



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	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34364
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

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—

2014 年

大阪大学大学院歯学研究科

統合機能口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学講座

(口腔外科学第一教室)

奥野 恵実

緒言

生理的な骨吸収は破骨細胞により行われており、骨形成を行う骨芽細胞とカップリング機構を形成し、血清カルシウム・リンの恒常性維持や骨格の成長・維持に深く関与している。破骨細胞と骨芽細胞のカップリング機構は多くの因子の関与が示されており^{1,2)}、最も多く研究されているのが破骨細胞誘導因子 (Receptor Activator of NF- κ B Ligand; RANKL) を介した RANK-RANKL 系である。この系は、何らかの刺激により骨芽細胞から産生された RANKL が破骨細胞やその前駆細胞に存在する受容体 (RANK) と結合して破骨細胞の分化や機能を促進させることが示されている。そして、骨粗鬆症³⁾などの代謝性骨疾患だけでなく、癌の骨浸潤、骨転移^{4,5)}や巨細胞腫⁶⁾でみられる腫瘍性の骨吸収や関節リウマチ^{7,8)}に代表される炎症性骨吸収でも RANK-RANKL 系を介した骨吸収機序の関与が多数報告されている。すなわち、すべての骨吸収性疾患に RANK-RANKL シグナルが関与すると考えられている⁹⁾。また、RANKL を介した破骨細胞形成は決して骨芽細胞に限られるものではなく、関節リウマチでは関節滑膜線維芽細胞が^{7,8)}、腫瘍では腫瘍細胞^{4,6)}や間質線維芽細胞¹⁰⁾など、歯周組織の炎症性疾患ではリンパ球¹¹⁾などが RANKL の供給細胞となりうることが報告されている。

顎骨における RANK-RANKL 系は、歯周疾患による歯槽骨吸収機序や抜歯窩の治癒機転、矯正力による歯の移動で明らかにされている¹²⁾。歯の発生過程では、歯胚の成長に伴って歯原性上皮が産生する Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP) や Interleukin-6 (IL-6)

などのサイトカインが歯胚周囲に存在する間質線維芽細胞や骨芽細胞を刺激することで RANKL を産生し、破骨細胞誘導により骨を吸収する機序が報告されており、歯胚の保護や萌出に関与すると示唆されている^{13,14)}。

歯胚に関連する細胞が発生母地となる歯原性腫瘍は歯原性上皮および歯原性外胚葉性間葉から、またはその双方より生じ、エナメル上皮腫 (Ameloblastoma)、角化嚢胞性歯原性腫瘍 (Keratocystic Odontogenic Tumor; KCOT)、そして歯牙腫など病理像だけでなく臨床所見においても多彩である。特に、エナメル上皮腫や角化嚢胞性歯原性腫瘍は顎骨内の骨吸収を伴いながら病変を増大させて顎骨の膨隆をきたす。これらの歯原性腫瘍が顎骨内で増大する過程で、周囲の顎骨を吸収、破壊する必要があるが、そのメカニズムとしては腫瘍増大による圧迫性の骨吸収が広く受け入れられているに過ぎない。しかしながら、初期病変での骨吸収機序を圧迫性骨吸収で説明することは困難で、骨吸収に関わる分子機序の研究が望まれる。近年、Oka らは KCOT の産生する Interleukin-1 α (IL-1 α) が間質線維芽細胞の RANKL 発現を促進することを報告し、顎骨腫瘍や嚢胞の顎骨内での増大や骨吸収にも RANKL を介した機序が存在することが示唆されている¹⁵⁾。しかしながら、歯原性腫瘍における、破骨細胞形成機序の詳細は未だに不明である。

Transforming growth factor-beta (TGF- β) や IL-1 α は、サイトカインとして広く研究されており、骨代謝の研究分野では主として破骨細胞研究においてこれらのサイトカインは破骨細胞に直接作用して破骨細胞の分化や骨吸収機能を促進させる報告が多数報告されて

いる^{16, 17)}。さらに、発達過程の歯胚において、歯嚢歯原性上皮から TGF- β や IL-1 が産生され、歯嚢線維芽細胞の RANKL 発現を促進させる事が認められている¹⁸⁻²⁰⁾。

当教室では、新たな歯原性腫瘍が顎骨内で増大するメカニズム、骨破壊のメカニズムを検討するために、発達過程の歯胚に由来する歯原性腫瘍も RANKL 発現を介した破骨細胞形成機構を有し、骨吸収を促進させる作業仮説を立てた。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、病変内溶液に高濃度の 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出してきた。

TGF- β 刺激は、細胞内の Smad2/3 のリン酸化の後、Smad4 とで構成される複合体の核内移行により遺伝子発現を促進させる Smad 経路と、MAP キナーゼやプロテインキナーゼ C を介した非 Smad 経路で細胞内シグナルを伝達する²¹⁾。一方、IL-1 シグナルには MAP キナーゼ経路と NF- κ B を介した経路の 2 つのシグナル伝達経路が知られている²²⁾。そして、TGF- β と IL-1 とのシグナルの相互作用は関節軟骨細胞の実験系²³⁾ や創傷治癒の過程の実験系²⁴⁾ など、炎症修復の分野で研究されているが、それらの実験系では IL-1 シグナルが TGF- β シグナルを抑制する機序が示されており、歯原性腫瘍間質細胞で見られた RANKL 発現誘導の相乗作用は、興味深い知見である。

一方、ヒト RANKL 遺伝子転写について、Kitazawa ら²⁵⁾、Roccisana ら²⁶⁾ が、転写開始点上流の 1.2 kbp のプロモーター領域の解析を報告しているが、詳細に解析した報告は少なく、また TGF- β シグナルによる転写調節機序の報告はない。

本研究では、顎骨腫瘍の間質線維芽細胞が RANKL 発現を介して骨吸収を支持するとの報告に基づき、その分子機序を明らかとするために、TGF- β 刺激による間質線維芽細胞の RANKL 発現に焦点を当て、TGF- β と IL-1 α の相互作用と TGF- β による RANKL 遺伝子の転写調節機序についての検討を行った。その結果、間質線維芽細胞において TGF- β は (1) IL-1 シグナルによる NF- κ B リン酸化を亢進させ、RANKL 発現を促進させる作用、(2) ヒト RANKL 遺伝子転写活性を促進する、二つの機序を見出したので論証する。

実験材料と実験方法

1. 実験試薬

リコンビナントヒト TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、リコンビナントヒト IL- α (PeproTech, London, UK) および Cycloheximide (Nacalai tesque、大阪) を本実験に供した。

2. 細胞培養

大阪大学歯学部附属病院 口腔外科 1<制御系>で治療を行う患者に対し、検体・試料の研究使用への供託について説明し、同意の得られた患者の歯原性腫瘍(KCOT, エナメル上皮腫および歯嚢)より腫瘍組織片を採取した。ヒト骨肉腫由来骨芽細胞株 MG-63 細胞 (Resource No. RBRC-RCB1890) は独立行政法人理化学研究所より購入した。間質線維芽細胞および歯嚢線維芽細胞は組織細片からの explant 法にて分離・培養した。すなわち、摘出手術または試験切除された組織片を細切し、その組織片を培養皿上にて培養し、組織片から out-growth した細胞を継代し、形態的に純粋な線維芽細胞・歯嚢線維芽細胞を分離した。間質線維芽細胞は 10%ウシ胎仔血清 (FBS; HyClone, Logan, UT, USA)、2mM L-グルタミン、抗生物質 (100 Units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン) を添加した Eagle' s Minimum Essential Medium alpha Modification (α -MEM; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) を培養液として使用し 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下で 100 mm細胞培養皿 (Corning, NY, USA) で培養した。また、MG63 骨芽細胞は、10% FBS を含む Minimum Essential Medium (MEM; Gibco life technologies) を培養液として使用し 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂存在下で 100 mm 細胞培養

皿 (Corning) で培養した。継代培養には間質線維芽細胞には 0.05% トリプシン、0.02% EDTA を含むリン酸緩衝液 (PBS) (Sigma-Aldrich) を使用し 1:3 のスプリットレシオで、MG63 細胞は 1:8 のスプリットレシオで継代した。実験には 4-9 継代の間質線維芽細胞を使用した。

3. 全 RNA の抽出および Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

間質線維芽細胞を 6 穴培養プレート (Corning) に播種し、定期的に培養液交換を行い、80% 飽和状態まで増殖させ、0.3% BSA を含む無血清 α -MEM 培養液に交換し、さらに 16 時間培養した。3 ng/ml 濃度の IL-1 α あるいは 3 ng/ml の TGF- β を含む培地で 6 時間培養した細胞から、全 RNA を TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて抽出した。タンパク合成阻害実験では 100 μ g/ml 濃度のシクロヘキシミドで 30 分間細胞を前処理したあと、TGF- β を添加して培養した。

全 RNA の濃度は分光吸光度計 (GeneQuant 1300/100, GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) で測定した。全 RNA 0.8-1.5 μ g を鋳型とし、ReverTra Ace[®] reverse transcriptase (Toyobo、大阪)、random hexamer primer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) を用い、30 $^{\circ}$ C 10 分間の処理後、42 $^{\circ}$ C で 30 分間逆転写反応を行い、99 $^{\circ}$ C で 5 分間酵素失活させ、4 $^{\circ}$ C で 5 分間冷却し、cDNA を合成した。

この cDNA を鋳型として TaKaRa Taq (TaKaRa) を用い、2720 Thermal Cycler (Applied

Biosystems) にて PCR 反応を行った。プライマーはヒト RANKL (センス ; 5' -ACC AAC GAG CTG AAG CAG AT-3' , アンチセンス ; 5' -TCC TTG ATG ATT CCC AGG AG-3')、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (センス ; 5' -CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3' , アンチセンス : 5' -GTT AGC AGG AGA CCA AAG ACA CTG CA-3')を用いた。RANKL の PCR 反応は 94°C 9 分間の熱処理後、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 57°C 1 分のステップを 30 サイクル行い伸長反応 72°C 10 分を行った。GAPDH の PCR 反応はアニーリングを 59°C 1 分間とし、25 サイクルを行った。これらの PCR 産物を 1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにより可視化した。

