

**研究者：高野 隼人**（所属：鶴見大学歯学部 小児歯科学講座）

## **研究題目：エナメル芽細胞のトランスポーター発現に対する TGF- $\beta$ の役割について**

### **目的：**

エナメル質形成過程において、エナメル芽細胞に局在するトランスポーターはミネラルイオンや重炭酸塩をエナメル質に排泄して結晶成長を持続させるための重要な役割を担っているが、その発現機構については不明である。一方、エナメル質中に存在するトランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- $\beta$ ）は、オートクリン機構によりエナメル質形成に関与すると考えられている（Kobayashi-Kinoshita S. et al., Sci Rep. 2016;6:33644.）。TGF- $\beta$ は哺乳類では TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 3 の3種類のアリソフォームを持つことが知られており、先行研究よりマウスエナメル上皮細胞（mHAT9d）にアリソフォーム3種を添加し培養すると、上皮間葉転換を誘導することが明らかとなっているが、TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 3 に比べ TGF- $\beta$ 2 の反応性が低いことも明らかとなっている（Miyakawa Y. et al., Arch Oral Biol. 2022;143:105540.）。この結果より、TGF- $\beta$ はアリソフォームの違いによりエナメル質形成においてエナメル芽細胞の上皮間葉転換だけでなく、エナメル質形成に伴うエナメル芽細胞の変化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

エナメル質のヒドロキシアパタイト（Ca<sub>10</sub>（PO<sub>4</sub>）<sub>6</sub>（OH）<sub>2</sub>）結晶形成時にはカルシウムイオン、リン酸イオン、ヒドロキシイオンを必要とし、それらの生成や輸送には各種酵素やトランスポーターが必要である。今回申請者は各種トランスポーターの発現に及ぼす TGF- $\beta$ アリソフォームの影響を調べることを目的とし、エナメル質形成に関わるトランスポーター及び酵素の遺伝子発現解析を行った。また、これら遺伝子発現に及ぼす TGF- $\beta$ アリソフォーム間での相違についても比較検討を行った。

### **対象および方法：**

マウスエナメル上皮細胞（mHAT9d）を6wellプレートに播種し、播種1日後に7種類の条件下に調整した培地にて10日間培養しRNA抽出後定量PCR（n=5）を行った。条件は以下の通りである。

細胞：マウスエナメル上皮細胞（mHAT9d）

培地：10%FBS含有DMEM/F-12培地

条件①：培地のみ（Control）

条件②：リコンビナント TGF- $\beta$ 1（1 ng/mL）を添加

条件③：リコンビナント TGF- $\beta$ 1（5 ng/mL）を添加

条件④：リコンビナント TGF- $\beta$ 2（1 ng/mL）を添加

条件⑤：リコンビナント TGF- $\beta$ 2（5 ng/mL）を添加

条件⑥：リコンビナント TGF- $\beta$ 3（1 ng/mL）を添加

条件⑦：リコンビナント TGF- $\beta$ 3（5 ng/mL）を添加

## 結果：

### 遺伝子発現量

Carbonic Anhydrase2 (Car2) は TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) 添加時において特異的に上昇した。Carbonic Anhydrase6 (Car6) は  $\beta$ 2 (1 ng/mL) 添加時を除き上昇していた (図 1)。Solute Carrier family 4 member 7 (Slc4a7) は TGF- $\beta$ 2 (1 ng/mL) 添加群を除き、すべての添加群で発現上昇が見られた (図 2)。Solute Carrier family 4 member 11 (Slc4a11) は概ね上昇していたが、 $\beta$ 1 (5 ng/mL) 及び  $\beta$ 3 (5 ng/mL) 添加群では減少していた (図 3)。Solute Carrier family 9 member 5 (Slc9a5) は全ての群で発現上昇していたが、 $\beta$ 2 (1 ng/mL) 添加群での変化は小さかった (図 4)。

以上の結果、同じトランスポーターグループ内でも Control と比較し、遺伝子発現量に変化がみられないもの、TGF- $\beta$ 2 (1 ng/mL) 添加群のみ変化しないもの、全ての添加群で顕著な変化がみられるものが存在していた。

なお、GAPDH で Ratio の補正を行った。また、7 群について Tukey 検定を行い、Control に対して  $p < 0.05$  (有意差あり) を線にて示した。

