

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862059

研究課題名(和文)炎症性歯肉付着上皮におけるアメロチンの役割

研究課題名(英文)A role of amelotin in inflamed gingival junctional epithelium

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：アメロチンはエナメル質形成の成熟期においてエナメルが細胞から分泌されるが、歯牙萌出後の歯肉付着上皮にも局在することから、歯周組織の恒常性にも関与する可能性があると考えられた。そこで今回、歯肉の炎症時におけるアメロチン遺伝子発現の変化を調べた。

歯周炎患者から採取した上皮を含む肉芽組織では、アメロチン遺伝子レベルが増加し、アメロチンタンパク質の局在は正常歯周組織組と比較してやや広範囲に広がっていた。歯肉線維芽細胞に炎症性サイトカインを作用させると、アメロチン遺伝子の発現レベルの増加と転写活性の増加を認めた。このことから、アメロチン遺伝子は炎症時に何らかの働きがあることを示唆していた。

研究成果の概要(英文)：Amelotin (Amtn) is secreted by ameloblasts at maturation stage of enamel formation, the expression persists at junctional epithelium after tooth eruption. Therefore it thought that Amtn might be associated with the homeostasis of periodontal tissue. In this study, we investigated the change of Amtn expression in inflammation using human gingival tissue and human fibroblasts (HGFs) from patients with periodontitis or healthy.

In the inflamed gingival tissue from patients with periodontitis, Amtn RNA expression levels were increased and Amtn localization was slightly spread compared with healthy gingiva. Moreover Amtn RNA levels and transcriptional activity of Amtn gene were increased by proinflammatory cytokines in HGFs. Thus they indicated that Amtn might play a role at junctional epithelium in inflammation.

研究分野：歯周病学

キーワード：アメロチン 歯周組織 歯肉付着上皮

1. 研究開始当初の背景

エナメルタンパク質の主な働きとして、エナメル質の形成および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®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。近年、エナメルタンパク質の1つとしてアメリチン(AMTN)が同定された。AMTNは主にエナメル質形成分泌期後期および成熟期のエナメル芽細胞から分泌され、成熟過程のエナメル質に隣接するエナメル芽細胞基底層と歯肉付着上皮に局在している。AMTN遺伝子過剰発現および欠失マウスを分析した結果、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が分かった。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、免疫染色法の結果において、カリクレイン4(KLK4)の局在が遅延することから、エナメル質の成熟に不可欠であるKLK4の動態および分解されたエナメルタンパク質のエナメル芽細胞への再取り込みに対して、AMTNが関与することが考えられた。

以上のことから、AMTNはエナメル質の成熟に深く関与することが考えられ、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。しかし、他のエナメルタンパク質と歯周組織に関するいくつかの報告はあるが、歯周組織とエナメル質との接着を担う付着上皮におけるAMTNの分子機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

AMTNはエナメル質形成成熟期と歯肉付着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、目的遺伝子(AMTN)が内因性に発現している細胞内(歯肉線維芽細胞)に、目的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として知られている。私は今までに骨シアロタンパク質の転写調節機構を調べ、さまざまな雑誌にその実績が投稿されてきた経験を活かし、エナメル質成熟期における転写調節を調べるため、マウスエナメル芽細胞(ALC細胞)を用いて、既にAMTN遺伝子プロモーター中の応答配列と転写因子の関与を調べている。そして歯肉線維芽細胞を培養し、インターロイキン1 β (IL1 β)、インターロイキン6(IL6)、腫瘍壊死因子(TNF α)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。

そして我々は、MatInspector分析ソフトを用いた生物情報処理分析により、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それを介しているのかを検索している。そして今回、AMTN遺伝子発現がどのような転写調節を受けているかを検索することで、炎症時や歯周組織再生時における歯肉付着上皮の働きやその恒常性の調節機構の解析に役立てることができる考えた。

エナメルタンパク質の大まかな成分は既知であるが、それらの転写調節機構の分析はあまり行われていない。エナメルタンパク質の約90%を占めるアメリジェニン、エナメル質形成の初期にエナメル芽細胞から分泌され、その遺伝子欠失マウスや遺伝子変位マウスはエナメル質形成不全症を呈することが知られており、その転写調節機構の分析においては、Dlx2、Msx2およびC/EBP α などが関与することが報告されている。しかしながら、これらの報告は主にエナメル芽細胞分泌期に焦点を当てたものであり、報告されている転写因子の多くは、石灰化組織の分化発生

に大きく関わるものがほとんどであり、付着上皮の動態を考察するものとは異なると思われる。すなわち、これらの転写因子が同様に AMTN 遺伝子プロモーターに結合するかどうか、あるいは同様に結合して類似した転写調節を担うのかは研究されていない。また歯周組織の治癒過程において、AMEL およびアメロプラスチン(AMBN)の発現が増加するという報告もある。さらに、AMTN 同様に付着上皮にも発現する ODAM/APIN は、歯牙移動時や歯肉切除後の治癒過程でマラッセの上皮遺残での発現が増加することが報告されている。しかし、ODAM/APIN 遺伝子プロモーターに Runx2 が結合すること報告されているが、これも付着上皮での機能を考慮したものではない。また近年、歯周組織の結合組織性付着による治癒過程において、一過性の上皮性付着の必要性が報告されている。