4. 全細胞タンパク質の抽出およびウェスタンブロッティング

間質線維芽細胞を 60 mm 細胞培養皿 (Corning) に播種し 80% 飽和状態まで増殖させ、0.3% BSA を含む無血清 α -MEM 培養液に交換しさらに 16 時間培養した。その後、3 ng/ml の IL-1 α 、あるいは、3 ng/ml の TGF- β を含む 0.3% BSA を含む無血清 α -MEM 培養液で培養した。培養終了後、間質線維芽細胞を PBS にて洗浄後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich) およびフォスファターゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich) を含む細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, pH7.4; RIPA lysis buffer, Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA) で氷上に 20 分間静置し細胞を溶解した。回収した細胞溶解液を 13,400 \times g、20 分間、4°C で遠心分離しその上清を試料とした。試料のタンパク濃度を DC Protein Assay キット (BIO-RAD,

Hercules, CA, USA) を用いて測定した。試料に 5 × Laemmli sample buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 50% グリセロール, 0.05% ブロフェノールブルー, 5% β-メルカプトエタノール) を加え 94°C、5 分間反応させた。25 μg の全細胞タンパク質を 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動終了後のゲルを Tawbin 緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 192 mM グリシン, 20% メタノール) とウェット式転写装置を用いて PVDF メンブレン (BIO-RAD) に転写した。転写したメンブレンを 0.05% Tween 20 を含む PBS (T-PBS) で洗浄後、イムノブロック (DS ファーマバイオメディカル、大阪) で 1 時間室温でブロッキングを行った。一次抗体としてマウス抗リン酸化特異的 p38 抗体 (Cell signaling, Beverly, MA, USA) (1:2000)、ウサギ抗リン酸化特異的 c-Jun 抗体 (Cell signaling) (1:1000)、ウサギ抗リン酸化特異的 ERK1/2 抗体 (Upstate Biotechnology, Waltham, MA, USA) 抗体、ウサギ抗リン酸化特異的 NF - κB 抗体 (Cell signaling) (1:1000) を T-PBS で希釈し 4°C で 16 時間反応を行った。反応終了後、T-PBS で 5 分間 × 3 回洗浄後、二次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (希釈 1:1000) あるいは HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (希釈 1:2500) を含む T-PBS 中で室温で 1 時間反応させた。メンブレンを T-PBS で 5 分間 × 3 回洗浄した後 Amersham™ ECL Plus キット (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) で発光反応を行った。発光シグナルは KODAK Gel Logic 2200 イメージングシステム (Carestream, Rochenster, NY, USA) を用いて検出した。

5. 免疫組織化学染色法

大阪大学歯学部附属病院 口腔外科 1<制御系>で治療を行う患者に対し、検体・試料の研究使用への供託について説明し、同意の得られた患者の KCOT およびエナメル上皮腫の組織を 10%ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィン包埋にした。なお、脱灰を要する標本は 15% EDTA を含む 10%ホルマリン緩衝液で脱灰を行った。その後、厚さ 4 μm のパラフィン切片を作製し、脱パラフィン処理した切片を免疫組織化学染色に用いた。0.01 M クエン酸緩衝液 pH 6.0 で 10 分間 \times 2 回のマイクロウェーブ処理で抗原賦活処理を行い、0.3% 過酸化水素水溶液に 15 分間浸漬させ内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。免疫組織化学染色は Vectastain ABC キット (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて行った。ブロッキングは 0.3% BSA を含む PBS に付属の正常血清を希釈し 30 分室温で処理した。一次抗体として抗 TGF- β 1, 2, 3 マウスモノクローナル中和抗体 (R&D Systems: Clone 1 D11) (希釈 1:10)、抗ヒト RANKL マウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich: Clone 70525.11) (希釈 1:50)、ウサギ抗リン酸化特異的 Smad3 抗体 (Rockland, PA, USA) (希釈 1:500) をブロッキング溶液で希釈し 4 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、ブロッキング溶液に希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、ABC 試薬を 30 分間室温で反応させた後、HISTOFINE-シンプルステイン DAB 溶液(ニチレイバイオサイエンス, 東京)で発色反応を行った。対比染色はメチルグリーン溶液 (Wako、大阪) で行った。

6. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 濃度の測定

24 穴培養プレート (Corning) に飽和状態に増殖した間質線維芽細胞を 0.3% BSA を含む

無血清 α -MEM 培養液で 2 回洗浄した後、0.3% BSA を含む無血清 α -MEM 培養液で 12 時間培養した。その後培養液を交換し試薬を含む 0.3% BSA を含む無血清 α -MEM 培養液で 6 時間培養した培養上清を回収し、 $13,400 \times g$ 、 4°C 、10 分間の遠心分離を行った。更にその上清を回収し、実験に使用するまで -80°C で保存した。培養上清中の PGE_2 濃度を PGE_2 ELISA キット (Cayman Chemical Co.) を用いて、マニュアルに従い、マイクロプレートリーダーで波長 420 nm の吸光度を測定し定量した。実験結果は平均 \pm 標準偏差で表記した。

7. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

TGF- β 刺激による RANKL 転写解析を行うことを目的とし、HEK293 細胞のゲノム DNA を精製し、これを鋳型としてヒト RANKL 遺伝子転写開始点上流 2360 bp (Genbank Accession No; NG_008990, Version: NG008990.1) をもとにプライマー (表 1 : S1-AS1) を設計し、KOD-FX (TOYOBO) を用いて、PCR 法 (98°C 10 秒、進展反応 68°C 2.5 分、40 サイクル) にて増幅した。増幅後、全配列をシーケンスした。pCR $\text{\textcircled{R}}$ 4-TOP0 $\text{\textcircled{R}}$ Vector (TOPO TA Cloning $\text{\textcircled{R}}$ Kit For Sequencing; Invitrogen) にクローニングした後、制限酵素 *EcoRI* にて切断した 2360 bp DNA を pGL3-Basic Vector (Promega) にサブクローニングし、レポーターコンストラクトを構築した。また、制限酵素 (*EcoRV*, *Spe I*, *Apa I*) にて切断したそれぞれ、転写開始点より上流 1254 bp, 1066 bp, 176 bp の配列を同様に pGL3-Basic Vector にてサブクローニングした。さらに、転写開始点より上流 762 bp, 583 bp, 369 bp の配列をそ

れぞれ表 1 に示す (S2-AS1)、(S3-AS1)、(S4-AS1) のプライマーセットで DNA 断片を PCR 増幅し、レポーターコンストラクトを構築した。AP-1 配列を欠失したヒト RANKL プロモーター配列ルシフェラーゼコンストラクトは、転写開始点より上流 -176 bp のルシフェラーゼコンストラクトを鋳型とし、PCR 法にてプライマー (S5-AS1) にてルシフェラーゼコンストラクトを作製した。AP-1 配列の変異型ヒト RANKL プロモーター配列ルシフェラーゼコンストラクトは、-176 bp のルシフェラーゼコンストラクトを鋳型とし、KOD-plus Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて作製した。すなわち、-152 bp の AP-1 配列のコンセンサス配列 TGAC を GTAC へと変異を加えたプライマー (S6-AS2) を用いて、PCR 反応 (98°C 10 秒、59°C 30 秒、6 サイクル) を行い、制限酵素 *Dpn* I で分解処理した。この反応液を T4 Polynucleotide Kinase を用いて、16°C、1 時間反応させ、大腸菌にトランスフォーメーションを行った。陽性コロニーを採取し、プラスミド DNA を精製した。すべてのレポーターコンストラクトは DNA シークエンスにて配列を確認した。

間質線維芽細胞および骨芽細胞を 12 穴細胞培養皿 (Corning) に 70% 飽和状態で播種し、翌日、OPTI-MEM 培地 (gibco) にて 1 時間培養後、Lipofectamine® LTX&Plus Reagent (Invitrogen) を用いて上記のルシフェラーゼコンストラクトにて遺伝子導入した。6 時間培養後、通常の増殖培地に交換して 34-39 時間培養した。その後、TGF- β 存在下でさらに 6 時間培養した。その細胞溶解液を試料とし Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性およびウミシイタケルシフェラーゼ活性

をルミノメーター (Berthold Technologies, Tamil, Nadu, India) を用いて測定した。

遺伝子導入の内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼベクター phRL-TK Vector (Promega) をレポーターコンストラクトと共導入し、実験の標準化のための対照とした。

8. プロモーター配列の転写因子結合部位解析 (配列モチーフ解析)

ヒト RANKL 遺伝子転写開始点上流での転写因子結合部位の配列モチーフ解析には TFSEARCH²⁷⁾ を用いた。

9. ゲルシフトアッセイ

ヒト RANKL プロモーター配列上流の -152 bp に存在する AP-1 結合配列を中心とした 35 mer 二本鎖 DNA (5' -agg agg ccc ttc agt gac aga gat tga gag aga gg-3') をビオチンラベルし、TGF- β で 30 分間刺激した間質線維芽細胞の核タンパクとの結合を Electrophoresis mobility shift assay 法 (LightShift[®] Chemiluminescent EMSA Kit; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) を用いて検討した。

DNA プローブの作製は 3' 末端ビオチン化キット Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Pierce Biotechnology) を用い、核タンパクの抽出は NE-PER[™] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) を使用した。

4 μ g の核タンパク質とプローブ DNA をマニュアルに従い反応させた。結合の競合には 200 倍濃度の非標識 DNA を使用した。10% アクリルアミドゲルに電気泳動し、ナイロンメン

ブレン (Pierce) に転写し、UV クロスリンカー (フナコシ) にてクロスリンクさせ、メンブレン上のビオチン化プローブと核内のタンパクの結合を Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Pierce Biotechnology) を用いて検出した。発光シグナルは KODAK Gel Logic 2200 イメージングシステム (Carestream, Rochester, NY, USA) を用いて検出した。

結果

1. KCOT およびエナメル上皮腫組織における TGF- β , RANKL, およびリン酸化 Smad3 の染色性

著明に骨破壊をきたす代表的な顎骨歯原性腫瘍としてエナメル上皮腫組織での TGF- β と RANKL 発現を免疫組織化学染色で検討した。TGF- β は叢状型エナメル上皮腫 (図 1 A)、濾胞型エナメル上皮腫 (図 1 B) の高円柱上皮、血管内皮細胞に陽性で、間質線維芽細胞にも一部陽性であった。KCOT (図 1 C) では TGF- β は嚢胞裏装上皮に陽性で間質線維芽細胞にも弱陽性を示した。RANKL の染色性はエナメル上皮腫の高円柱上皮細胞や間質線維芽細胞に陽性を示した (図 1 D, E)。病変内の骨組織の骨細胞、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を示し、骨吸収部周辺でより高い RANKL の染色性が認められた (図 1 D)。また、エナメル上皮腫と同様に KCOT の基底細胞側の腫瘍上皮細胞も RANKL 陽性であった (図 1 F)。

