

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 宮 川 友 里
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 甲 第 524 号
学位授与年月日 令和 5 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 Response of TGF- β isoforms in epithelial-mesenchymal transition of enamel epithelial cells
(エナメル上皮細胞の上皮間葉転換に及ぼす TGF- β アイソフォームの応答性)
Archives of Oral Biology doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105540.
論 文 審 査 委 員 主査 教授 五 味 一 博
副査 教授 二 藤 彰 副査 教授 朝 田 芳 信

内 容 の 要 旨

【緒 言】

トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β) は、細胞増殖、細胞分化、細胞死に影響を及ぼすサイトカインである。哺乳類の TGF- β には 3 つの主要なアイソフォームである TGF- β 1, 2, 3 が存在する。我々はこれまで、エナメル質形成中の TGF- β アイソフォームが、遺伝子発現、アポトーシス、およびエンドサイトーシスに対して異なる活性を示すことを見出した。TGF- β シグナル伝達は、I 型 (ALK5)/II 型 (TGFBR2) 受容体からなる複合体、および補助受容体 (ベータグリカン/エンドグリン) によって媒介されている。共通の受容体を介してシグナルを細胞内に伝達することが知られるアイソフォームが、異なる反応を示すことは大変興味深く、その伝達経路を調べることはエナメル質形成機構を解明するために必要だと考えた。

本研究では特に、エナメル上皮細胞における上皮間葉転換 (EMT) に及ぼす TGF- β アイソフォームの応答性の相違について調べることを目的とした。

【方 法】

マウスエナメル上皮細胞株 (mHAT9d) を各 TGF- β アイソフォーム (1 ng/ml) 添加または未添加の, DMEM/F12 培地を用いて培養し、下記の実験を行った。

- ・上皮間葉転換 (EMT) に伴う細胞形態の変化の観察

TGF- β 添加後、10 日間培養した mHAT9d 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した後、0.1% Triton-X100 に置き換え、23℃、30 分間静置した。その後、ローダミン/ファロイジン (RP) (100 nM) を用いたアクチン染色および 4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) (2 μ g/ml) を用いた核染色を行い、蛍光顕微鏡にて細胞形態の観察を行った。

- ・スクラッチアッセイ

TGF- β 添加後、10 日間培養した mHAT9d 細胞の一部をピペットチップにてスクラッチした。スクラッチ直後及び 55 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した後、0.1% Triton-X100 に置き換え、23℃、30 分間静置した。その後、RP 染色を行い、スクラッチ領域に遊走した細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

- ・定量 PCR (qPCR)

TGF- β 添加後、10 日間培養した mHAT9d 細胞から、High Pure RNA Isolation Kit を使用してトータル RNA を抽出した。SYBR Green 法を用いて、Light Cycler 96 システム上で EMT 関連遺伝子及び、TGF- β 受容体遺伝子の発現量を qPCR に

て解析した.

- ・次世代シーケンシング (NGS)

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞から抽出したトータル RNA を用いて, 次世代シーケンサーにてトランスクリプトーム解析を行った.

- ・EMT に関連する TGF- β シグナル経路の阻害実験

mHAT9d 細胞を 23 時間培養した後, ALK5 キナーゼ阻害剤 (SB431542), Smad3 のリン酸化阻害剤 (SIS3), ERK1/2 阻害剤 (PD98059), p38MAP キナーゼ阻害剤 (SB203580), PI3 キナーゼ阻害剤 (Wortmannin) または Rho キナーゼ阻害剤 (Y-27632) をそれぞれ 2 μ M の濃度で培地に加えた. さらに 1 時間培養後, TGF- β 1 を添加し, 10 日間培養した. 細胞の形態変化は, RP 染色後, 蛍光顕微鏡で観察した.

