

令和元年6月20日現在

機関番号：32710

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07198

研究課題名(和文) TGF-によるエナメル芽細胞の分化誘導及びアポトーシス誘導研究

研究課題名(英文) Induction of apoptosis by TGF-beta isoforms in amelogenesis

研究代表者

小林 冴子 (Kobayashi, Saeko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90804534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、エナメル質形成過程におけるTGF-の役割について解明することである。マウス由来のエナメル上皮細胞(mHAT9d)を用いて行ったPCRより、TGF-アイソフォームの添加によって成熟期エナメルタンパク質関連遺伝子の優位な発現上昇を認めた。さらに、TGF-アイソフォームの添加でカスパーゼ-3およびDNA断片の有意な上昇が認められ、その分布には相同性が認められた。TGFは複雑な生物学的機能を働かせるためにアイソフォーム特異的な方法による調整能を有しており、細胞増殖、さらに成熟期でのエナメル芽細胞のアポトーシス誘導について調整している可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではエナメル質形成過程におけるTGF-の役割について追究を行った。TGF-がアポトーシス誘導能を有する可能性を示唆するだけでなく、アイソフォーム特異的な発現の時期や分布があること、さらにそれぞれに違う役割を有している可能性を見出した。生理活性物質に注目した研究は、正常なエナメル質の形成メカニズムを知ることのみならず、歯周組織やエナメル質の再生医療への大きな足掛かりになると期待している。

研究成果の概要(英文)：Objectives are to elucidate it about how role of TGF- isoforms during enamel formation. We were using a dental epithelial cell line derived from the apical bud of a mouse incisor (mHAT9d cells). We prepared mRNAs from culture supernatant of mHAT9d for Quantitative PCR Analysis of three TGF- isoforms and several enamel proteins. TGF- isoforms significantly upregulated the mRNA level of gene expression of related genes for maturation-stage ameloblasts in mHAT9d cells. Furthermore, the total number of caspase-3-positive apoptotic events and amount of ssDNA were significantly rose and there was the homogeneity about their distribution in three TGF- isoforms. TGF- is regulated in an isoform-specific manner to exert multiple biological functions such as cell proliferation, gene expression and apoptosis in maturation-stage ameloblasts.

研究分野：小児歯科学

キーワード：TGF- エナメル質 エナメルタンパク質 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor (TGF-)は全身の様々な細胞から産生されるサイトカインの一つで、細胞表面に存在する膜型受容体に結合し Smad 活性化を主としたシグナル伝達を介して様々な生理作用を調整している。この TGF- が、歯牙エナメル質形成過程においてもエナメル芽細胞によって合成・分泌されることが報告されている。しかしその動態や具体的な役割については解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は正常なエナメル質形成における TGF- の役割について注目し、形成途中のエナメル芽細胞へ及ぼすシグナルの解明を目指すものである。複雑な TGF- の動態を理解しその役割について追究することを通じて、歯牙硬組織形成の正常発育メカニズムに知見を得るとともに、未だ不明な点の多いエナメル質形成不全の病態の解明及びエナメル質再生治療法の構築を目指すものである。

3. 研究の方法

エナメル質形成過程における TGF- の役割を解明するため、本研究計画では以下の項目を掲げた。

(1) マウスを用い、エナメル上皮幹細胞由来のエナメル上皮細胞株 (mHAT-9d) の培養および PCR 法を用いた特性 (成熟ステージ) の同定。

(2) (1)の結果を踏まえ、TGF- 1、2、3 の添加による細胞分化誘導を遺伝子発現の変化や形態変化によって観察する、またはアポトーシス誘導の可能性について検討する。

(3) マウス切歯に発現している TGF- アイソフォームの局在を組織学的に観察する

4. 研究成果

(1) mHAT-9d の細胞特性について

mHAT-9d を用いて、培養上清からトータル RNA を抽出し各関連遺伝子の発現について定量 PCR (qPCR) を行ったところ、TGF- アイソフォームの遺伝子発現量は 2 > 1 > 3 の順で高かった。また基質形成期エナメルタンパク関連遺伝子である *Mmp20*、*Ame1*、*Enam*、*Ambn* の発現はほとんど検出されず、成熟期エナメルタンパク関連遺伝子である *Klk4*、*Amtn*、*Odam*、*Fam83h*、*Wdr72*、*Car2*、*Alp*、*Atp6v1e1* の発現を認めた。さらに興味深いことに TGF- アイソフォームの添加によってそれらの発現は影響を受け、各アイソフォームによって分布が異なった。特徴として TGF- 1 および TGF- 2 は、成熟期エナメルタンパク関連遺伝子のほとんどの発現を上昇させ、TGF- 3 は減少させる傾向があった (表 1)。