エナメル上皮腫、KCOT とともに腫瘍細胞のみならず、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 (図 1 G, H)。

2. IL-1 α と TGF- β の相互作用

腫瘍間質で産生される RANKL が顎骨内の破骨細胞前駆細胞を活性化して、骨吸収を惹起するとの仮定をしていることから、歯原性腫瘍の間質線維芽細胞での RANKL 発現の検討を

行った。まず、当教室 山田らの研究等で示された、IL-1 α および TGF- β の RANKL 発現に対する効果と、それらの細胞内シグナル伝達について検討を行った。

IL-1 α は、KCOT 間質線維芽細胞の COX2 タンパクの発現を増加させ(図 2 A)、強力な RANKL 誘導因子である PGE₂^{15, 28, 29)} 濃度を増加させた (図 2 B) 。また、IL-1 α により RANKL の遺伝子発現増加も RT-PCR で示された。さらに、 IL-1 α と TGF- β の存在下で培養すると、COX2 タンパクおよび PGE₂ 合成がさらに相乗的に促進され (図 2 A, B) 、 RANKL 発現も増強された (図 2 C) 。当教室山田らの研究において、IL-1 α による RANKL 発現は COX2 選択的阻害剤で抑制されたことから、IL-1 α は、COX2 タンパク、その後の PGE₂ 合成を介し RANKL 発現誘導する機序が示唆された。さらに IL-1 α と TGF- β の相互作用は相乗的であり、TGF- β が IL-1 α の作用を増強していることが示唆された。

3. IL-1 シグナルへの TGF- β の及ぼす効果

IL-1 α が受容体に結合し COX2 の転写促進や PGE₂ 合成を促進させる機序には、主として MAP キナーゼ経路³⁰⁾ と NF- κ B を介した経路の 2 通りが報告されている^{15, 28, 31)}。TGF- β が IL-1 α による RANKL 発現を増強させる機序を明らかにするために、MAP キナーゼ経路のリン酸化と NF- κ B のリン酸化を指標に IL-1 α と TGF- β のシグナル伝達でのクロストークを検討した。

IL-1 α は刺激後 15, 30 分で p38 のリン酸化亢進をみとめ、 Jun-N-terminal kinase (JNK) の下流に存在する c-Jun のリン酸化亢進は刺激後 15 分および 30 分で確認できた (図

3)。しかし、IL-1 α とTGF- β で共刺激してもIL-1 α 単独刺激によるp38およびc-Junのリン酸化を増強させなかった。また、同時刺激によるExtracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)のリン酸化亢進も観察されなかった。

次いで、KCOT間質線維芽細胞におけるNF- κ B経路について検討したところ、TGF- β はNF- κ Bをリン酸化しなかったが、IL-1 α とTGF- β の共刺激後30分では、IL-1 α 単独刺激よりも強いNF- κ Bのリン酸化のバンドを認め、TGF- β がIL-1 α によるNF- κ Bのリン酸化を増強させる機序が存在することが示唆された(図4)。

4. 間質線維芽細胞のRANKL発現に対するTGF- β の直接作用

TGF- β は、IL-1 α との相互作用のみならず、単独でもRANKL発現を誘導した(図2C)。この作用機序を検討するため、間質線維芽細胞をシクロヘキシミド処理し、タンパク質合成を阻害した状態でRANKL発現に対するTGF- β の効果を検討した。その結果、シクロヘキシミドで前処理しても、TGF- β はRANKL遺伝子発現を亢進させた(図5)。すなわち、TGF- β シグナルは新たなタンパク合成を介さず、直接RANKL発現を調整しうる可能性が示された。

5. 歯原性腫瘍由来の間質線維芽細胞におけるTGF- β 刺激によるRANKL発現

IL-1 α あるいはTGF- β 刺激は、KCOT由来、エナメル上皮腫由来の間質線維芽細胞のRANKL発現を誘導した。しかし一方で、TGF- β はヒト骨肉腫由来の骨芽細胞株MG63細胞のRANKL発現を誘導しなかった。(図6)

6. TGF- β による RANKL 遺伝子転写調節機構

TGF- β による RANKL 転写調節機構についてルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた検討を行った。

ヒト RANKL 遺伝子のプロモーター領域としては、Kitazawa ら、Roccisana らが報告した^{25, 26)} 転写開始点上流 1200 bp を拡大し 2300 bp をクローニングして、図 7 のごとくプロモーター配列を切断あるいは新たに PCR クローニングして様々な長さのプロモーター配列を構築した。

骨芽細胞株 MG63 細胞、歯嚢線維芽細胞、KCOT 線維芽細胞、エナメル上皮腫間質線維芽細胞に図 7 に示す長さのプロモーター配列を含むコンストラクトをトランスフェクションさせた結果、MG63 細胞では転写開始点より上流 -1254 bp 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、構築したコンストラクトはプロモーター配列として機能していることが示された。(図 8)

一方、歯嚢、KCOT、エナメル上皮腫由来のそれぞれの間質線維芽細胞では、最も短い -176 bp のプロモーターのみが高いルシフェラーゼ活性を示した(図 8)。骨芽細胞株 MG63 細胞と歯原性の線維芽細胞では、ヒト RANKL 遺伝子転写調整が異なる可能性も示唆された。次に MG63 細胞、間質線維芽細胞ともにルシフェラーゼ活性の差が観察された -1066 bp と -176 bp 間に注目し、TGF- β 刺激によりルシフェラーゼ活性の変化を検討した。

図 9 に示すごとく、MG63 細胞では TGF- β により -176 bp のコンストラクトにおいて有

意にルシフェラーゼ活性の抑制を認め、ほかの -1066 bp, -762 bp, -583 bp, -369 bp のコンストラクトではルシフェラーゼ活性に有意な変化を認めなかった。これに対して、エナメル上皮腫間質線維芽細胞では、TGF- β により -583 bp と -176 bp のコンストラクトにおいてルシフェラーゼ活性の亢進が認められたが、そのほかのコンストラクトでは有意な変化を認めなかった。そこで、MG63 細胞にてルシフェラーゼ活性の抑制を、エナメル上皮腫間質線維芽細胞にてルシフェラーゼ活性の促進を認めた -176 bp に着目した。

RANKL 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、TATA Box 上流に CCAAT BOX 遺伝子転写促進配列を、またその上流に AP-1 や GATA-3, p300 などの転写因子結合部位が見出された (図 10)。そのうち、AP-1 領域に着目し、開始点より上流 152 bp 上流の部位で AP-1 結合領域が同定された。

そのうち、AP-1 領域に着目し、AP-1 配列の変異・欠失のコンストラクトを新たに構築し、エナメル上皮腫間質線維芽細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、図 11 に示すごとく、TGF- β 刺激により、AP-1 領域を含む領域ではルシフェラーゼ活性が促進されたのに対し、変異・欠失を行ったコンストラクトでは TGF- β の効果は消失し、エナメル上皮腫間質線維芽細胞において、ルシフェラーゼ活性の亢進作用は消失した。よって TGF- β は AP-1 配列を介し、ヒト RANKL 遺伝子の転写を促進する可能性が示唆された。エナメル上皮腫間質線維芽細胞の核タンパクの AP-1 配列への結合は、AP-1 領域を含む 30 bp の配列をプローブとしたゲルシフトアッセイで解析した。

図 12 に示すように、ベークル処理の核タンパクは、AP-1 ビオチン化プローブと結合しなかったが、TGF- β 刺激後 30 分の核タンパクは AP-1 プローブに結合し、上方にシフトしたバンドが観察され、そのバンドはビオチンラベルされていない DNA との競合にて消失した。

つまり、TGF- β 刺激によって生じた核内タンパク複合体が RANKL 上流-152 bp の AP-1 領域に結合することが確認された。

考察

近年の研究からすべての骨吸収疾患に RANKL の関与が示唆されている⁹⁾が、顎骨に発生する歯源性腫瘍・嚢胞に関しては嚢胞裏装上皮細胞の増殖^{32, 33)}と嚢胞内溶液による圧迫的吸収³⁴⁾が広く受け入れられているに過ぎない。当教室では、歯源性腫瘍が産生するサイトカインも発達過程の歯胚と同様に RANKL を介した破骨細胞の形成を促進させ、骨吸収や骨破壊をきたし腫瘍や嚢胞の増大のメカニズムの一つとなると考え、これまでに、角化嚢胞性歯源性腫瘍 KCOT やエナメル上皮腫が IL-1 や TGF- β を産生し含有することを明らかにしてきた。そして、IL-1 や TGF- β はそれぞれ KCOT 間質線維芽細胞の RANKL 発現を上昇させ、興味深いことにその相互作用は相乗的であった。

関節軟骨の修復などの実験系において、IL-1 などの炎症性サイトカインシグナルと TGF- β シグナルのクロストークが報告されており、IL-1 シグナルは TGF- β シグナルを減弱させること^{23, 24)}、TGF- β シグナルが IL-1 シグナルを抑制すること³⁵⁾、IL-1 シグナルは TGF- β II 型受容体の分解をきたすこと³⁶⁾、抑制型 Smad である Smad7 の発現を促進させ TGF- β シグナルを抑制すること^{23, 24, 37)}、など複雑な負の相互作用が報告されている。一方で、TGF- β 下流の TGF- β activating kinase 1 (TAK1) を介した炎症性サイトカインシグナルによる NF- κ B の活性化³⁸⁾も報告されており、促進する相互作用と負のフィードバック作用等複雑な相互作用が考えられている。しかし、骨吸収に焦点を当てた骨芽細胞や、間質線維芽細胞でのクロストークは報告されていない。

間質線維芽細胞で見られた TGF- β と IL-1 α の RANKL 発現に対する相乗的相互作用は TGF- β が IL-1 α シグナルの NF- κ B 経路を増強させるものであり、その結果として RANKL 遺伝子発現が増強されたと考えている。より詳細な分子機序の解明に、この NF- κ B リン酸化を亢進させる更なる詳細な機序、つまり Smad 経路、 TAK1 経路を含めた検討が今後必要と考えられた。当教室山田らの研究において、IL-1 α と TGF- β の RANKL 発現に対する相乗効果は培養 6 時間から 24 時間で観察され、その後徐々に減弱した。この現象が上述した負のフィードバックを含んでいる可能性も考えられるが、顎骨病変での両因子の生理的意義、病的意義をふまえての検討、考察が必要である。