- ・TGF- β アイソフォームを添加した mHAT9d 細胞のデュアルルシフェラーゼアッセイ

mHAT9d 細胞を 24 時間培養し, TGF- β 応答性 PAI-1 プロモーター領域を持つ p3TP-lux と, 内部標準である pRL-SV 40 を Lipofectamine 2000 を使用して mHAT9d 細胞にトランスフェクションした. トランスフェクション 3 時間後に各 TGF- β アイソフォームを添加し, さらに 24 時間培養した. ルシフェラーゼ活性の測定は Minilumat Lb 9506 を用いて行った.

- ・リン酸化 Smad3 のウエスタンブロット解析による TGF- β シグナルの活性化の測定

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞から RIPA バッファーを用いてタンパク質を抽出し, ウエスタンブロットティング用サンプルを調製した. 電気泳動は, 5 ~ 20% の ePAGEL ミニゲルを使用して行った. ゲルを Invitrolon ポリフッ化ビニリデン膜に転写し, 抗リン酸化 Smad3 モノクローナル抗体 (1 : 2000, 4°C, 20 時間) またはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 抗体 (1 : 1000, 4°C, 20 時間) を一次抗体として使用した. 抗リン酸化 Smad3 抗体に対してヤギ抗ウサギ IgG (H+L)-HRP 結合抗体 (1 : 2000, 23°C, 1 時間) を, GAPDH 抗体に対してウサギ抗ヤギ IgG (H+L)-HRP 結合抗体 (1 : 2000, 23°C, 1 時間) をそれぞれ二次抗体として使用した. ECL Prime を使用した化学発光によりバンドを検出し, ImageJ ソフトウェアを用いて, GAPDH のバンド強度でリン酸化 Smad3 のバンド強度を標準化し, 定量化した.

- ・TGF- β アイソフォームの結合親和性に起因する TGF- β 受容体遺伝子発現の解析 (免疫蛍光染色)

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 23°C, 15 分間固定し, ブロッキング溶液 (5% 正常ヤギ血清) で 23°C, 1 時間インキュベートした. 次に, 抗エンドグリン抗体を一次抗体として 1 : 2000 希釈で使用し 4°C で一晩インキュベートした後, 二次抗体である Alexa FluorTM488 ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体を 1 : 500 希釈で, 遮光下 23°C で 1 時間インキュベートした. 細胞核は, DAPI (2 μ g/ml) を使用して対比染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した. 重ね合わせ画像は, ImageJ ソフトウェアを使用して作成した.

- ・統計分析

qPCR およびルシフェラーゼアッセイのすべての値は, 平均値 $\pm$ 平均値の標準誤差 (SEM) として表示した. 統計的有意差検定は, Steel-Dwass 検定を使用した.

【結 果】

・TGF- β 1 または TGF- β 3 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞では, EMT によって上皮系特有の敷石状の形態から間葉系特有の突起状に形態変化した細胞が観察されたが, TGF- β 2 添加群では観察されなかった.

- ・スクラッチアッセイより, TGF- β 1 または TGF- β 3 添加後に形態が変化した細胞が遊走能を持っていることが示された.

・qPCR より, 上皮系マーカーである E-カドヘリンの遺伝子発現は TGF- β 未添加群であるコントロールおよび TGF- β 2 添加群でより高く, 間葉系マーカーである N-カドヘリンおよびビメンチンの遺伝子発現は, TGF- β 1 添加群および TGF- β 3 添加群で高い値を示した.

- ・NGS 解析では, EMT に関連する TGF- β シグナル伝達経路として, ERK 経路と Rho 経路が候補として挙げられた.

・阻害剤実験より, TGF- β 1 を添加した mHAT9d 細胞では, PD98059 添加群でも EMT が生じたが, Y-27632 添加群および SB431542 添加群では EMT が抑制された.

・各 TGF- β アイソフォームによる PAI-1 遺伝子プロモーター活性は, TGF- β の濃度に依存して増加することがわかった. 濃度 1 ng/ml では, TGF- β 1 または TGF- β 3 添加群のルシフェラーゼ活性は, TGF- β 2 添加群よりも高かった.

