

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20630

研究課題名(和文) 歯肉付着上皮のアポトーシスおよび上皮間葉移行(EMT)におけるアメロチンの役割

研究課題名(英文) A role of amelotin in apoptosis and epithelial-mesenchymal transition of gingival junctional epithelium

研究代表者

中山 洋平(NAKAYANA, Yohei)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：30434088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アメロチン(AMTN)は、歯肉接合上皮に局在するエナメルタンパク質であるが、その機能は明らかではない。歯肉接合上皮の恒常性や病態の変化を評価することは、歯周病などに対する生体の応答を理解する上で重要である。今回、歯肉上皮細胞のアポトーシス下でのAMTN遺伝子発現の変化を検索し、Smad3遺伝子欠失マウスにおけるAMTNの局在を観察した。歯肉上皮細胞にTGF- $\beta$ 1刺激によるアポトーシスを誘導させた結果、AMTN mRNA量は一過性に増加した。その転写調節には転写因子であるSmad3の関与が示唆された。したがって、歯肉上皮のアポトーシス時にAMTNは何らかの役割があることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Amelotin (AMTN) is an enamel protein that localized at gingival junctional epithelium (JE), however its function remain unclear. It's important for the understanding of biological response against periodontitis to evaluate homeostasis and pathology of JE. In this study, we examined the change of AMTN gene expression in gingival epithelium induced apoptosis, and observed AMTN localization at JE in Smad3 knockout mice. AMTN mRNA levels were temporally increased at TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis of gingival epithelium. Smad3 was mediated in the transcriptional upregulation. Thus, AMTN might play a role in apoptosis of gingival epithelium.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉接合上皮 アメロチン アポトーシス 慢性歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

アメロチン(AMTN)は、エナメル質形成の分泌期後期および成熟期エナメル芽細胞から分泌されるエナメルタンパク質で、エナメル質の成熟に関与する。私は以前 AMTN 遺伝子過剰発現および欠失マウスを分析し、AMTN 遺伝子過剰発現マウスは、正常マウスに比べ希薄で脆弱なエナメル質構造を呈し、不規則な Tomes 突起、エナメル小柱の走行およびエナメル芽細胞基底層が観察され、付着上皮細胞が不規則に配列することを示した。AMTN 遺伝子欠失マウスにおいては、エナメル質石灰化不全に類似した脆弱なエナメル質および多量の残余したエナメル基質を認めることを報告した。

エナメルタンパク質の機能として、歯周組織発生と再生への関与が考えられている。実際に、エナメルタンパク質はエムドゲイン<sup>®</sup>ゲルとして歯周組織再生療法に臨床応用されているが、成分の詳細や機能は依然として議論的である。AMTN は成熟期エナメル芽細胞基底層のみならず、歯肉接合上皮に局在し、また *in vitro* において、AMTN が骨芽細胞様細胞の骨結節を誘導することから、歯周組織の発生および、エナメル質との接着を含む恒常性の維持に関係がある可能性がある。

歯肉接合上皮は、歯面とヘミデスマゾームで結合し、いわば体外と歯周組織内への入り口を担うバリアーである。その接着は上皮性付着で結合組織性付着よりも脆弱であるが、早い細胞のターンオーバーで恒常性を維持していると考えられている。我々は以前、ヒト炎症時歯肉における AMTN 遺伝子発現の変化を検索し、正常歯肉と比較して炎症性歯肉において AMTN 遺伝子発現が増加することを示した。また炎症性サイトカインに作用させた歯肉線維芽細胞においても、AMTN 遺伝子 mRNA レベルが増加することを確認した。炎症の過程や程度、アポトーシス、上皮間葉移行といった現象と、AMTN 遺伝子の発現および局在の変化は明らかでない。

## 2. 研究の目的

AMTNはエナメル質形成成熟期と歯肉接合上皮に限定して発現することを免疫染色法で示されている。しかし、この限局した

発現を調節する分子メカニズムは明らかではない。転写調節機構を解析することが、エナメル質成熟期および付着上皮に限局して起こる、転写後のペプチド合成およびタンパク質発現の解析に極めて重要であると考えている。プロモーター領域の転写応答配列を分析するにあたり、AMTN遺伝子が内因性に発現している細胞内(歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞)に、AMTN遺伝子のプロモーター領域を含むレポーター遺伝子を遺伝子導入することが有効な手段である。マウスAMTN遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドをヒト歯肉線維芽細胞(HGF)およびマウス歯肉上皮細胞(GE1)に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、インターロイキン1 $\beta$ (IL1 $\beta$ )、腫瘍壊死因子(TNF $\alpha$ )およびプロスタグランジンE2(PGE2)刺激後にAMTN mRNA量が増加することを確認している。また、代表的な歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (P.g菌)感染マウスにおけるAMTN遺伝子の発現変化を調べたところ、感染初期でAMTNタンパク質は歯肉接合上皮で一過性に増加するが、接合上皮の破壊と伴にその局在は消失することを明らかにした。さらに、アポトーシスおよび上皮間葉移行(EMT)を誘導するトランスフォーミング増殖因子1(TGF $\beta$ 1)をGE1細胞に24時間作用させると、AMTN遺伝子発現が増加することをすでに確認している。