表 1 TGF- 添加後の遺伝子発現の変化

P<0.05, Arrow indicates ↑:up-regulation, ↓:down-regulation

	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3
<i>Klk4</i>	↑	↑	↑
<i>Amtn</i>	↑	↑	
<i>Odam</i>			↓
<i>Fam83h</i>			↓
<i>Wdr72</i>			↓
<i>Car2</i>	↓	↓	↓
<i>Alp</i>			↓
<i>Atp6v1e1</i>			↓

(2) TGF- 1、2、3 の添加によるアポトーシス誘導について

(1)の結果より今回使用した mHAT-9d はエナメル芽細胞の成熟期前期の特徴を有し、TGF- はアイソフォーム特異的に遺伝子発現を調整し得る可能性を示唆した。これを踏まえ、アポトーシスについて注目するため、以下の 2 項目について検討を行った。

同細胞へ TGF- アイソフォームをそれぞれ添加し Caspase-3 抗体を用いた免疫染色を行う。

ELISA を用いてアポトーシスにより生じている ssDNA の定量を行う。

結果 TGF- アイソフォームの添加により、全てのサンプルでコントロール群と比較して Caspase-3 の有意な上昇が認められ、TGF- 1 と TGF- 2 ではほぼ同一値を示したが、TGF- 3 ではそれらの 1.5 ~ 2 倍に高い値を示し、コントロール群と比べ約 4 倍の値となった (図 1)。また組織学的観察においても典型的な細胞死像を得た。

結果 ELISA を用いた ssDNA の定量では、無添加の対照群と比較し、TGF- アイソフォームの添加により全てのサンプルで優位に高い値を示した。

以上の結果より、形成過程のマウスエナメル芽細胞において TGF- 1、2、3 が発現し、これらはエナメル芽細胞のアポトーシス誘導に関

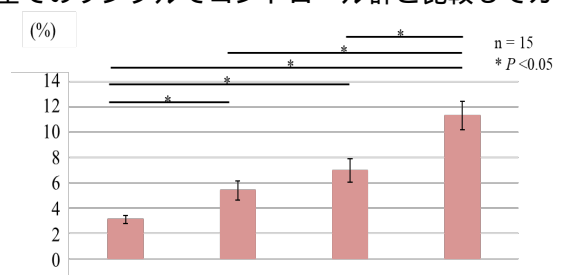


図 1 Caspase-3 抗体に陽性な細胞の割合

わる重要な因子であることが示唆された。

(3) マウス切歯の組織学的観察

各 TGF- β アイソフォームの局在を *in vivo* で観察するために、マウス切歯の組織学的観察を行った。TGF- β 1 および 2 は基質形成期から移行期にかけて強い分布を認め、それと比較すると TGF- β 3 は分泌期から成熟期に分布している所見を得た。

これまでの結果より、TGF- β アイソフォームがアポトーシス誘導能を有する可能性を示唆するだけでなく、エナメル質形成過程において TGF- β アイソフォームは発現の時期や分布が異なり、それぞれに違う役割を有している可能性を見出した。生理活性物質に注目した研究は、正常なエナメル質の形成メカニズムを知ることのみならず、歯周組織やエナメル質の再生医療への大きな足掛かりになると期待している。今後は TGF- β アイソフォームの役割についてさらなる解明が課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Okubo M, Chiba R, Karakida T, Yamazaki H, Yamamoto R, Kobayashi S, Niwa T, Margolis HC, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K. Potential function of TGF- β isoforms in maturation-stage ameloblasts. *J Oral Biosci.*; 61, (1), 43-54 Mar. 2019, DOI: 10.1016/j.job.2018.12.002 査読あり

Kobayashi S, Yamakoshi Y, and Asada Y. TGF- β autocrine signaling at secretory-stage enamel. *J Oral Biosci.*; 60, (3), 70-75, Sep. 2018, DOI: 10.1016/j.job.2018.05.001 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

Kobayashi-Kinoshita S, Okubo M, Chiba R, Yamamoto R, Yamakoshi Y, and Asada Y. Potential Function of TGF- β isoforms in maturation-stage ameloblasts. IADR Annual Meeting. Vancouver CAN 19-22 June 2019

大久保水羽、千葉理沙子、唐木田丈夫、山本竜司、小林冴子、長野孝俊、五味一博、山越康雄 TGF- β signaling during amelogenesis (エナメル質形成過程における TGF- β のシグナル伝達) 第 60 回歯科基礎医学会学術大会 福岡 2018 年 9 月 5 日 - 9 月 7 日

小林冴子、山越康雄、朝田芳信 Induction of apoptosis by TGF- β isoforms in amelogenesis (エナメル質形成過程における TGF- β によるアポトーシス誘導について) 第 56 回日本小児歯科学会大会 大阪 2018 年 5 月 10 日 - 11 日

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。