

## 論文要旨等報告書

氏名	下江 正幸
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 0 9 0 号
学位授与の日付	平成 2 2 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Smad2による歯肉上皮細胞の増殖制御に関する研究

論文審査委員 教授 高柴 正悟 准教授 久保田 聡 教授 山本 敏男

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

歯周炎によって破壊された歯周組織の再生を導こうとする場合、間葉系組織である歯根膜、歯槽骨、およびセメント質の増殖と、外胚葉系組織である歯肉上皮の接合深部への増殖抑制といった発生学的に異なった組織の制御が必要である。すなわち、上皮細胞の増殖スピードは間葉系細胞のそれと比較して速いため、歯周外科による創傷治癒後の上皮の深部増殖を抑制することによって、間葉系細胞が再生するための時間的および空間的な場を提供することが必須と考えられている。

トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- $\beta$  : TGF- $\beta$ ) は、上皮細胞の増殖を強力に抑制する増殖抑制因子として知られている。TGF- $\beta$ は、細胞表面に存在するI型のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体 (TGF- $\beta$ I型受容体) を介し、細胞内の Smad を活性化してそのシグナルを伝達する。Smad2 は、cyclin-dependent kinase の阻害物質である p15 および p21 の遺伝子発現を亢進させることで、細胞周期の G1 期を停止させ細胞の増殖を抑制することが知られている。さらに TGF- $\beta$ は、アポトーシスの誘導、細胞外マトリックスの産生など多彩な生理作用を有することが知られており、近年、TGF- $\beta$ -Smad シグナルは上皮の創傷治癒過程において重要な役割を果たすことが報告されている。

本研究では歯周組織において Smad2 の発現を制御することは歯肉上皮の深行増殖の抑制に繋がるとの仮説を立て、Smad2 による歯肉上皮細胞の表現型の変化、およびそれを制御するメカニズムを解明することを目的とし、Smad2 遺伝子を上皮特異的に過剰発現させたマウス口蓋歯肉の上皮細胞における表現型および Smad2 のリン酸化のシグナル伝達経路を検討した。

#### 【材料・方法】

1. **マウス:** *keratin 14* プロモーター制御下で *smad2* を過剰発現するトランスジェニックマウス (*K14-Smad2<sup>+</sup>* : Ito et al, 2001) の 3~4 週齢を実験に用いた。
2. **歯肉上皮細胞の分離・培養:** *K14-Smad2<sup>+</sup>* および野生型マウスの口蓋歯肉から分離した上皮様細胞 TG および WT をそれぞれ培養し、実験には 1~2 継代の細胞を用いた。また、TGF- $\beta$ 受容体阻害実験には、TGF- $\beta$ I型受容体阻害物質である SB431542 を 10  $\mu$ M の分量で用いた。

3. **免疫蛍光染色法**: 上皮系細胞マーカーの pan-cytokeratin, 間葉系細胞マーカーの vimentin, Smad2, およびリン酸化 Smad2 (P-Smad2) の局在を免疫染色して蛍光顕微鏡で検出した。
4. **ウェスタンブロット法**: 細胞総蛋白を SDS-PAGE にて分画し, Smad2 および P-Smad2 の蛋白産生量を定量した。
5. **細胞増殖能の測定法**: 生細胞の代謝を測定する MTS 法と DNA 複製期の Bromodeoxyuridine (BrdU) 量を測定する BrdU 法を併用して, 細胞増殖能を測定した。
6. **スクラッチ後の細胞遊走能**: 培養皿上に付着した上皮細胞をマイクロピペットの先端にて剥がし, そのスペースに遊走する細胞の面積を測ることで, 細胞遊走能を測定した。
7. **アポトーシス細胞の TUNEL 染色**: 細胞内の断片化 DNA に標識した dUTP を検出し, アポトーシスを判定した。

#### 【結果】

1. 分離・培養した上皮様細胞は, cytokeratin陽性でvimentin陰性であった。また, 細胞内に局在するTGのSmad2とP-Smad2はWTのものより多かった。
2. TGのSmad2とP-Smad2量は, WTのものより有意に増加した。
3. TGの増殖能はWTのものより有意に低下し, 遊走能は低下する傾向であった。一方でアポトーシスした細胞数は有意に増加した。
4. TGのTGF- $\beta$  I型受容体を阻害すると, P-Smad2量は有意に低下した。