付着上皮に発現するタンパク質の発現の変化は、慢性炎症や歯肉切除術後の治癒に焦点をあてていくつか報告がある。ODAMは歯牙移動時や、歯肉切除後の治癒とともにその発現が回復することが報告されている。FDC-SPはLPS処理したラットの慢性歯周炎モデルにおいて、一時的に発現が消失するが、炎症海前後にその発現は回復することが報告されている。最近の研究において、慢性歯周炎時にアポトーシスが引き起こされることや、歯肉増殖症において、Smad2に誘導されるBcl2遺伝子のアポトーシス抑制作用の欠如が歯肉の増殖に関与することが示されている。しかし、これらの分子機構と、AMTNを含む付着上皮に発現

するタンパク質の転写調節機構とを関連つけた報告はない。

今回、炎症時に起こるアポトーシスおよび上皮間葉移行を想定して、トランスフォーミング成長因子 (TGF- $\beta$ 1) 刺激下における AMTN 遺伝子発現の変化とその転写調節機構を解析した。TGF $\beta$ 1 に誘導される Smad3 を含む、さまざまな転写因子がこれらの保存配列に結合することを予想し、AMTN 遺伝子プロモーター中の応答配を同定し、どのような転写因子が結合しているのかを検索した。そして、AMTN 遺伝子発現がどのような転写調節を受けているのかを検索することで、TGF $\beta$ 1 誘導アポトーシスおよび EMT (慢性障害および治癒機転時) における歯肉接合上皮の働きやその恒常性の調節機構について考察した。

### 3. 研究の方法

細胞培養—マウス歯肉上皮細胞(GE1)を、1%牛胎児血清(FBS) および 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む SFM101 細胞培地にてフラスコを用いて培養した。この培養条件下における AMTN 遺伝子発現は、微量ではあるが、歯肉接合上皮に発現する他の遺伝子を含め、その遺伝子発現は Real-time PCR にて確認済みであった。

アポトーシス検出 GE1 細胞に TGF $\beta$ 1(10ng/ml) を経時的に作用させ、ApopLadder Ex kit による DNA 断片化および TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出を行い、GE1 細胞における TGF $\beta$ 1 誘導アポトーシスを評価した。

RNA 抽出—細胞がコンフルエントになった後、TGF $\beta$ 1(10ng/ml)にて経時的に刺激し、細胞を回収して全 RNA を RNA 抽出キット (ISOGEN<sup>®</sup>) にて抽出した。

Real-time PCR—抽出した全 RNA を ExScript RT reagent kit を用いて、cDNA を合成した。cDNA を SYBR Green qPCR Kit を用いて、Real-time PCR を行った。プライマーには歯肉接合上皮のマーカーである AMTN, ラミニン  $\beta$ 3, サイトケラチン 19 (CK19) およびアポトーシスのマーカーであるカスパーゼ 3 を用いた。また、TGF $\beta$ 1 刺激による AMTN 遺伝子の変化に關与する細胞内情報伝達系

を検索する目的で、KT5750(PKA インヒビター), LY249002(PI3-k/Akt インヒビター)および SB525334 (ALK5, TGF $\beta$ R1 インヒビター)を前処理及び同時刺激して用いた。

ルシフェラーゼアッセイ—マウス AMTN 遺伝子プロモーターの転写活性を検索する目的で、ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド (PGL3 promoter および PGL3 basic (Promega)) に、種々の長さにて調節したマウス AMTN 遺伝子プロモーター配列を挿入したコンストラクトを作成した。リポフェクタミン 2000 (Invitrogen life technologies) を用いて、GE1 細胞に導入した。Smad3 過剰発現による AMTN 遺伝子の転写活性を測定する際には、pCMV-SPORT6.0 Smad3 (Thermo Fisher Scientific Biosciences Corp) を同時に遺伝子導入した。

