

| | |
|--------------|---|
| Title | TGF- β による歯原性腫瘍の骨吸収機序の解析 : 間質線維芽細胞の RANKL 遺伝子発現調整を通じて |
| Author(s) | 奥野, 恵実 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | ETD |
| URL | https://doi.org/10.18910/34364 |
| DOI | 10.18910/34364 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

論文内容の要旨

氏名 (奥野 恵実)

論文題名

TGF- β による歯原性腫瘍の骨吸収機序の解析
— 間質線維芽細胞の RANKL 遺伝子発現調整を通じて —

論文内容の要旨

【研究目的】

顎骨に発生する歯原性腫瘍は周囲骨を吸収、破壊しつつ増大するが、骨吸収を引き起こす分子機序は未だ明らかでない。一方、歯原性腫瘍の発生母地である顎骨内の歯胚では PTHrP, IL-1, TGF- β などのサイトカインが産生され、RANKL 発現を介して破骨細胞形成を誘導することで歯胚の発達や萌出に関与することが報告されている。

当教室では歯原性腫瘍も同様の破骨細胞誘導機序があり、骨吸収を導くと考え、これまでに TGF- β , IL-1 α が歯原性腫瘍細胞に発現すること、病変内溶液は高濃度の TGF- β を含有していること、TGF- β と IL-1 α が相乗的に間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導することを見い出してきた。そこで、歯原性腫瘍における骨吸収機序の理解を深めるため、腫瘍に高濃度に含まれる TGF- β と間質を介した骨吸収過程に焦点を当て、本研究では、歯原性腫瘍由来の間質線維芽細胞の RANKL 発現における TGF- β の作用機序と、ヒト RANKL 遺伝子の TGF- β による転写調節機序を検討した。

【材料及び方法】

- 1) 歯原性腫瘍組織のパラフィン切片を用い TGF- β , RANKL の局在を免疫組織化学染色法にて検討した。
- 2) 検体、試料の研究使用への供託に同意の得られた患者の歯原性腫瘍 (keratocystic odontogenic tumor (KCOT), エナメル上皮腫) および歯嚢の組織細片より間質線維芽細胞を分離・培養した。実験には 4-9 継代の細胞を使用した。
- 3) 間質線維芽細胞を TGF- β および IL-1 α で刺激し、RT-PCR 法で RANKL の発現を検討した。また、タンパク合成阻害薬シクロヘキシミド (CHX) で前処理を行い、TGF- β 刺激による RANKL 発現を検討した。
- 4) TGF- β の細胞内シグナル伝達経路として Smad3, p38, ERK, JNK のリン酸化を、IL-1 α の細胞内シグナル伝達経路として p38, ERK, JNK, NF κ -B のリン酸化を、ウェスタンブロッティング法にて検討した。
- 5) TGF- β 刺激による RANKL 転写解析を行うために、ヒト RANKL 遺伝子プロモーター配列のレポーター活性解析を行った。HEK 293 細胞のゲノム DNA より RANKL のプロモーター領域 2360 bp をクローニングし、pGL3-basic vector にレポーターコンストラクトを構築した。また、必要に応じてプロモーター配列を切断・欠失・変異させたコンストラクトを作成した。変異・欠失配列としては -152 bp に存在する AP-1 配列のコンセンサス領域に 2 つのヌクレオチドに変異を加えた配列、および AP-1 配列を欠失させた配列を作成した。細胞の対照として、歯嚢線維芽細胞とヒト骨芽細胞様細胞株 MG63 を用いた。
- 6) ヒト RANKL プロモーター配列の -152 bp に存在する AP-1 結合配列を中心とした 35 mer の二本鎖 DNA をビオチンラベルし、TGF- β で刺激した間質線維芽細胞の核タンパクとの結合を EMSA (Electrophoresis mobility shift assay) にて検討した。

【結果及び考察】

- 1) 叢状型エナメル上皮腫、濾胞型エナメル上皮腫ともに高円柱上皮、血管内皮細胞に TGF- β は陽性で、間質線維芽細胞にも一部陽性であった。KCOT では嚢胞裏装上皮、浸潤リンパ球に陽性で間質にも弱陽性を示した。RANKL はエナメル上皮腫細胞や間質線維芽細胞、浸潤リンパ球に陽性を示した。