免疫組織化学染色において TGF- β はエナメル上皮腫瘍細胞と KCOT の腫瘍裏装上皮細胞に陽性で、それぞれの、間質の血管内皮細胞や間質線維芽細胞の一部に陽性であった。当教室山田らの研究では、KCOT 内容液には非常に高濃度、平均 7.8 ng/ml (n=9) の TGF- β を含有していた。この高濃度の TGF- β の由来としては、嚢胞上皮細胞、間質組織、骨吸収に伴う骨からの放出、が考えられるが、歯原性上皮細胞を含め組織全体として TGF- β が病変内に作用しているものと考えられた。リン酸化 Smad の核内局在は TGF- β シグナルが活性化されていることを意味する。実際、リン酸化特異的 Smad3 は TGF- β 陽性部位である歯原性上皮細胞の核内に最も染色性が強く、周囲の間質線維芽細胞にも陽性で、上皮由来の TGF- β は腫瘍上皮細胞自身に対する作用と近傍の間質線維芽細胞への作用を有する可能性が示唆された。RANKL の染色は予想に反し、腫瘍上皮細胞、間質線維芽細胞、間質浸

潤リンパ球に陽性であった。過去の報告においてエナメル上皮腫^{39, 40)}、扁平上皮癌^{5, 41)}そして前立腺癌細胞⁴²⁾において同様に上皮細胞での染色性の報告があり、腫瘍細胞が直接 RANKL を発現、提示し、破骨細胞形成を支持する可能性も考えられている。しかし、顎骨腫瘍上皮細胞が直接骨面に接触している組織像は観察されず、必ず間質線維芽細胞が介在している。図 1 D に示すように、切片内の陽性コントロールとなる骨芽細胞、骨細胞の細胞質に RANKL は陽性で、それと同等に間質線維芽細胞も陽性を示した。特に、骨吸収窩近傍の間質線維芽細胞の染色性は強く、間質線維芽細胞が破骨細胞形成を支持しうることが強く示唆された。腫瘍上皮細胞に染色される RANKL の作用は不明であるが、病変組織全体として組織内 RANKL 濃度を高めることには寄与しているものと推察された。

TGF- β は、CHX 処理した間質線維芽細胞の RANKL 発現を亢進したことから、新たなタンパク質合成を介せずに RANKL 遺伝子発現を促進しうる可能性を意味している。一方、TGF- β は骨芽細胞の RANKL 発現を抑制させるという報告⁴³⁾が多く、本研究で示した間質線維芽細胞の RANKL 発現を促進することとは相反する現象である。他の細胞種では、TGF- β が骨髄由来血管内皮細胞や前立腺癌細胞⁴²⁾の RANKL 発現を促進するとの報告⁴⁴⁾もあり、細胞種により RANKL 遺伝子の発現調整が異なっている可能性を考えた。そこで、TGF- β 刺激による RANKL 転写調節機構についてルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた検討を行った。

ヒト RANKL 遺伝子のプロモーターの解析の報告は少なく、転写開始点より上流 -1.2

kbp の解析がはじめに報告された^{25, 26)}。一方、マウス RANKL 遺伝子プロモーター領域では、転写開始点上流、約 70 kbp 以上にも転写調節領域が存在する可能性も報告されている⁴⁵⁾。しかし、この後者の解析はいまだ確立されておらず、ヒト RANKL 遺伝子での報告もない。一方、転写開始点より上流 1.2 kbp 以内には VDR, Cbfa1, AP-1 などのエレメントが存在し、増殖因子やサイトカイン、ホルモンにより転写調節されうる可能性を考慮し、本研究ではこの領域を含む 2360 bp のゲノム DNA をクローニングして間質線維芽細胞での転写活性を解析するに至った。今回クローニングしたプロモーター配列のうち、転写開始点より上流 -1254 bp より短いプロモーター配列は MG63 細胞において、高いルシフェラーゼ活性を有し、構築したコンストラクトはプロモーター配列として機能することが示された。

興味深いことに、骨芽細胞 (MG63 細胞) と異なり歯原性間質線維芽細胞においては、転写活性が -176 bp の配列でのみで高かった。この -176 bp には図 10 に示すように、TATA-Box や CCAAT-Box などの転写開始に必須な基本転写因子の結合部位が存在し、ほかにも p300, GATA-3, AP-1 など骨芽細胞に重要なエレメント配列が含まれていた。間質線維芽細胞において、ルシフェラーゼ活性変化を見たところ、この -176 bp プロモーター配列で TGF- β 刺激によるルシフェラーゼ転写活性は上昇した。

TGF- β シグナルは Smad 経路と非 Smad 経路に分類され、Smad 経路は、Smad エレメント配列を介して DNA に結合する場合、他の転写因子のコファクターとして転写因子複合体形

成の架橋として作用する場合、がある⁴⁶⁾。非 Smad 経路においては、MAP キナーゼ、プロテインキナーゼ C、などのシグナルの下流で、さまざまな転写因子が活性化されることが知られている^{47, 48)}。少なくとも、RANKL 遺伝子上流 2.3 kbp には Smad エlement配列は存在せず、Smad が Co-Factor として作用する可能性、もしくは非 Smad 経路による転写因子活性化を可能性として考えた。

Element解析の結果から、Smad 経路、非 Smad 経路に共通する AP-1 領域にまず着目し、その変異・欠失コンストラクトを用いてレポーターアッセイを行ったところ、AP-1 の関与が示される結果となった。さらに、EMSA (ゲルシフトアッセイ) にて TGF- β 刺激により AP-1 配列に結合する核内タンパクの存在が示された。今回の AP-1 の関与が、Smad 経路を介しているのか、非 Smad 経路を介しているのか未だ明らかにできていない。今後は EMSA でのスーパーシフトアッセイや免疫沈降等の手法を用いて AP-1 に結合するタンパク複合体の解析をすることにより、さらなる転写調節機序を明らかに出来ると考えている。それにより、顎骨病変に限らず、骨吸収に関連する病態理解が深まることが期待される。

本研究で見いだされた実験結果から、1) IL-1 α および TGF- β はそれぞれ歯原性腫瘍間質線維芽細胞の RANKL 発現を促進させ、TGF- β は IL-1 α による NF- κ B 活性化、COX2 産生、PGE₂ 合成を介して RANKL 発現を促進する間接的作用と、2) RANKL 転写開始点上流の AP-1 結合領域を介して転写活性を促進する直接的作用、の2つの作用機序によって

RANKL 発現を促進させることが示された。そして、 RANKL を発現する間質線維芽細胞が歯
原性腫瘍による骨吸収・骨破壊に寄与する可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科統合機能口腔科学専攻顎口腔病因病態制御学講座、古郷幹彦 教授（口腔外科学第一教室）に深甚なる謝意を表します。

また本研究の進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました大阪大学大学院歯学研究科統合機能口腔科学専攻顎口腔病因病態制御学講座 相川友直 講師（口腔外科学第一教室）に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を行うにあたり、多大なご協力を頂きました、大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 顎口腔病理病態学教室（口腔病理学教室）の先生方、口腔分化発育情報学講座 顎口腔発生分子発生生物学教室（口腔解剖学第一教室）阿部真士 助教、山田智明 医員、宮川和晃 医員をはじめとする統合機能口腔科学専攻顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科第一教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

また、終始変わらぬ協力と理解を示してくれた家族に感謝いたします。

引用文献

- 1) Boyce BF. (2013): Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res.* 92 :860-867.
- 2) Zuo C, Huang Y, Bajis R, Sahih M, Li YP, Dai K, Zhang X. (2012): Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporos Int.* 23:1653-1663.
- 3) Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. (2011): Osteoporosis: now and the future. *Lancet.* 377:1276-1287.
- 4) Yoneda T, Tanaka S, Hata K. (2013): Role of RANKL/RANK in primary and secondary breast cancer. *World J Orthop.* 4:178-185.
- 5) Jimi E, Shin M, Furuta H, Tada Y, Kusakawa J. (2013): The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (Review). *Int J Oncol.* 42:803-809.
- 6) Huang L, Xu J, Wood DJ, Zheng MH. (2000): Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in giant cell tumor of bone: possible involvement in tumor cell-induced osteoclast-like cell formation. *Am J Pathol.* 156:761-767.
- 7) Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, Kawaguchi H, Tanaka S, Nishikawa T, Koshihara Y. (1997): A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:279-286
- 8) Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S (2000): Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:259-269
- 9) Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. (1999): Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 402:304-309.
- 10) Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita K, Omura K, Nguyen ST, Miki Y, Iimura T, Himeno A, Akashi T, Yamada-Okabe H, Ogata E, Yamaguchi A. (2010): Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers: significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Am J Pathol.* 176:968-980.
- 11) Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karim NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion

- of periodontal disease. *Am J Pathol.* 169:987-98
- 12) Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. (2011): Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. *Eur J Orthod.* 33:335-343.
 - 13) Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC. (1998): Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11846-11851.
 - 14) Kitahara Y., Suda N, Kuroda T, F. Beck, V.E. Hammond, Takano Y (2002): Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. *Bone.* 30:48-56
 - 15) Oka S, Kubota Y, Yamashiro Y, Ogata S, Ninomiya T, Ito S, Shirasuna K. (2005): Effects of Positive Pressure in Odontogenic Keratocysts. *J Dent Res.* 84:913-918
 - 16) Blair HC, Robinson LJ, Zaidi M. (2005): Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 328:728-738.
 - 17) Fox SW, Evans KE, Lovibond AC. (2008): Transforming growth factor-beta enables NFATc1 expression during osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 366 :123-128.
 - 18) Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. (2002): Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13:323-334.
 - 19) Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE. (2004): In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch Oral Biol.* 49:451-456.
 - 20) Liu D, Yao S, Pan F, Wise GE. (2005): Chronology and regulation of gene expression of RANKL in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci.* 113:404-409.
 - 21) Leask A, Abraham DJ. (2004): TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18 :816-827.
 - 22) O'Neill LA. (2002): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol.* 270:47-61.
 - 23) Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. (2007) :Modulation of TGF- β signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 15:1367-1377.
 - 24) Ishida Y, Kondo T, Kimura A, Matsushima K, Mukaida N. (2006): Absence of IL-1 Receptor Antagonist Impaired Wound Healing along with Aberrant NF- κ B Activation and a Reciprocal Suppression of TGF- β Signal Pathway. *J Immunol.* 176:5598-5560.
 - 25) Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, Kitazawa R. (2003) : Vitamin D₃ supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene

- promoter. *J Cell Biochem.* 89:771-777.
- 26) Roccisana JL, Kawanabe N, Kajiya H, Koide M, Roodman GD, Reddy SV. (2004): Functional role for heat shock factors in the transcriptional regulation of human RANK ligand gene expression in stromal/osteoblast cells. *J Biol Chem* 279:10500-10507.
 - 27) Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. (1998): Databases on transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 26:362-367.
 - 28) Ogata S, Kubota Y, Yamashiro T, Takeuchi H, Ninomiya T, Suyama Y, Shirasuna K. (2007) : Signaling pathways regulating IL-1 α -induced COX-2 expression. *J Dent Res.* 86:186-191.
 - 29) Li X, Pilbeam CC, Pan L, Breyer RM, Raisz LG. (2002): Effects of prostaglandin E2 on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone.* 30:567-573.
 - 30) Fukushima H, Jimi E, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. (2005): IL-1-induced receptor activator of NF- κ B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. *Bone.* 36:267-275.
 - 31) Burke SJ, Collier JJ. (2011): The gene encoding cyclooxygenase-2 is regulated by IL-1 β and prostaglandins in 832/13 rat insulinoma cells. *Cell Immunol.* 271:379-384.
 - 32) Thosaporn W, Iamaroon A, Pongsiriwet S, Ng KH. (2004): A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. *Oral Dis.* 10:22-26.
 - 33) El Murtadi A, Grehan D, Toner M, McCartan BE. (1996): Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 81:217-220.
 - 34) Y. Kubota, T. Yamashiro, S. Oka, T. Ninomiya, S. Ogata, K. Shirasuna (2004): Relation between size of odontogenic jaw cysts and the pressure of fluid within. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 42:391-395.
 - 35) Lee YS, Kim JH, Kim ST, Kwon JY, Hong S, Kim SJ, Park SH. (2010): Smad7 and Smad6 bind to discrete regions of Pellino-1 via their MH2 domains to mediate TGF- β 1-induced negative regulation of IL-1R/TLR signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 393:836-843.
 - 36) Baugé C, Legendre F, Leclercq S, Elissalde JM, Pujol JP, Galéra P, Boumédiène K. (2007): Interleukin-1 β impairment of transforming growth factor β 1 signaling by

- DOWN-REGULATION of transforming growth factor β receptor type II and up-regulation of Smad7 in human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 56: 3020-3032.
- 37) Lan HY, Chung ACK. (2011): Transforming Growth Factor- β and Smads. *Diabetes and the Kidney*. 170:75-82.
- 38) Sakurai H. (2012): Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 33:522-530.
- 39) da Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. (2008): Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 105:333-341.
- 40) Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Favero L, Strocchi R. (2004): Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in odontogenic cysts. *Int Endod J*. 37:7-11.
- 41) Chuang FH, Hsue SS, Wu CW, Chen YK. (2009): Immunohistochemical expression of RANKL, RANK, and OPG in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 38:753-758.
- 42) Zhang J, Lu Y, Dai J, Yao Z, Kitazawa R, Kitazawa S, Zhao X, Hall DE, Pienta KJ, Keller ET. (2004): In vivo real-time imaging of TGF-beta-induced transcriptional activation of the RANK ligand gene promoter in intraosseous prostate cancer. *Prostate*. 59:360-369.
- 43) Quinn JM, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin TJ, Gillespie MT. (2001): Transforming Growth Factor β Affects Osteoclast Differentiation via Direct and Indirect Actions. *J Bone Miner Res*. 16: 1787-1794.
- 44) Ishida A, Fujita N, Kitazawa R, Tsuruo T. (2002): Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J Biol Chem*. 277:26217-26224.
- 45) Kim S, Yamazaki M, Zella LA, Meyer MB, Fretz JA, Shevde NK, Pike JW. (2007): Multiple enhancer regions located at significant distances upstream of the transcriptional start site mediate RANKL gene expression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 103:430-434.
- 46) Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH. (2011): Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene*. 32:1609-1615.
- 47) Matsumoto T, Kuriwaka-Kido R, Kondo T, Endo I, Kido S. (2011): Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. *Endocr J* 59:91-101.

- 48) Busnadiego O, González-Santamaría J, Lagares D, Guinea-Viniegra J, Pichol-Thievend C, Muller L, Rodríguez-Pascual F. (2013): LOXL4 Is Induced by Transforming Growth Factor β 1 through Smad and JunB/Fra2 and Contributes to Vascular Matrix Remodeling. *Cell. Biol.* 33:2388-2401.

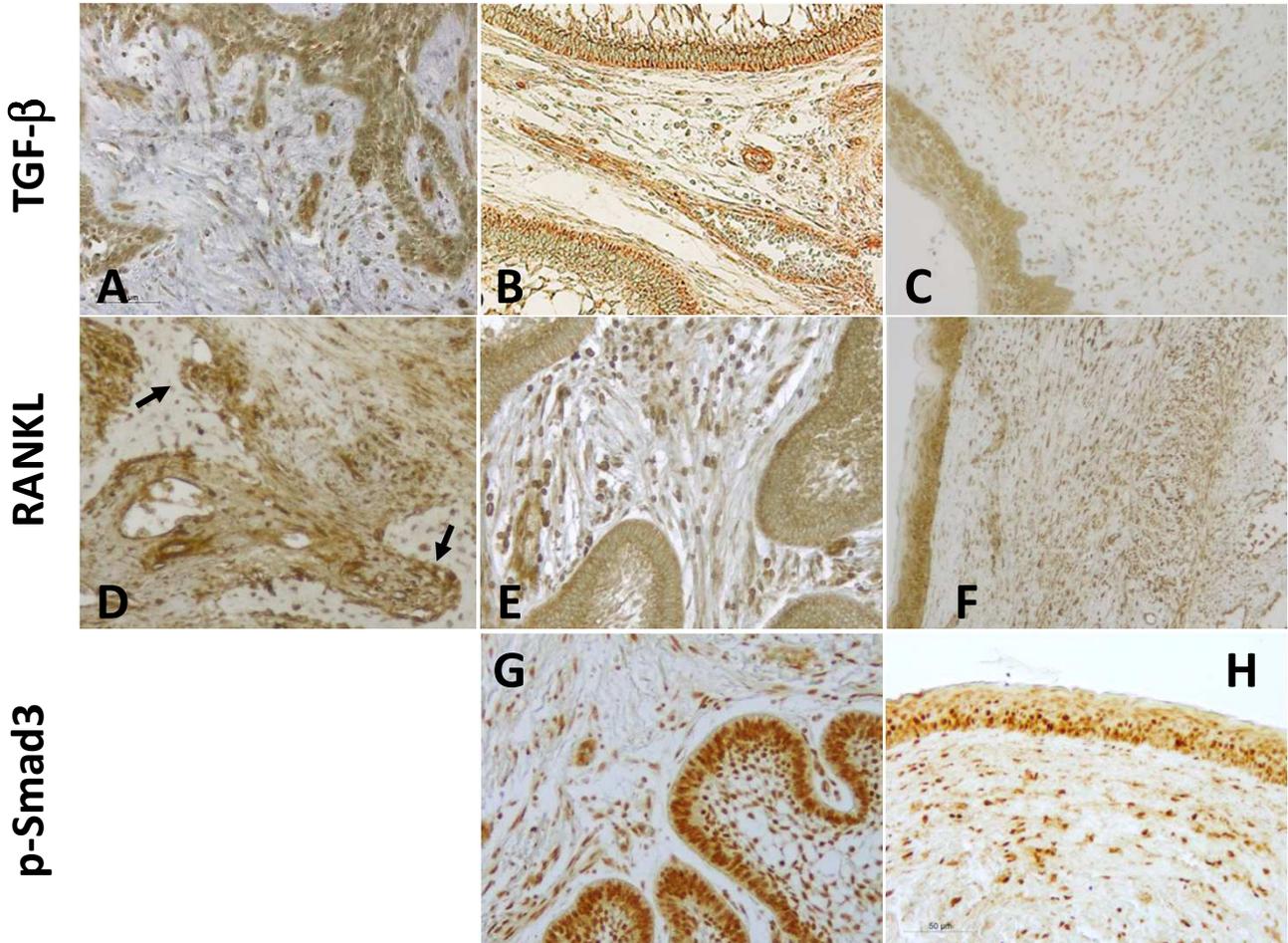
脚注

大阪大学大学院歯学研究科統合機能口腔科学専攻顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科第一教室）

本論文の要旨の一部は、第 58 回（社）日本口腔外科学会総会・学術大会（2013 年、福岡）にて発表した。

エナメル上皮腫

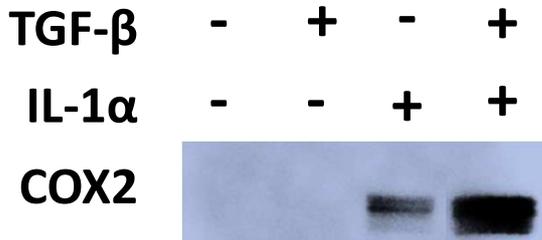
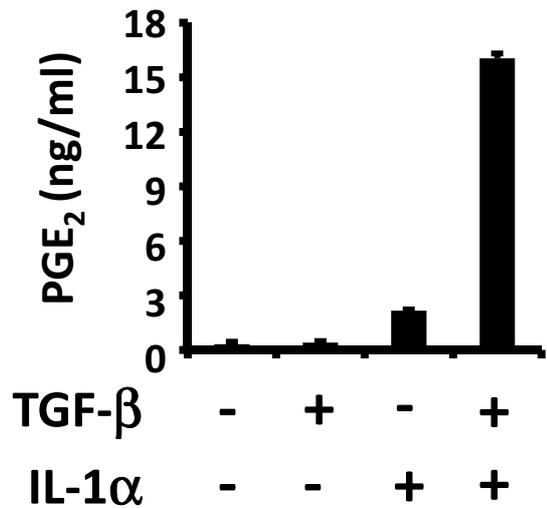
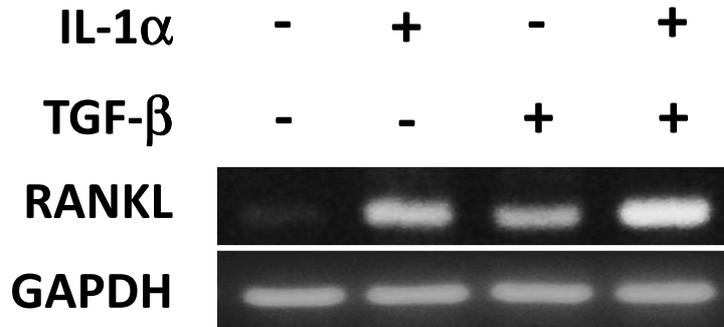
KCOT