培養後コンフルエントになった細胞に、TGF $\beta$ 1(10ng/ml)刺激 24 時間行った後、細胞溶解にて得た上清を活性の測定に用いた。測定は、上清 20 $\mu$ l とルシフェラーゼ基質 (ピッカジーン; 東洋インキ) 100 $\mu$ l を混合し、ルミノメーター (Acuu FLEX Lumi 400 (ALOKA 社))にて行った。

ChIP アッセイ—*in vitro* における Smad3 と応答配列との結合を裏付けるため、TGF $\beta$ 1(10ng/ml)刺激後の GE1 細胞をホルムアルデヒド固定した後に回収し、ChIP アッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイの結果および、コンセンサス Smad3 応答配列 (SBE) の検索から、SBE を含むプロモーター領域を認識するプライマーを設計した。Smad3 - SBE 配列複合体から DNA 抽出したのち、KAPA Taq<sup>TM</sup> Extra HotStart (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて PCR を行った。

免疫染色法 Smad3 発現による AMTN タンパク質の局在の変化を調べるために、Smad3 遺伝子ノックアウトマウスを用いて免疫染色法を行った。臼歯および切歯を含むマウス下顎骨は、4%PFA にて固定後、種々の濃度のエタノールにて脱水し、パラフィン包埋を行った。4 $\mu$ m 厚で切片を作製した。組

織切片上のAMTNおよびSmad3タンパク質の検出には、EnVision + System HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit or mouse (DAKO)を使用した。

#### 4. 研究成果

TGFβ1誘導アポトーシス初期におけるGE1細胞において、アメロチン遺伝子レベルが増加し、徐々に減少した。その変化はSmad3を介していることを示した。Smad3ノックアウトマウスの歯肉接合上皮のアメロチンタンパク質の局在は正常マウスと比較して、発現レベルが低い傾向にあったが、エナメル芽細胞での発現レベルはほとんど変わらなかった。このことから、アメロチン遺伝子は歯肉接合上皮において、TGFβ1誘導アポトーシス初期に何らかの働きがあることを示唆していた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 3 件)

1

Localization and expression pattern of amelotin, odontogenic ameloblast-associated protein and follicular dendritic cell-secreted protein in the junctional epithelium of inflamed gingiva.

Nakayama Y, Kobayashi R, Matsui S, Matsumura H, Iwai Y, Noda K, Yamazaki M, Kurita-Ochiai T, Yoshimura A, Shinomura T, Ganss B, Ogata Y.

2016, *Odontology* Nov 2. [Epub ahead of print] 査読あり

2

Clinical Usefulness of a Novel Immunochromatographic Detection Device for *Porphyromonas Gingivalis* in Evaluating the Effects of Scaling and Root Planing and Local Antimicrobial Therapy.

Nakayama Y, Ogata Y, Hiromatsu Y, Imamura K, Suzuki E, Saito A, Shirakawa S, Nagano T, Gomi K, Morozumi T, Watanabe K, Akiishi K, Yoshie H.

2016, *J Periodontol.* 87, 1238-47 査読あり

3

Amelotin gene expression is temporarily being upregulated at the initiation of apoptosis induced by TGFβ1 in mouse gingival epithelial cells.

Nakayama Y, Matsui S, Noda K, Yamazaki M, Iwai Y, Matsumura H, Izawa T, Tanaka E, Ganss B, Ogata Y.

2016. *Apoptosis.* 21, 1057-1070. 査読あり

##### [学会発表](計 3 件)

1

中山洋平, 松井沙莉, 能田佳祐, 山崎瑞穂, 岩井泰伸, 松村浩禎, 小方頼昌, 歯肉上皮細胞におけるTGFβ1によるアメロチン遺伝子発現の調節, 日本歯科保存学会, 2016年度春季学術大会, 2016年6月9日, 「栃木県総合文化センター(栃木県, 宇都宮市)」

2

Nakayama Y, Kobayashi R, Matsui S, Matsumura H, Iwai Y, Noda K, Yamazaki M, Kurita-Ochiai T, Yoshimura A, Shinomura T, Ganss B, Ogata Y., Regulation of junctional epithelial relative gene in inflammation, Japanese Association for Dental Research, 2015年10月30日, 「福岡国際会議場(福岡県・福岡市)」

3

Nakayama Y, Kobayashi R, Matsui S, Matsumura H, Iwai Y, Noda K, Yamazaki M, Kurita-Ochiai T, Yoshimura A, Shinomura T, Ganss B, Ogata Y., Lipopolysaccharide regulate amelotin gene transcription in gingival epithelial cells and amelotin protein localization in inflamed gingiva, EuroPerio8, 2015年6月5日, 「London (UK)」

##### [図書](計 0 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中山 洋平 (NAKAYAMA Yohei)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号: 30434088