標本内の骨の骨細胞、骨芽細胞は RANKL 陽性であるが、周囲の間質線維芽細胞も同様に陽性であった。エナメル上皮腫、KCOT ともに腫瘍上皮細胞のみならず、間質線維芽細胞の核内にもリン酸化 Smad3 は陽性で間質線維芽細胞において TGF- β シグナルが活性化されていることが示された。

2) TGF- β あるいは IL-1 α の刺激により間質線維芽細胞の RANKL 発現が誘導された。TGF- β と IL-1 α の共刺激により RANKL 発現は相乗的に増強された。また、TGF- β 刺激は CHX 存在下においても間質線維芽細胞の RANKL 遺伝子発現を促進させ、RANKL 遺伝子の転写を直接促進する可能性が示唆された。

3) TGF- β は p38, ERK, JNK, NF κ -B, Smad3 をリン酸化し、IL-1 α は p38, ERK, JNK, NF κ -B をリン酸化した。その共刺激は、p38, ERK, JNK のリン酸化程度には影響しなかったが、NF κ -B リン酸化は増強された。

4) MG63 細胞において転写開始点より上流 1254bp より短いプロモーター配列で高いルシフェラーゼ活性を示し、上流 176 bp のプロモーター配列で最も高いルシフェラーゼ活性がみられた。本研究で構築したコンストラクトがプロモーター配列として機能していることが示された。一方、歯嚢、KCOT、エナメル上皮腫間質線維芽細胞においては、転写開始点より上流 176 bp のプロモーターでのみ高いプロモーター活性を示し、1066 bp より長いプロモーター配列でのルシフェラーゼ活性は低かった。骨芽細胞と歯原性間質細胞との細胞では、プロモーター活性部位が異なる可能性が示唆された。TGF- β 刺激によるルシフェラーゼ活性を検討すると、MG63 細胞では TGF- β 刺激による -1066 bp, -762 bp, -583 bp, -369 bp, -176 bp のプロモーター配列のルシフェラーゼ活性の上昇を示さず、特に -176 bp のコンストラクトでは TGF- β 刺激でルシフェラーゼ活性が抑制された。一方、エナメル上皮腫間質線維芽細胞では -176 bp 配列のルシフェラーゼ活性が促進された。ヒト RANKL 遺伝子転写開始点から上流 176 bp までの転写因子結合部位予測を行った結果、転写開始点より上流 152 bp の部位で AP-1 結合領域が同定された。この AP-1 配列のコンセンサス領域の変異配列、および AP-1 配列を欠失させた配列を用いてエナメル上皮腫間質線維芽細胞でレポーターアッセイを行った結果、TGF- β 刺激により AP-1 領域を含む領域で促進されたルシフェラーゼ活性は、変異・欠失を導入することにより消失した。このことより、TGF- β シグナルは AP-1 領域を介して間質線維芽細胞の RANKL 遺伝子転写を促進することが示唆された。

5) EMSA にて AP-1 プローブは TGF- β 刺激したエナメル上皮腫間質線維芽細胞の核タンパクと結合しシフトした。このシフトしたバンドは非標識の AP-1 プローブの処理にて消失した。

【結語】

歯原性腫瘍において TGF- β は、① IL-1 α による NF κ -B 活性化を増強させ IL-1 α による RANKL 発現誘導を促進する ②ヒト RANKL 遺伝子上流-152bp AP-1 結合配列を介して RANKL 転写活性を促進する、二つの分子機序が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (奥野 恵実) | | |
|---|-----|-----------|
| | (職) | 氏 名 |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 古郷 幹彦 |
| | 副 査 | 教授 豊澤 悟 |
| | 副 査 | 准教授 前田 隆史 |
| | 副 査 | 講師 上松 節子 |
| 論文審査の結果の要旨 | | |
| <p>本研究は歯原性腫瘍において高発現する TGF-β による骨吸収機序について検討したものである。</p> <p>その結果、歯原性腫瘍において TGF-β は、① IL-1α による NFκ-B 活性化を増強させ IL-1α による RANKL 発現誘導を促進する ②ヒト RANKL 遺伝子上流-152bp AP-1 結合配列を介して RANKL 転写活性を促進する、二つの分子機序が示唆された。</p> <p>この研究は、TGF-β による歯原性腫瘍の骨吸収機序との関わりを理解する上で、重要な知見を得るものであり、博士（歯学）の学位に十分値するものであると認める。</p> | | |