100 μm

図1 エナメル上皮腫(A, B, D, E, G)、KCOT (C, F, H)における TGF- β , RANKL, p-Smad3 の免疫染色

バーは 100 μ m を示す。写真 D の矢印は病変内の顎骨の吸収窩を示す。叢状型エナメル上皮腫 (A)、濾胞型エナメル上皮腫 (B) とともに高円柱上皮、血管内皮細胞に TGF- β 陽性で間質線維芽細胞にも一部陽性であった。KCOT (C) 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 (D, E)。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 (D)。エナメル上皮腫、KCOT と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 (G, H)。

A**B****C****図2 TGF- β とIL-1 α の相互作用**

IL-1 α , TGF- β あるいはその両因子存在下にて6時間培養した KCOT 間質線維芽細胞の A) COX2 発現をウェスタンブロット法にて、B) 培養液中の PGE₂ 濃度を ELISA 法にて、C) RANKL 発現を RT-PCR 法にて、検討した。

TGF- β は COX2 の発現、PGE₂ 合成に影響しなかったが、IL-1 α は、COX2 の発現、PGE₂ 合成を促進させた。そして、TGF- β 存在下では COX2 発現、PGE₂ 合成は相乗的に促進された。

IL-1 α や TGF- β 刺激により RANKL 発現は促進されたが、その両因子の刺激により RANKL 発現はさらに促進された。

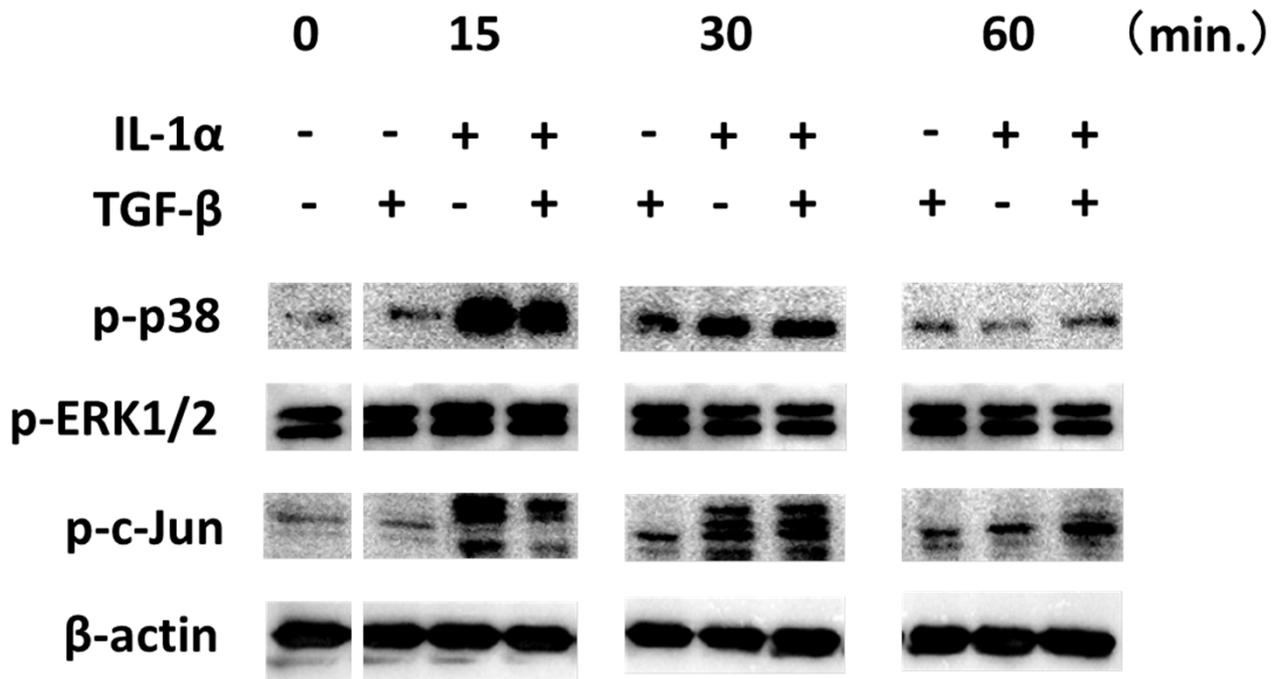


図3 KCOT 間質線維芽細胞における MAP キナーゼ経路を介した IL-1 シグナル伝達への TGF- β の影響

IL-1 α , TGF- β あるいはその両因子にて、KCOT 間質線維芽細胞を示された時間刺激し、回収した全細胞のタンパク質を用いて MAP キナーゼ経路の活性化をウェスタンブロットにて検討した。IL-1 α は刺激後 15 分で p38 のリン酸化、c-Jun のリン酸化の促進を認めた。しかしながら、IL-1 α と TGF- β の同時刺激でも、IL-1 α 単独刺激に比べ、更なるリン酸化の増強を認めなかった。

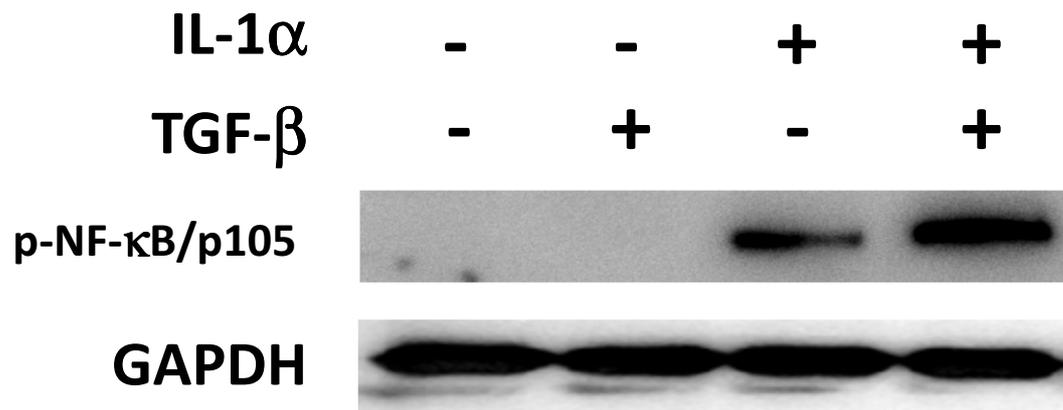


図4 TGF- β の KCOT 間質線維芽細胞における Nuclear factor- κ B (NF- κ B) リン酸化を介した IL-1 α シグナルへの影響
 IL-1 α 、TGF- β あるいはその両因子にて、KCOT 間質線維芽細胞を 30 分間刺激し、回収した全細胞のタンパク質を用いて NF- κ B の活性化をリン酸化特異的抗体を用いてウェスタンブロット法で検討した。TGF- β 刺激で NF- κ B のリン酸化バンドは見られなかったが、IL-1 α と TGF- β の同時刺激では IL-1 α 単独刺激よりも強い NF- κ B のリン酸化のバンドを認めた。

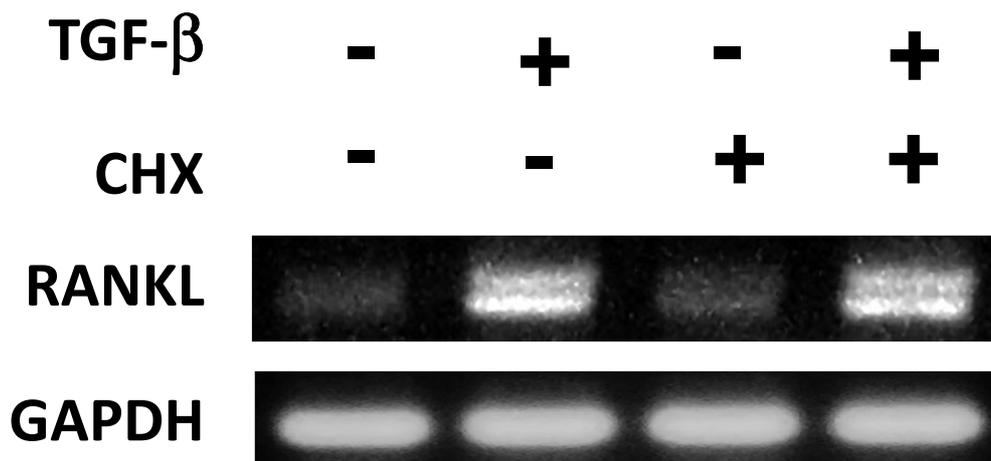


図5 TGF- β 刺激による間質線維芽細胞における RANKL 発現
 100 μ g/ml シクロヘキシミド (CHX) にて 30 分間細胞を処理してタンパク
 合成を阻害後、TGF- β 存在下で 6 時間培養した細胞の RANKL 発現を
 RT-PCR 法にて検討した。シクロヘキシミドにて前処理を行っても RANKL
 遺伝子発現の亢進を認めた。

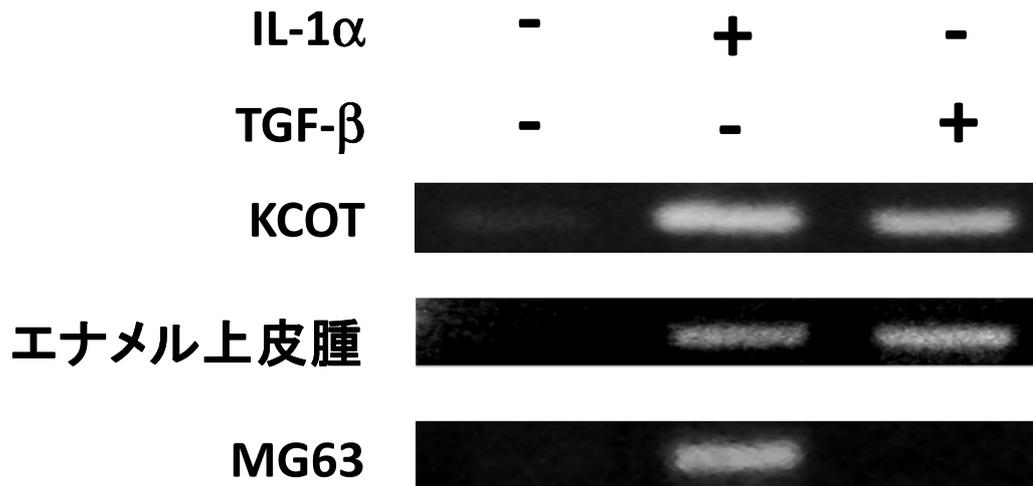


図 6 TGF- β は歯源性腫瘍由来の間質線維芽細胞のRANKL 発現を誘導する
 図に示す歯源性腫瘍間質線維芽細胞において、IL-1 α , TGF- β は RANKL 発現を誘導した。一方、TGF- β はヒト骨肉腫由来の骨芽細胞株 MG63 細胞の RANKL 発現を誘導しなかった。

