

## 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) 大久保美羽(東京都)  
 博士の専攻分野 博士(歯学)  
 学位記番号 甲第490号  
 学位授与年月日 平成31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 Potential function of TGF- $\beta$  isoforms in maturation-stage ameloblasts  
 (成熟期エナメル芽細胞における TGF- $\beta$  の潜在的な機能)  
 Journal of Oral Biosciences 第61巻 第1号 43頁～54頁掲載 2019年1月発行  
 論文審査委員 主査 教授 二藤 彰  
 副査 教授 奥村 敏 副査 教授 五味 一博

## 内容の要旨

## 【材料と方法】

(1) *In vivo* における TGF- $\beta$  の活性化

生後5日齢および11日齢の *Mmp20* 野生型マウス (*Mmp20*-WT), *Mmp20* ヘテロノックアウトマウス (*Mmp20*-Het), *Mmp20* ノックアウトマウス (*Mmp20*-KO) の第1大白歯からエナメルタンパクを抽出して, ① SDS-PAGE 上のタンパク質の変化を観察した. 次いで, ② タンパク画分中の TGF- $\beta$  アイソフォーム量を ELISA を用いて測定した. さらに ③ タンパク画分中の TGF- $\beta$  アイソフォームの活性をヒト歯根膜由来培養細胞 (HPDL) に対して上昇したアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性値として評価した.

(2) TGF- $\beta$  アイソフォームの成熟期エナメル芽細胞に及ぼす作用

マウス培養エナメル上皮細胞 (mHAT9d 細胞) に TGF- $\beta$  アイソフォーム ( $\beta$  1, 12, 23) を個別に添加し, 10% ウシ血清を加えた DMEM/F12 培地を用いて 5% CO<sub>2</sub> 空气中 37°C の条件下で 10 日間培養した. ④ mHAT9d 細胞から total RNA を調製し, 定量 PCR を行ってエナメル質の各形成ステージに特有の遺伝子マーカー発現量を確認した. また, ⑤ TGF- $\beta$  アイソフォームのアポトーシスに対する影響を検討する為に, 活性化されたカスパーゼ 3 の分布を免疫染色にて確認した. 次いで, TGF- $\beta$  アイソフォームがエンドサイトーシスに及ぼす作用を検討するために, 生後約5か月のブタ下顎骨第2大白歯より水溶性アメロゲンを精製し, HyLyte Fluor 647 で蛍光標識を行った. ⑥ mHAT9d 細胞に TGF- $\beta$  アイソフォーム ( $\beta$  1,  $\beta$  2,  $\beta$  3) を個別に添加し, 終濃度 1 mg/ml で蛍光標識されたアメロゲンを作用させ, アメロゲンの取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した.

## 【結果および考察】

① SDS-PAGE において, 生後5日齢マウスでは, *Mmp20*-WT と *Mmp20*-Het は, アメロゲンの分解が生じていたが, *Mmp20*-KO は, アメロゲンのオリジナルのスプラシグ産物だけが観察された. 一方11日齢マウスでは, *Mmp20*-WT および *Mmp20*-Het と *Mmp20*-KO では, エナメルタンパクの異なる分解が観察された.

② 生後5日齢, 11日齢マウスともに *Mmp20*-KO における TGF- $\beta$  活性が *Mmp20*-WT や *Mmp20*-Het に比べて減少していた.

③ 形成過程のエナメル質において TGF- $\beta$  のアイソフォームは TGF- $\beta$  1  $\approx$   $\beta$  3 >  $\beta$  2 の順に多く含まれていることが確認できた.

④今回使用した mHAT9d 細胞では、形成期エナメル芽細胞よりも成熟期エナメル芽細胞が合成するタンパク遺伝子の発現を検出した。さらに、それらの多くは TGF- $\beta$ 3 の添加では発現量が低下することが判明した。

⑤ TGF- $\beta$  アイソフォームのエナメル芽細胞のアポトーシスに対する影響は、TGF- $\beta$ 3 添加群においてカスパーゼ3 陽性細胞の割合が優位に高かった。

⑥ 蛍光標識された水溶性アメロゲニンは mHAT9d の細胞内に取り込まれ、その蛍光強度は TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 3 を添加した群において増強した。

以上のことより、幼若エナメル質中の TGF- $\beta$  は *Mmp20* によって活性化され、活性型 TGF- $\beta$  はアイソフォーム特異的に成熟期エナメル芽細胞の遺伝子発現、アポトーシス誘導およびアメロゲニンのエンドサイトーシス誘導を制御することが示唆された。

### 審査の結果の要旨

トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- $\beta$ ) は、歯の形成に関わる重要な生理活性物質であり、哺乳類では3種類のアイソフォーム (TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3) が存在する。 *In vitro* の研究において、幼若エナメル質中の主要アイソフォームである TGF- $\beta$ 1 は、エナメル芽細胞から合成・分泌された後、エナメライシン (*Mmp20*) によって活性化され、水溶性アメロゲニンと結合することで活性を保持しながら、再びエナメル芽細胞にシグナルを伝達するオートクリン機構が解明されている。本研究では、これらの結果から (1) *In vivo* における TGF- $\beta$  の活性化および (2) TGF-T アイソフォームの成熟期エナメル芽細胞に及ぼす作用を解明することを目的とした。

*In vivo* における TGF- $\beta$  の活性化については、*Mmp20* 野生型 (*Mmp20*-Wt), ヘテロ (*Mmp20*-Het), ノックアウトマウス (*Mmp20*-KO) の第1 大白歯からエナメルタンパクを抽出した。 SDS-PAGE 上のタンパク質の変化を観察したところ、*Mmp20*-WT と *Mmp20*-Het は、アメロゲニンの分解が生じていたが、*Mmp20*-KO は、アメロゲニンのオリジナルのスプレッシング産物だけが観察された。*Mmp20*-KO における TGF- $\beta$  活性が *Mmp20*-WT や *Mmp20*-Het に比べて減少していた。形成過程のエナメル質において TGF- $\beta$  のアイソフォームは TGF- $\beta$  1  $\approx$   $\beta$  3  $>$   $\beta$  2 の順に多く含まれていた。

次に TGF- $\beta$  アイソフォームの成熟期エナメル芽細胞に及ぼす作用を検討した。マウス培養エナメル上皮細胞 (mHAT9d 細胞) に TGF- $\beta$  アイソフォーム ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3) を個別に添加し、それぞれの遺伝子発現、アポトーシス、エンドサイトーシスに及ぼす影響をしらべた。 TGF- $\beta$ 3 の添加では成熟期エナメル芽細胞が合成するタンパク遺伝子発現量が低下することが判明した。アポトーシスに対する影響では、TGF- $\beta$ 3 添加群においてカスパーゼ3 陽性細胞の割合が優位に高かった。蛍光標識された水溶性アメロゲニンは mHAT9d の細胞内に取り込まれ、その蛍光強度は TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 3 を添加した群において増強した。以上のことより、幼若エナメル質中の TGF- $\beta$  は *Mmp20* によって活性化され、活性型 TGF- $\beta$  はアイソフォーム特異的に成熟期エナメル芽細胞の遺伝子発現、アポトーシス誘導およびアメロゲニンのエンドサイトーシス誘導を制御することが示唆された。

本研究により、エナメル質分化における TGF- $\beta$  アイソフォームの役割の一端が明らかとなった。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。