

研究者：木下 冴子（所属：鶴見大学歯学部小児歯科学講座）

研究題目：ブタエナメル質形成における TGF- β 1 の遺伝子発現，活性化，タンパク質-タンパク質間相互作用および分解について

目的：

トランスフォーミング成長因子ベータ（TGF- β ）は、歯牙発生や形成において重要な役割を担う生理活性物質である。私の研究室ではこれまでに形成過程にあるブタエナメル質中に TGF- β が存在することを見出してきたが、エナメル質形成におけるこの物質の役割については解明されていない。そこで本研究ではエナメル質形成における TGF- β の動態および存在様式を解明することを試み、エナメル質再生に向けた歯科再生医療研究の基礎的所見を得ることを目的とした。

材料および方法：

生後約5か月のブタ下顎骨より永久切歯歯胚および第二大臼歯歯胚を採取し（図1），下記の実験を行った。

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

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1a）よりそれぞれ total RNA を調製し，リアルタイム PCR（qPCR）を行って 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 エナメル基質中の TGF- β 1 の分離と同定

第二大臼歯歯胚より基質形成期（幼若）及び成熟期エナメル質を削り取り（図1b），リン酸緩衝液および炭酸緩衝液を用いてタンパク質画分を連続的に抽出・分画した。TGF- β 1 活性を含むタンパク質画分をヒト歯根膜由来培養細胞（HPDL）に対するアルカリホスファターゼ（ALP）活性値を調べることで特定し（ALP-HPDL システム），画分中に含まれる主要タンパク質をウエスタンブロットティングによって同定した。

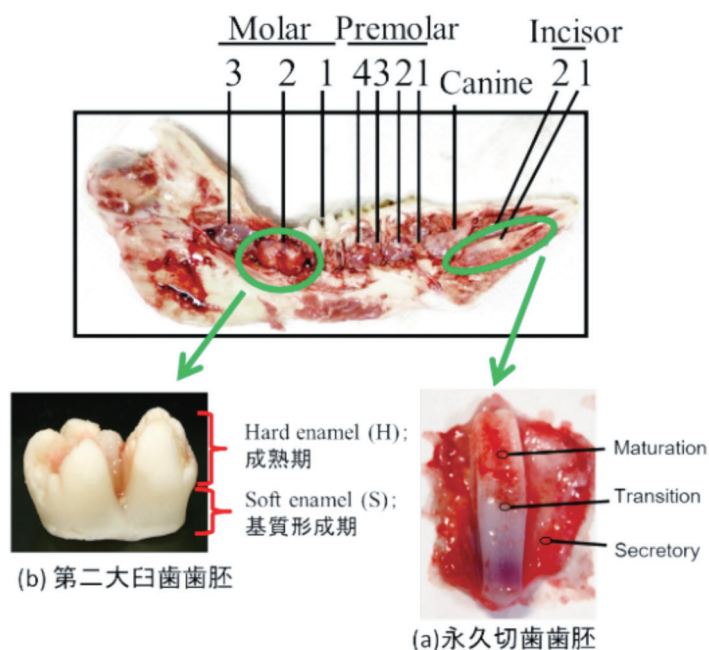


図1 生後約5か月ブタ下顎骨

③ TGF- β 1 とアメロゲニンのタンパク質間相互作用

TGF- β 1 とエナメルタンパク質との相互作用を検討するために ELISA 法を応用した in vivo 結合同定実験と、エナメル基質より主要アメロゲニンを精製して、HPLC と ALP-HPDL システムを用いた in vitro での結合実験を行った。また、アメロゲニン-TGF- β 1 複合体の分子量を動的散乱解析により算出した。

④ TGF- β 1 の活性化と不活化

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エナメリシン (MMP-20) とカリクレイン 4 (KLK4) を作用させて、それらプロテアーゼによる TGF- β 1 活性の影響を ALP-HPDL システムにて測定した。

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

切歯エナメル芽細胞から TGFBR1 を抽出し、時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法 (TR-FRET) を用いたリン酸化酵素アッセイよりエナメルタンパク質-TGF- β 1 複合体と TGFBR1 とのシグナル伝達を調べた。