つまり、歯肉線維芽細胞を用いて、*in vitro* の解析に重要である AMTN のプロモーター領域に結合する転写因子およびその応答配列を同定することが、歯肉付着上皮細胞の新しい分子機構の解明に繋がると考えられ、これらの技術および成果は、付着上皮の恒常性や歯周組織の治癒や再生過程における AMTN の機能の解析にも応用できると思われる。

3. 研究の方法

細胞培養—ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を、5%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 D-MEM 細胞培地にてフラスコを用いて培養する。この培養条件下において HGF から AMTN の発現は、微量ではあるが、認められることは既に Real-time PCR にて確認済みであった。

RNA 抽出—細胞がコンフルエントになった後、IL1 β 、IL6、TNF α および PGE2 にて刺激 12 時間後、細胞を回収し、全 RNA を全 RNA を RNA 抽出キット (ISOGEN[®]) 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 を合成する。cDNA を SYBR Green qPCR Kit を用いて、Real-time PCR を行う。プライマーは分泌

期エナメルタンパク質のマーカである AMEL、AMBN、成熟期および付着上皮のマーカである AMTN と ODAM/APIN を使用した。これらのエナメルタンパク質の mRNA レベルを検索することで、ルシフェラーゼアッセイ、それに続く転写因子および応答配列の同定するために行うゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法(ChIP アッセイ)に適した細胞培養条件を確立しようと試みた。

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 (Promega))に、種々の長さで調節した AMTN のプロモーター領域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) を用いて導入する。

培養後コンフルエントになった細胞に、IL18、IL6 および TNF α 刺激を 12 時間行った後、細胞は細胞溶解液 (125 μ l) にて溶解し、上清を活性の測定に用いる。測定は、上清 20 μ l とルシフェラーゼ基質 (ピッカジーン; 東洋インキ) 100 μ l を混合し、ルミノメーター (Acuu FLEX Lumi 400 (ALOKA 社)) にて行った。

上記の方法から得られた結果から、転写因子が結合すると考えられた塩基配列を特定していくために、Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit を用いて、ミューテーションを含むマウス AMTN 遺伝子プロモーターコンストラクトを作成する。そしてこれらを用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することで、転写因子応答配列を限定し、その配列をゲルシフトアッセイで用いる合成オリゴヌクレオチドの設計を考慮中である。

ChIP アッセイ—*in vitro* での転写因子と応答配列との結合を裏付けるため、炎症性サイトカイン刺激後の HGF を固定後に回収し、*in vivo* における転写因子と応答配列との結合の検索を行う。ルシフェラーゼアッセイの結果から、票的の転写因子応答配列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。

免疫染色法 歯周外科治療時に不良となった上皮を含む肉芽組織を用いて、AMTN タンパク質の局在の変化を調べるために、免疫染色法を行った。非炎症組織(コントロール)として、歯冠長延長術を適応症とした患者から歯肉組織を採取した。これらの採取した歯肉組織は、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。4μm の厚さで切片を作製した。組織切片上の AMTN 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

歯周炎患者から採取した上皮を含む肉芽組織では、アメロチン遺伝子レベルが増加し、アメロチンタンパク質の局在は正常歯周組織組と比較してやや広範囲に広がっていた。歯肉線維芽細胞に炎症性サイトカインを作用させると、アメロチン遺伝子の発現レベルの増加と転写活性の増加を認めた。このことから、アメロチン遺伝子は炎症時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

Enamel Hypomineralization and Structural Defects in Amelotin-deficient Mice.

Nakayama Y, Holcroft J, Ganss B.

2015. *J Dent. Res.* 1-9.

DOI; 10.1177/0022034514566214 査読あり

2

Proinflammatory cytokines induce amelotin transcription in human gingival fibroblasts.

Nakayama Y, Takai H, Matsui S, Matsumura H, Zhou L, Kato A, Ganss B, Ogata Y.

2014. *J Oral Sci.* 56, 261-268. 査読あり

3

Transcriptional regulation of amelotin gene by proinflammatory cytokines in gingival fibroblasts.

Nakayama Y, Takai H, Matsui S, Zhou L, Abiko Y, Ganss B, Ogata Y.

2014. *Connect Tissue Res.* 55 (S1), 18-20.

査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1

Regulation of amelotin gene transcription by proinflammatory cytokines in gingival fibroblasts

Yohei Nakayama, Hideki Takai, Sari Matsui, Liming Zhou, Yoshimitsu Abiko, Bernhard Ganss, Yorimasa Ogata

The 54th General Session of Korean Academy of Periodontology

世宗, 韓国 2014年10月26日

2

Transcriptional regulation of amelotin gene by proinflammatory cytokines in gingival fibroblasts

Yohei Nakayama, Hideki Takai, Sari Matsui, Liming Zhou, Yoshimitsu Abiko, Bernhard Ganss, Yorimasa Ogata

11th International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues.

Lake Geneva, USA 2013年10月28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

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号: 30434088