・抗リン酸化 Smad3 抗体を用いたウエスタンブロット解析により, TGF- β による Smad3 のリン酸化は TGF- β 2 添加群よりも TGF- β 1 または TGF- β 3 添加群で顕著であった.

・qPCRによるTGF- β 受容体発現の解析では、TGF- β アイソフォームそれぞれの添加後にI型受容体の遺伝子発現が減少する傾向が見られた。一方、II型受容体の遺伝子発現は、TGF- β 1またはTGF- β 3添加群で有意に増加したが、TGF- β 2添加群ではコントロールとほぼ同等であった。さらに、TGF- β シグナル伝達の補助受容体である、ベータグリカンの遺伝子発現は各TGF- β アイソフォーム添加後に減少した。対照的に、エンドグリンの遺伝子発現はTGF- β 1または β 3添加群で増加したが、TGF- β 2添加群には変化は認められなかった。免疫蛍光染色におけるエンドグリンの染色強度は、TGF- β 1またはTGF- β 3添加群で強く、さらに同じ群内においてはEMTにより細胞形態の変化が生じた細胞ほど強かった。

【考 察】

TGF- β アイソフォームを添加したエナメル上皮細胞においてTGF- β 1または β 3添加群のみにEMTが認められた。EMTは主にRhoシグナル伝達経路を介して生じ、TGF- β アイソフォーム間の応答性の違いは、TGF- β 受容体に対するエンドグリンを介した結合親和性に起因するものであ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- β ）は、細胞増殖、細胞分化、細胞死に影響を及ぼすサイトカインであり、そのアイソフォームにより作用が異なる。エナメル質形成においてもTGF- β アイソフォームが異なる活性を示すことが示されている。本研究ではエナメル上皮細胞における上皮間葉転換（EMT）に及ぼすTGF- β アイソフォームの影響についてマウスエナメル上皮細胞株（mHAT9d）を用いて調べた。

EMTに伴う細胞形態の変化を調べたところTGF- β 1、 β 3添加によりmHAT9dが上皮特有の敷石状の形態から間葉系特有の突起状に変化した。TGF- β 2添加群では観察されなかった。スクラッチアッセイではTGF- β 1、 β 3において遊走能が認められたがTGF- β 2では認められなかった。定量PCR（qPCR）では上皮系マーカーであるE-カドヘリンの遺伝子発現はTGF- β 未添加群およびTGF- β 2群で高く、間葉系マーカーであるN-カドヘリンおよびビメンチンの遺伝子発現はTGF- β 1、 β 3群で高い値を示した。TGF- β シグナル経路の阻害実験ではTGF- β 1群にERK1/2阻害剤（PD98059）添加してもEMTが認められたが、Rhoキナーゼ阻害剤（Y-27632）添加するとEMTの抑制が認められた。リン酸化Smad3のウェスタンブロット解析ではTGF- β によるSmad3のリン酸化はTGF- β 2群よりもTGF- β 1、 β 3群で顕著であった。qPCRによるTGF- β 受容体発現の解析では補助受容体であるエンドグリンの遺伝子発現がTGF- β 1、 β 3で増加したがTGF- β 2では変化は認められなかった。免疫蛍光染色におけるエンドグリンの染色強度はTGF- β 1、 β 3群で強く、特にEMTを生じた細胞ほど強かった。

以上の結果より、TGF- β 1、 β 3群のみにEMTが生じた。EMTはRhoキナーゼ阻害剤により阻害されることからRhoシグナル伝達経路を介して生じると考えられた。TGF- β アイソフォーム間の応答性の違いはTGF- β 受容体に対するエンドグリンを介した結合親和性に起因するものであることが示唆された。

本研究における結果は、エナメル質の形成メカニズムを知る上で重要な基礎的データを示しており有用な研究であると考ええる。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。