

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11975

研究課題名（和文）エナメル質形成におけるTGF- β 1の役割と機能解明

研究課題名（英文）Functional role of Transforming growth factor beta during enamel formation

研究代表者

朝田 芳信（ASADA, YOSHINOBU）

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20184145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：エナメル質形成過程に認められるトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF- β)に注目し、その役割と機能解明を目指し、主にTGF- β 1のタンパク質動態について調べた。これまでに、エナメル芽細胞によるTGF- β 1のオートクリン機構と、エナメルマトリックス内でTGF- β 1がアメロゲニン断片(Amel)と複合体を形成することを解明した。またTGF- β 1の役割についてエナメル芽細胞のアポトーシス誘導、アメロゲニンのエンドサイトーシス、および上皮間葉転換誘導の可能性を見出している。さらにこれらの働きに及ぼす影響はTGF- β アイソフォーム間(1、2、3)で違いを示すことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、正常なエナメル質形成のメカニズム解明に迫ることのみならず、Amel-TGF- β 複合体を応用した新たな歯科再生医療技術の構築が十分に考えられ、学術的および社会的意義は高い。またTGF- β アイソフォーム間による影響を検証することで、形成不全や腫瘍化に至る異常なシグナルについて知る可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：We focused on transforming growth factor beta (TGF- β), which is found in the process of enamel formation, to elucidate its role and function, and mainly investigated the protein dynamics of TGF- β 1. We have elucidated the autocrine mechanism of TGF- β 1 by ameloblasts and the complex formation of TGF- β 1 with amelogenin fragments in the enamel matrix. We have also identified possible roles for TGF- β 1 in the induction of apoptosis in ameloblasts, endocytosis of amelogenin, and induction of epithelial-mesenchymal transition. Furthermore, we found that the effects on these functions differ among TGF- β isoforms (1, 2, and 3).

研究分野：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：エナメル質 幼若エナメル質 エナメルタンパク質 生理活性物質 TGF- β アメロゲニン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 正常なエナメル質形成過程において、エナメルマトリックス内には様々なエナメルタンパク質およびプロテアーゼが合成分泌されるが、生理活性物質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) がエナメル質形成においてエナメル芽細胞によって合成・分泌されることが知られている¹⁾。TGF-β のアイソフォームのうち、TGF-β 1 はタンパク分解酵素であるエナメリシン (MMP20) とカリクレイン 4 (KLK4) 両方の mRNA の発現を制御していることが知られており、さらに TGF-β 1 は KLK 4 の分泌を通してエナメル質の石灰化や成熟を制御し、成熟期エナメル器ではエナメル芽細胞のアポトーシスを引き起こさせる可能性が報告されている²⁾。また、基質形成期以前の前エナメル芽細胞での TGF-β 1 の過剰発現は異常なエナメル質石灰化パターンを示すことが報告されている³⁾。これまでのエナメル質形成における TGF-β 関連の研究のほとんどは遺伝子レベルでの実地に留まっており、その動態や機能については解明されていなかった。

(2) 我々は TGF-β がブタ象牙質中にも存在し、その活性は象牙質中で最も多い非コラーゲン性タンパク質である象牙質シアロタンパク質や象牙質リンタンパク質と結合することで活性が保持されることを明らかにした⁴⁾。さらに TGF-β はブタ基質形成期および成熟期エナメル質中に存在し、ヒト歯根膜細胞 (PDL 細胞) に対してアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を上昇させることを見出したが (図 1)、それらの分離精製はまだされておらず、アイソフォームも特定されていなかった。そこで我々は、エナメル質中に存在する TGF-β がエナメル質形成過程において様々なタンパク質との相互作用を有し、エナメル芽細胞膜上に存在する TGF-β 受容体に結合してシグナル伝達を調節するという仮説を立てた。

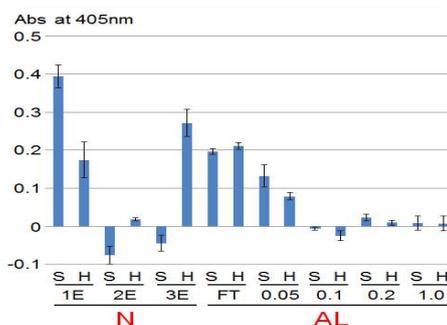


図 1: 幼若 (S) と成熟 (H) エナメルタンパク質画分の TGF-β 様活性分布

2. 研究の目的

本研究は上記仮説の検証を行い、エナメル質形成過程における複雑な TGF-β の動態および機能を遺伝子発現、組織学的考察、さらにタンパク質レベルで解明することを目的とする。そして、得られた分子生物学的情報から、ヒトのエナメル質または歯周組織の再生に寄与する歯科医療技術の基盤構築を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) エナメル質形成過程における TGF-β 1 遺伝子の合成・発現量の測定