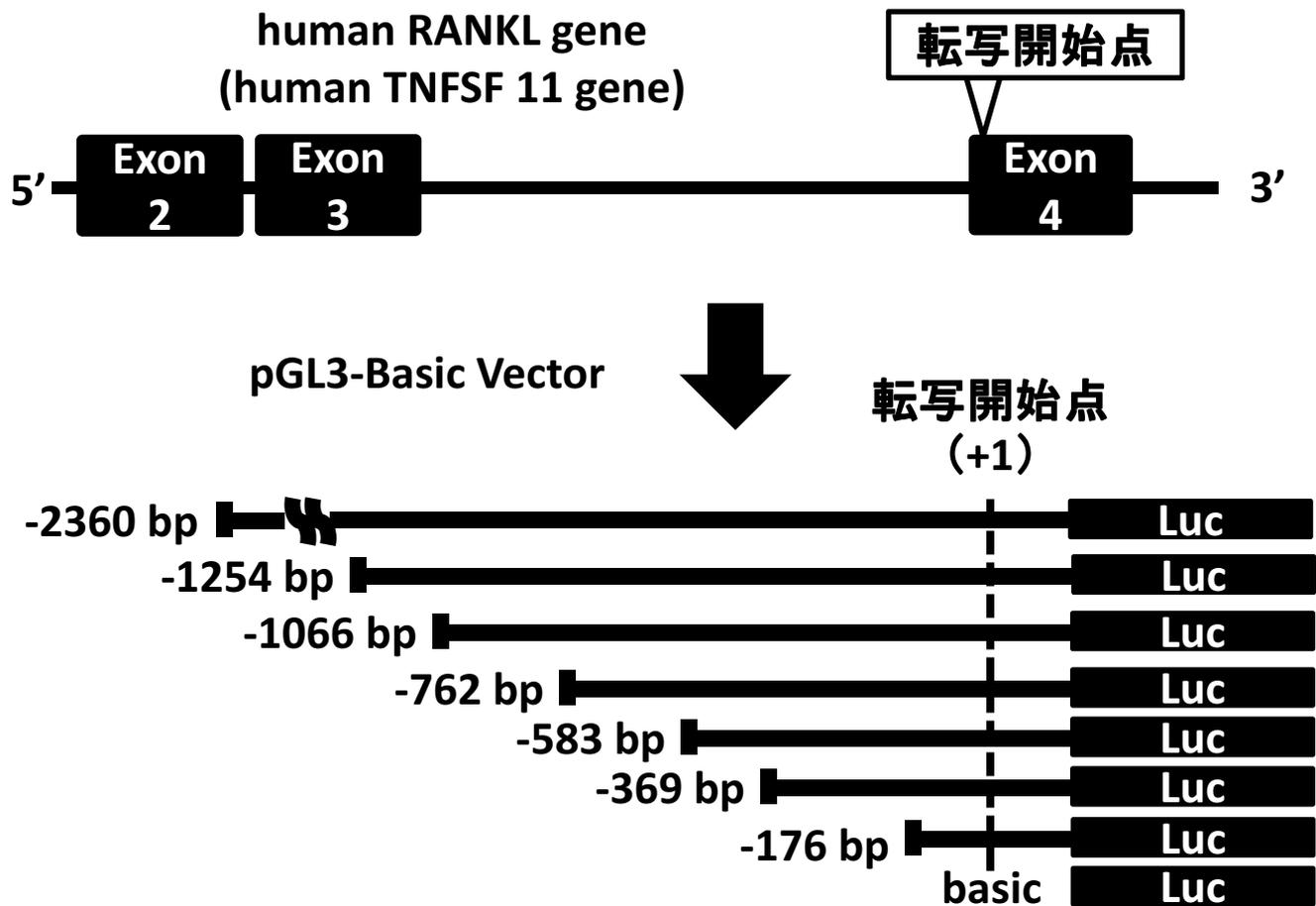


図7 ヒト RANKL プロモーター配列のルシフェラーゼレポーターコンストラクトの作製

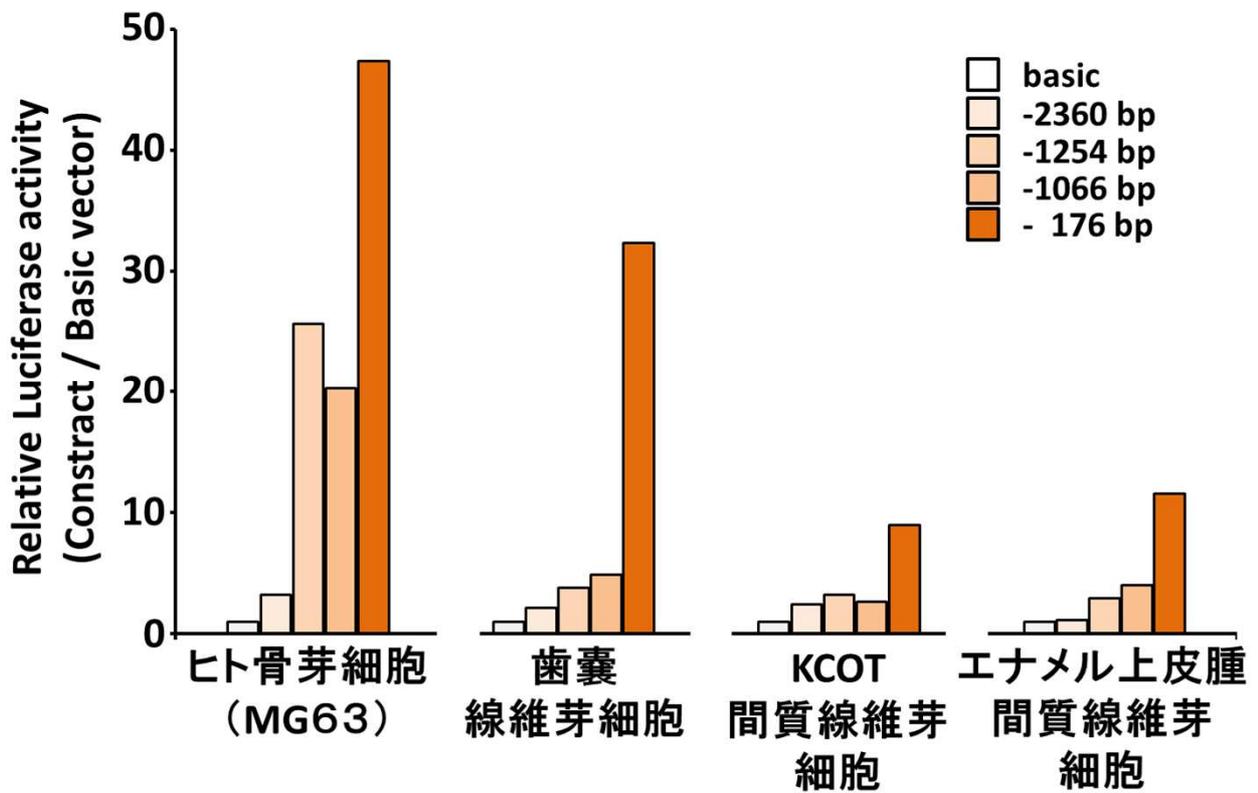


図 8 骨芽細胞・歯嚢・歯原性腫瘍間質細胞における RANKL プロモーター配列のルシフェラーゼ活性
 縦軸は Mock pGL3 basic ベクターを基準とした各コンストラクトのルシフェラーゼ活性の相対値を示す。
 その結果、MG63 は転写開始点より上流 -1254 bp より短いプロモーター配列で高いルシフェラーゼ活性を示した。歯嚢、KCOT、エナメル上皮腫の間質線維芽細胞においては、最も短い -176 bp のプロモーターでのみ高いルシフェラーゼ活性を示した。

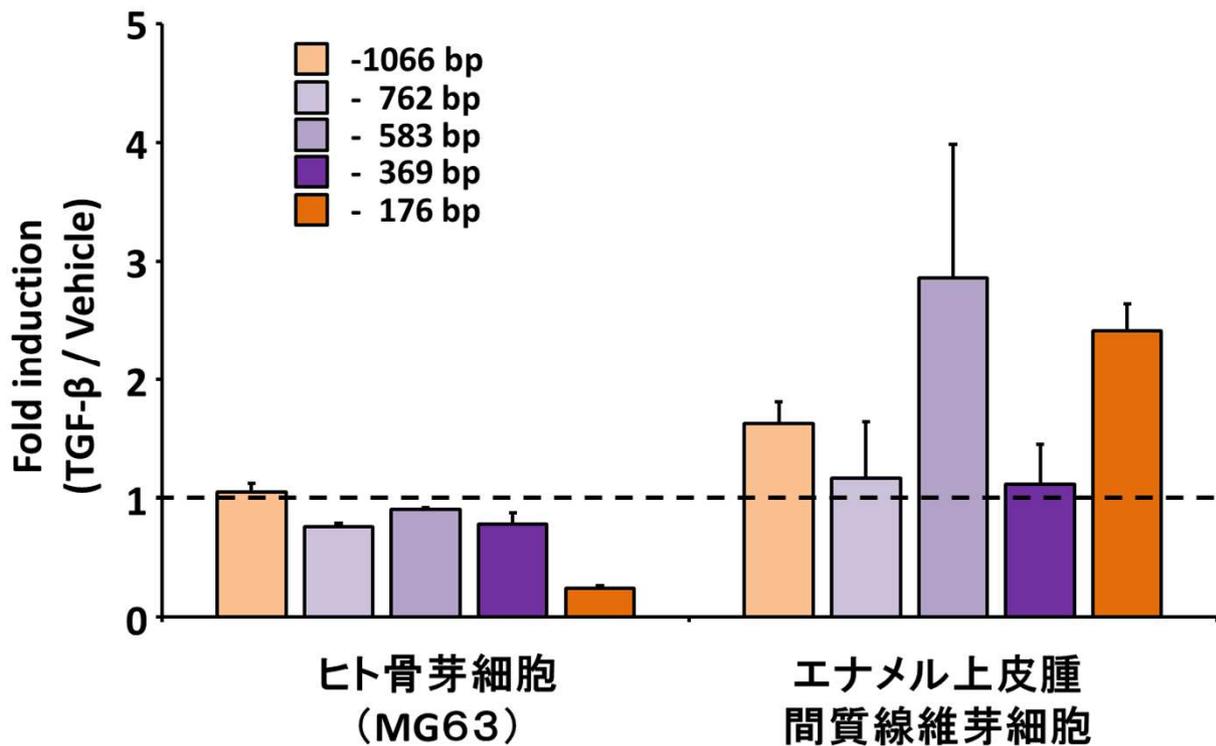


図9 各種ヒト RANKL プロモーター配列での TGF- β による活性の変化
 縦軸は、対照に対する TGF- β 刺激のレポーター活性の比を示す。レポーター活性にはホタルルシフェラーゼ (Firefly) / ウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla) のルシフェラーゼ活性値の比を用いた。MG63 では -176 bp において有意に活性の抑制を認めたが、エナメル上皮腫間質線維芽細胞では -583 bp, -176 bp において有意に活性の亢進が認められた。