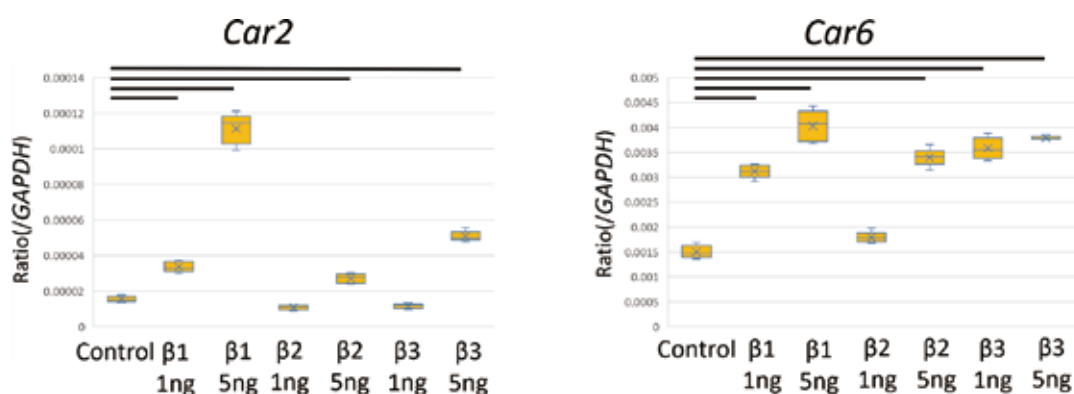


図 1 炭酸脱水酵素の発現量

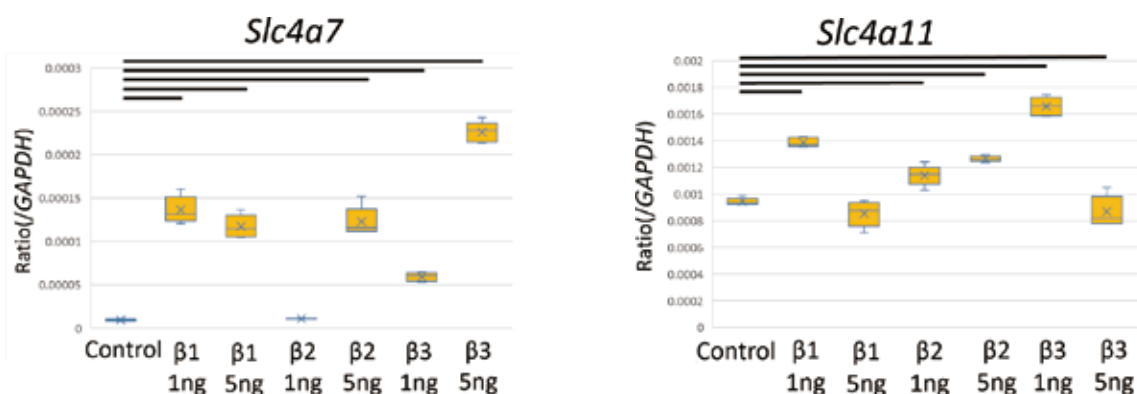


図 2 ナトリウム・重炭酸イオン共輸送体の発現量

図 3 ナトリウム・重炭酸イオン共輸送体様タンパクの発現量

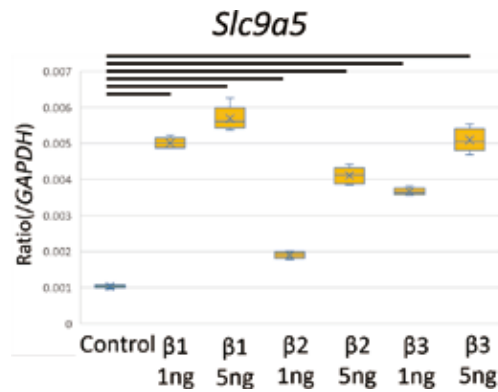


図4 交換輸送体の発現量

#### 考 察：

qPCRの結果から、TGF- $\beta$ はいくつかのトランスポーター及び関連酵素の遺伝子発現に影響を与え、エナメル質形成に伴うエナメル芽細胞とエナメル基質間のイオン輸送に関与していることが示唆された。また、TGF- $\beta$ アイソフォーム間で応答性の違いも明らかとなり、各種トランスポーターの遺伝子発現は複数の伝達経路で制御されている可能性が示された。

以上より、mHAT9d細胞の各種トランスポーター遺伝子発現にTGF- $\beta$ が関与していることが明らかとなった。

#### 成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・高野 隼人、山本 竜司、大熊 理紗子、唐木田 丈夫、宮川 友里、山越 康雄、朝田 芳信  
エナメル芽細胞のトランスポーター発現に対するTGF- $\beta$ の影響について  
第65回歯科基礎医学会学術大会にて発表を行った。