基質形成期、移行期、成熟期に相当する切歯エナメル芽細胞 (図 2 a) 中の TGF-β 1 および TGF-β I 型受容体 (TGFBR1) の遺伝子発現量を解析した。

(2) ブタエナメル質抽出タンパク質画分から生理活性物質を分離して同定

第二大臼歯歯胚より基質形成期及び成熟期エナメル質を削り取り (図 2 b)、タンパク質画分を連続的に抽出・分画した。さらに生理活性物質を含む画分中に存在する主要タンパク質を同定した。

(3) TGF-β 1 の活性化と不活性化の検討

リコンビナント前駆体 TGF-β 1 (latent TGF-β 1) に対して、エナメル基質より精製した MMP20 と KLK4 を作用させ、活性化の影響を測定した。

(4) in vitro 及び in vivo における TGF-β 1 とエナメルタンパク質間相互作用の多角的解明

ELISA 法を利用した TGF-β 1 とエナメルタンパク質との in vivo 結合同定実験を行った。

(5) アメロゲニン-TGF-β 1 複合体と TGFBR1 のリン酸化酵素アッセイ

ブタ切歯エナメル芽細胞から TGFBR1 を抽出し、エナメルタンパク質-TGF-β 1 複合体と TGFBR1 とのシグナル伝達について検討した。

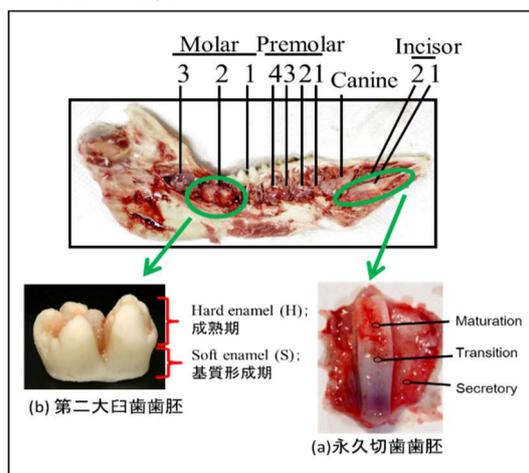


図 2: 生後約 5 か月ブタ下顎骨及び歯胚

(6) TGF アイソフォーム間における遺伝子発現、アポトーシス、アメロゲニンのエンドサイトーシスの影響

マウス由来エナメル上皮細胞 (mHAT9d) を用いてエナメル質形成関連遺伝子の発現、エナメル芽細胞のアポトーシスの差異、およびアメロゲニンのエンドサイトーシスの影響を調べた。

(7) TGF アイソフォーム間におけるエナメル上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) への形態変化、mHAT9d を用いておよび EMT 関連遺伝子の網羅的解析
TGF β アイソフォームの存在下または非存在下で EMT への形態変化、次世代シーケンシング (NGS) による EMT 関連遺伝子の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 本研究では主にブタ幼若エナメル質を用いた実験を行い、①TGF- β 1 が基質形成期エナメル芽細胞より不活性型として合成分泌された後、②MMP20 によって活性化されること、③同じく MMP20 によってプロセッシングされたアメロゲニン断片と複合体を形成しその活性を維持すること、④アメロゲニン-TGF- β 1 複合体は受容体である TGFBR1 に結合し、シグナル伝達が行われ、⑤成熟期には KLK4 によってアメロゲニンとともに分解されることを解明した。以上正常なエナメル質形成過程における TGF- β の動態について新たな知見を得て、“エナメル芽細胞による TGF- β 1 のオートクリン機構”としてまとめた (図3)。