結果および考察：

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

ブタ幼若エナメル質において、TGF- β 1 は形成過程の全てのステージのエナメル芽細胞より非活性型として合成され、特に移行期において発現量が多いことが判明した。さらに TGFBR1 も形成過程のすべてのエナメル芽細胞より合成分泌され、形成期から成熟期にかけて発現量は減少傾向にあった。

② エナメル基質中の TGF- β 1 の分離と同定

ブタ幼若および成熟エナメル質より抽出した各画分において、リン酸緩衝液可溶・40%飽和硫酸沈殿画分および炭酸緩衝液可溶・ヘパリン未吸着画分とヘパリン吸着・50mM NaCl 溶出画分にてそれぞれ TGF- β 1 の存在が認められた。それら TGF- β 1 を含む画分にはアメロゲニンが多く存在しその活性は幼若から成熟エナメル質にかけて減弱していく傾向にあった。

③ TGF- β 1 とアメロゲニンのタンパク質間相互作用

上記画分より主要アメロゲニンである P173, P162, P148, P103, LRAP, TRAP を精製し、ALP-HPDL システムにて TGF- β 1 活性を調べたところ、P173, P162, P148, P103 アメロゲニンにおいて ALP 活性の上昇が認められ、TGF- β 1 およびアメロゲニン抗体を用いたサンドイッチ法による ELISA を応用した in vivo 結合実験においてそれら 4 種のアメロゲニンに TGF- β 1 が結合していることが判明した。また 4 種のアメロゲニンそれぞれにリコンビナント TGF- β 1 を結合させた in vitro 結合実験では、アメロゲニンに元々結合していた TGF- β 1 活性がさらに上昇したことより、4 種のアメロゲニンには TGF- β 1 に対する結合能が残っていたことが明らかになった。それら 4 種のアメロゲニンのうち、in vivo で最も高い TGF- β 1 活性を有し、中性 pH にお

いて可溶性であった P103 アメロゲニンに対して動的散乱解析を行ったところ、P103 アメロゲニン 3 量体に対して TGF- β 1 が 1 分子結合している分子量が得られた。

④ TGF- β 1 の活性化と不活化

latent TGF- β 1 に対するエナメルプロテアーゼの作用において、MMP-20 は latent TGF- β 1 を活性型 TGF- β 1 に変換させ、一方 KLK4 は TGF- β 1 を分解した。興味深いことに TGF- β 1 は単体で存在するよりもアメロゲニン複合体として存在する方が KLK4 の影響を受けにくく、活性が維持される可能性が示唆された。

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

永久切歯エナメル芽細胞より抽出した TGFBR1 の TR-FRET 実験では、内在性と思われる TGF- β によるリン酸化のみならず、リコンビナント TGF- β 1、さらに精製した P103 アメロゲニン TGF- β 1 複合体の添加によってもリン酸化反応が進行することが確認された。また、この反応は TGFBR1 の阻害剤である SB431542 の添加により阻害された。

以上のことより、基質形成期エナメル質において TGF- β 1 はエナメル芽細胞から不活性型の latent TGF- β 1 として合成分泌された後 MMP-20 によって活性型となり、P173, P162, P148 アメロゲニンと結合することでその活性が維持され、それらアメロゲニン-TGF- β 1 複合体が同じく MMP-20 によってプロセッシングされて水溶性の P103 アメロゲニン-TGF- β 1 複合体になることでエナメルマトリックス中を移動し、エナメル芽細胞に存在する TGFBR1 と結合して TGF- β 1 のシグナルがエナメル芽細胞内に伝達されることが示唆された。そして移行期以降、成熟期において合成分泌される KLK4 にて TGF- β 1 の活性が失活することも考えられた。今後はこの TGF- β 1 がエナメルマトリックス内でどのような役割を果たしているのか、組織学的観察を視野に入れて追究していく方針である。これら TGF- β 1 とエナメルタンパク質との相互作用に関する知見は、未だ不明な点の多いエナメル質形成のメカニズムの解明のみならず、将来の生理活性物質を活かした再生医療への重要な足掛かりになると期待している。

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）

第 55 回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表（岡山 2013）

43rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR ポスター発表（Charlotte, N.C., USA, 2014）

第 56 回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表（福岡 2014）

93 General Session & Exhibition of the IADR ポスター発表（Boston, M.A., USA, 2015）

第 10 回アジア小児歯科学会 ポスター発表

上記内容含め，学術雑誌投稿予定