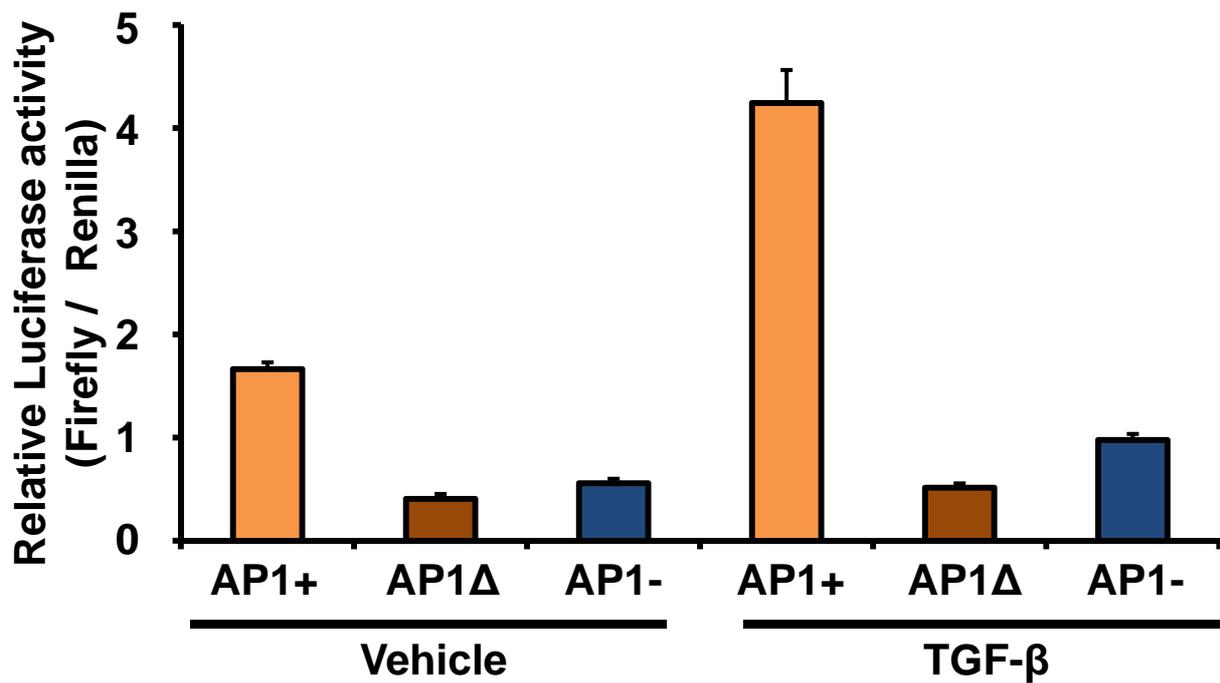


図 11 AP-1 配列の変異・欠失の TGF-β 刺激によるルシフェラーゼ活性への影響

AP-1 配列のコンセンサス領域の2つのヌクレオチドに変異を加えた AP1Δ、および AP-1 配列を欠失させた AP1 - のコンストラクトを作製し、エナメル上皮腫間質線維芽細胞を用いてレポーターアッセイを行った。図の縦軸は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性 (Renilla) に対するホタルルシフェラーゼ活性 (Firefly) の値を示す。TGF-β 刺激により、AP-1 領域を含むコンストラクト (AP1 +; -176 bp) では活性が促進されたのに対し、AP1Δ, AP1 - ではレポーター活性の亢進作用は消失した。

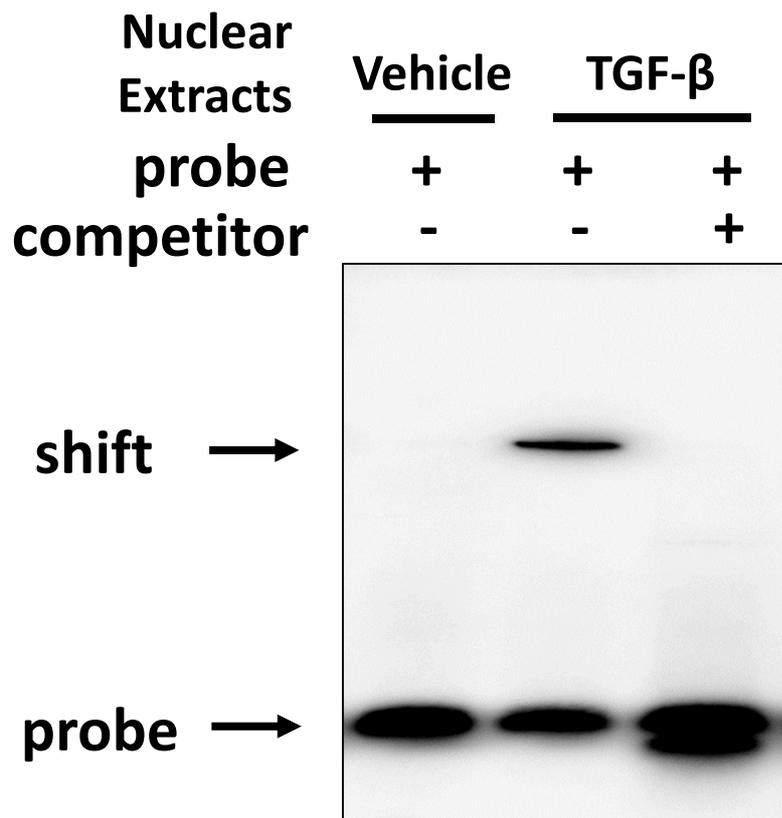


図 12 EMSA (ゲルシフトアッセイ)によるヒト RANKL 遺伝子上流の AP-1 領域への核内タンパク質の結合

ヒト RANKL プロモーター配列上流の -152 bp に存在する AP-1 結合配列を中心とした 35 mer 二本鎖 DNA をビオチンラベルし、TGF- β で 30 分間刺激した間質線維芽細胞の核タンパクとの結合を EMSA にて検討した。4 μ g の核タンパク質とプローブ DNA をマニュアルに従い反応させた。結合の競合には 200 倍濃度の非標識 DNA を反応させた。ビークル処理の核タンパクは、AP-1 ビオチン化プローブと結合しなかったが、TGF- β 刺激後 30 分の核タンパクは AP-1 プローブに結合し上方にシフトしたバンドが観察され、そのバンドはビオチンラベルされていない DNA との競合にて消失した。

歯原性腫瘍間質線維芽細胞

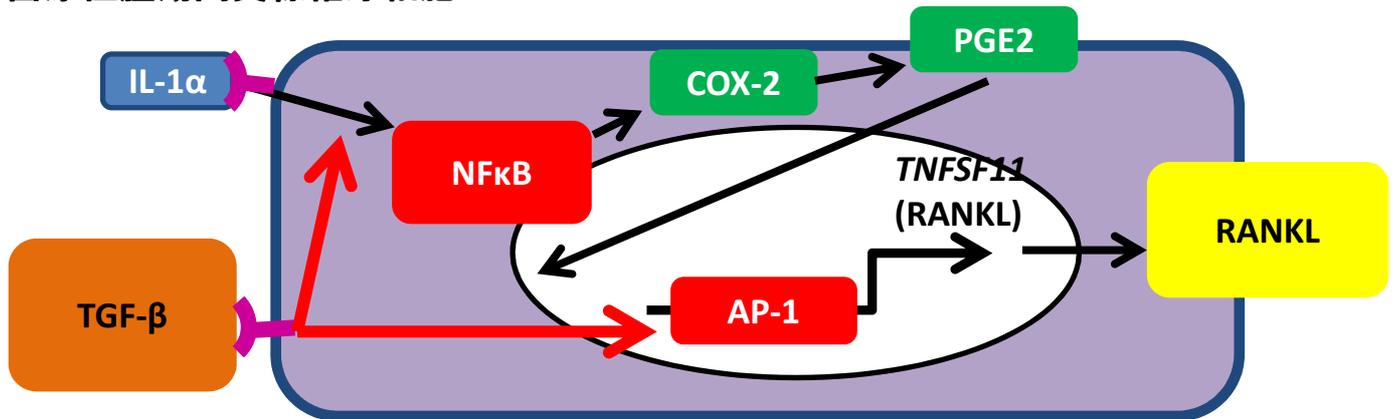


図 13 歯原性腫瘍由来のサイトカイン(IL-1 α 、TGF- β)による間質線維芽細胞での RANKL 発現

歯原性腫瘍間質線維芽細胞において IL-1 α および TGF- β はそれぞれ RANKL 発現を促進させ、TGF- β 刺激は IL-1 α による NF- κ B 活性化を増強し、COX2 産生、PGE₂ 合成を促進する間接作用と、RANKL 転写開始点上流の AP-1 結合領域を介した直接作用 の2つによって RANKL 発現を促進させることが示され、歯原性腫瘍による骨吸収機序への寄与が示唆された。

S1; 5'-ACC TGT GAA ACA GCA GCA GGT AG-3',
S2; 5'-GCC CTA GCA AGG TTT CTT TAG CA-3'
S3; 5'-GGC TCT CTA CTG CCA CAT TCA AG-3'
S4; 5'-CTC CAG GAT GTG AAG TCC CTT CT-3'
S5; 5'-AGA GAG AGG GAG GGC GAA AGG AA-3'
S6; 5'-GTA CAG AGA TTG AGA GAG AGG GA-3'

AS1; 5'-CCA CGC AGG TAC TTG GTG TAG TC-3'
AS2; 5'-CTG AAG GGC CTC CTT CAT G-3'

表 1 RANKL 遺伝子プロモーター領域のクローニング、プロモーターコンストラクトの作製に使用したプライマー