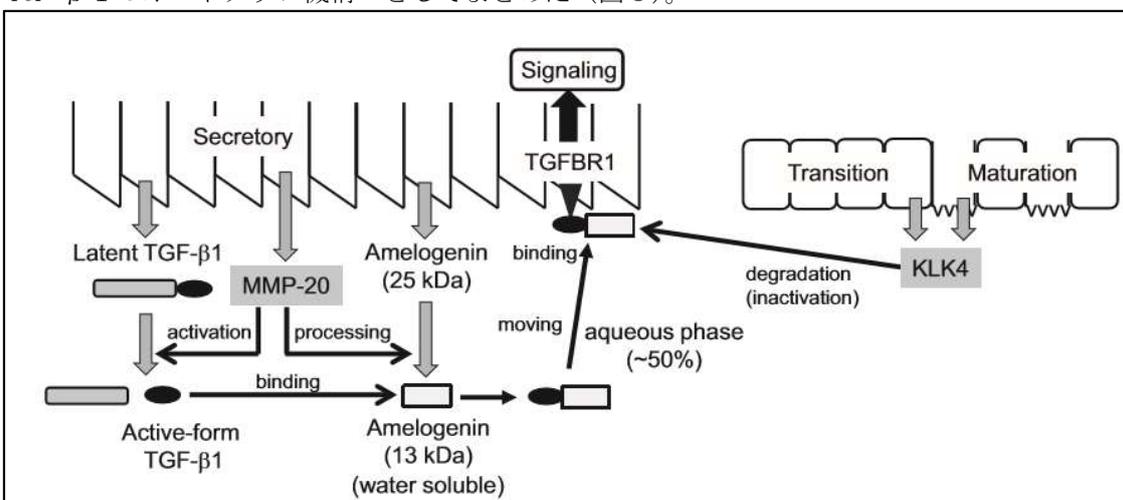


図3：エナメル芽細胞による TGF- β 1 のオートクリン機構

(2) さらに我々は、TGF- β アイソフォーム (β 1, β 2, β 3) に着目し、①エナメル芽細胞のアポトーシス誘導、②アメロゲニンのエンドサイトーシス、および③EMT への形態変化の可能性について見出した。これらの役割においては TGF- β アイソフォーム間に異なる影響を示すことが判明した。すなわち①②③のいずれについても、TGF- β 1 および β 3 で培養した mHAT9d 細胞において、 β 2 で培養した場合と比較しその働きが優位に亢進する結果を得ている。

図4は各 TGF- β アイソフォーム存在下で10日間培養した mHAT9d 細胞のロードミン・ファロイジン染色と DAPI 染色の merge した画像を示す。TGF- β なしで培養した control と比較すると、TGF- β 1 および TGF- β 3 で培養した細胞では上皮細胞の輪郭が不規則になり、細胞質突起を有した紡錘状の細胞形態に変化したものが観察され、EMT が生じたが、TGF- β 2 では観察されなかった。また EMT を生じた mHAT9d 細胞では上皮系および間葉系マーカー遺伝子の両方の発現が認められた。NGS 解析では、EMT に関連する TGF- β シグナル経路として ERK および Rho が候補として挙げられた。

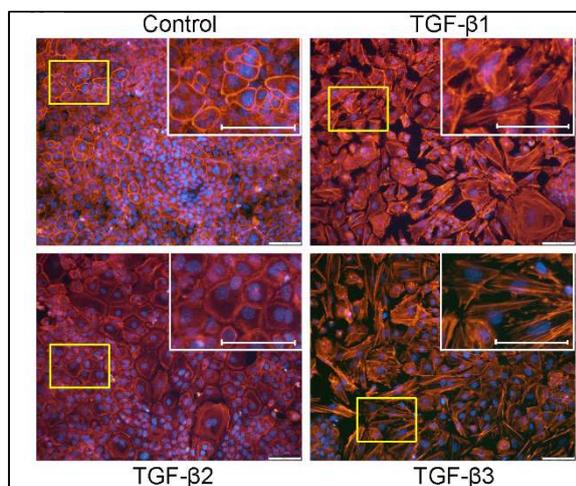


図4：mHAT9d 細胞の EMT に及ぼす TGF- β アイソフォームの影響

<引用文献>

- 1). Sassa Benedete AP, *et al.* Expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 in human developing teeth: immunolocalization according to the odontogenesis phases. *Pediatric and developmental pathology: the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 11, 206-212 (2008).
- 2). Tsuchiya M, *et al.* Transforming growth factor-beta1 expression is up-regulated in maturation-stage enamel organ and may induce ameloblast apoptosis. *Eur J Oral Sci* 117, 105-112 (2009).
- 3). Haruyama N, *et al.* Overexpression of transforming growth factor-beta1 in teeth results in detachment of ameloblasts and enamel defects. *Eur J Oral Sci* 114 Suppl 1, 30-34; discussion 39-41, 379 (2006).
- 4). Yamakoshi Y, *et al.* DPP and DSP are necessary for maintaining TGF-beta1 activity in dentin. *J Dent Res.* 93(7):671-677 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi S, Yamakoshi Y, and Asada Y.	4. 巻 60, (3)
2. 論文標題 TGF- autocrine signaling at secretory-stage enamel.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Biosci.	6. 最初と最後の頁 70-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 KOBAYASHI, M. OKUBO, R. CHIBA, R. YAMAMOTO, Y. YAMAKOSHI and Y. ASADA
2. 発表標題 Potential Function of TGF- Isoforms in Maturation-stage Ameloblasts
3. 学会等名 97 th General Session of the IADR Vancouver, BC, Canada（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川友里, 唐木田丈夫, 小林冴子, 山越康雄, 朝田芳信
2. 発表標題 TGF -アイソフォームによる成熟期エナメルタンパク遺伝子発現の制御
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山越 康雄 (YAMAKOSHI YASUO) (20182470)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 竜司 (YAMAMOTO RYUJI) (20410053)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	
研究分担者	唐木田 丈夫 (KARAKIDA TAKEO) (40367305)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	
研究分担者	小林 冴子 (KOBAYASHI SAEKO) (90804534)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関