#### 【考察】

TGF- $\beta$ による細胞生物学的な作用は, 組織特異性があるとされ, 間葉系細胞に対しては細胞増殖を亢進する場合があるが, 上皮細胞に対しては多くの場合その細胞増殖を抑制することが知られている。増殖能に関しては, TG の P-Smad2 の産生増加が, p15, p21 遺伝子などの発現を誘導することで細胞周期の G1 期を停止させ細胞増殖を抑制した結果, 増殖細胞数が減少したことが考えられた。遊走能に関しては, TG の遊走面積が WT と比較して減少傾向にあったことから, Smad2 は歯肉上皮細胞においては細胞遊走を負に調節していることが示唆された。このことは, *K14-Smad2<sup>+</sup>*マウスの皮膚の創傷治癒遅延に遊走能の低下が関与することの報告 (Hosokawa *et al*, 2005) と一致していた。アポトーシスは, TG では WT と比較して増加していることが示され, 上述した増殖細胞数が低下する結果と合わせて考えると, 実際は増殖能の低下とアポトーシスの増加により増殖細胞数が低下した可能性が考えられた。また, Smad2 の活性化は, TGF- $\beta$  I 型受容体を介したリン酸化と, 他のシグナル伝達系による間接的なリン酸化の経路によって誘導されることが考えられるが, 受容体阻害実験結果から, Smad2 の活性化は TGF- $\beta$  I 型受容体を介する経路に依存していることが明らかとなった。このことは, TGF- $\beta$  の歯肉上皮に対する生物活性を受容体レベルおよび転写因子レベルで制御できる可能性を示唆する。

#### 【結論】

マウス口蓋歯肉上皮から分離・培養された歯肉上皮細胞において, Smad2 は TGF- $\beta$  I 型受容体を介して活性化され, 増殖および遊走を抑制し, アポトーシスを促進する。

## 論文審査結果の要旨

歯周炎によって破壊された歯周組織の再生を導こうとする場合、歯肉上皮の接合深部への増殖制御が必要である。すなわち、上皮細胞の増殖速度は間葉系細胞のものと比較して速いため、歯周外科による創傷治癒後の上皮の深部増殖を抑制することによって、間葉系細胞が再生するための時間的および空間的な場を提供することが必須と考えられている。

トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ : TGF- $\beta$ ) は、上皮細胞の増殖を強力に抑制する因子として知られている。TGF- $\beta$ は、細胞表面に存在するI型のセリン・スレオニンキナーゼ型受容体であるTGF- $\beta$ -I型受容体を介し、細胞内のシグナル伝達分子であるSmadを活性化してそのシグナルを伝達する。また、近年、TGF- $\beta$ -Smadシグナルは上皮の創傷治癒過程において重要な役割を果たすことが報告されている。

本研究では歯周組織においてSmad2の発現を制御することは歯肉上皮の深部増殖の抑制に繋がるとの仮説を立て、Smad2による歯肉上皮細胞の表現型の変化、およびそれを制御するメカニズムを解明することを目的とし、Smad2遺伝子を上皮特異的に過剰発現させたマウス口腔粘膜の上皮細胞における表現型およびSmad2のリン酸化のシグナル伝達経路を検討した。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

- 1) Smad2を過剰発現させた歯肉上皮細胞は、野生型のものと比較して、増殖能は低下し ( $p < 0.05$ )、遊走能は低下傾向であった。一方で、アポトーシス率は増加した ( $p < 0.01$ )。
- 2) Smad2のリン酸化は、TGF- $\beta$ -I型受容体を介するシグナル伝達経路に依存した。

以上のことから、Smad2はTGF- $\beta$ -I型受容体によって活性化され、歯肉上皮細胞の増殖および遊走を抑制することが明らかとなった。このことは、結果的に歯周組織においてTGF- $\beta$ の歯肉上皮に対する生物活性を受容体レベルおよび転写因子レベルで制御できる可能性を示唆している。こうした事実は、Smad2の発現を制御することが歯周組織再生療法の際に歯肉上皮の深部増殖の抑制に繋がることをも示唆する。

以上に基づき、本申請論文は博士(歯学)の学位論文として価値があるものと認めた。