNA 発現のタイミングに依存しながら、OPG の産生および RANKL を介した破骨細胞分化に密接に関わっているかもしれない。

審査の結果の要旨

乳歯の歯根吸収過程において歯根周囲組織の破骨細胞の関与が重要である。

島崎絵美氏は

1) トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β) が歯根膜に集積していること。

2) 破骨細胞の分化は RANK (receptor activator of NF- κ B) とそのリガンドの RANKL により誘導され、オステオプロテゲリン (OPG) により誘導が抑制されるというこれまでの研究報告より、乳歯の歯根吸収過程で TGF- β は RANK-RANKL シグナルを介して破骨細胞の分化誘導を制御し、乳歯の歯根吸収に重要な役割を演じているという仮説をたてた。

本研究では、生後5か月のブタ下顎骨から歯根吸収 (R) と非吸収 (N) 乳切歯を抜去し、歯頸部 (1)、歯根部 (2)、歯根先端部 (3) の周囲軟組織 (R1, R2, R3 および N1, N2, N3) を調製して以下の実験を行った。なお TGF- β 活性は、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、破骨細胞の産生能は酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 活性で評価した。

本研究成果より以下の知見を得た。

1) 歯根非吸収歯のすべての領域 (N1, N2, N3) において、同程度の TGF- β 活性上昇が確認された。一方歯根吸収歯の R1 領域では、N 領域と同程度の活性が確認されたが、歯根部側に向かうに従い漸減傾向を示した (R2 > R3)。一方 TRAP 活性は吸収歯根部側で上昇していた (R2 > R3)。

2) Immunosorbent assay (ELISA) で、TGF- β の3種類のサブタイプ発現量を調べたところ、TGF- β 1 は、歯根非吸収歯、歯根吸収歯のいずれにも同程度の発現上昇が確認されたが、TGF- β 2 はいずれにも発現が確認されなかった。TGF- β 3 は歯根吸収歯のみ軽度の発現上昇が確認された (R1 > R2 > R3)。

3) RAW264 細胞に対する破骨細胞への分化誘導実験を行ったところ、TGF- β 活性が少ない歯根吸収歯の歯根部側 (R2/R3) からの抽出サンプルでは、TRAP 活性賦活作用が低下していた。また TGF- β のインヒビター (SB431542) 処理により TRAP 活性の賦活作用は顕著に抑制された。

4) q-PCR で、TGF- β の各サブタイプと OPG 発現量を調べたところ、歯根未吸収歯では、TGF- β 1/ β 2、歯根非吸収歯では TGF- β 3 の高発現が確認された。また OPG 遺伝子は歯根非吸収歯で高発現が確認された。

本研究は、乳歯の歯根吸収過程で TGF- β は RANK-RANKL シグナルを介して破歯細胞の分化誘導を制御し重要であることを分子レベルで解明した貴重な研究である。よって、本論文は博士（歯学）の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。