

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20476

研究課題名(和文) HIF-1 発現による口腔粘膜上皮細胞の低酸素応答解析と再生医療応用への基盤構築

研究課題名(英文) Investigation of hypoxic response on oral mucosa keratinocytes focusing on HIF1-alpha expression for use in regenerative medicine

研究代表者

加藤 寛子 (Kato, Hiroko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70749994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮細胞はlow calcium培地では低酸素培養群ではコントロールと比較して細胞増殖の亢進が認められたが、DMOG群並びにHIF-1 のRNA干渉下に低酸素に暴露した群では細胞増殖の亢進は認められなかった。HIF-1 発現レベルと未分化性維持の関係を解析したところ、Western blotで低酸素培養群、およびDMOG添加群で未分化マーカーである  $\alpha 6$  integrinの発現亢進が確認でき、RNA干渉により発現が低下したため、 $\alpha 6$  integrinはHIF-1 によって調節されていた。したがって、HIF-1 が口腔粘膜上皮細胞の未分化性の維持に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral mucosa keratinocytes cultured in hypoxia showed higher proliferation than control, whereas cells treated with DMOG or HIF-1 siRNA in hypoxic culture showed no difference in low calcium medium. Then we analyzed the relationship between HIF-1 expression level and maintenance of undifferentiation state observing the undifferentiation marker;  $\alpha 6$  integrin by western blot. Cells cultured in hypoxia or treated with DMOG showed higher expression of  $\alpha 6$  integrin than control, however, cells treated with HIF-1 siRNA in hypoxic culture showed about the same level with control. Therefore, it is indicated that HIF-1 expression might regulate the maintenance of undifferentiated state of oral mucosa keratinocytes.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：口腔粘膜 上皮細胞 再生医療 低酸素 HIF-1

## 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜上皮細胞は口腔内粘膜欠損部の再建のみならず、臨床的に角膜再生や食道粘膜再建にもすでに応用され、我が国の再生医学を牽引する数少ない有望な細胞ソースである。培養細胞中にある再生能の高い未分化な“幹細胞集団”の存在が再生医療のカギであるが、幹細胞集団は通常の大気圧酸素濃度培養では分化してしまい、いずれ枯渇する。従って、移植用に用いる培養口腔粘膜上皮の質の担保には、幹細胞がもつ特徴である未分化性の維持が欠かせない。しかし、ヒトの口腔粘膜上皮幹細胞の微小環境に関する知見はなく、幹細胞維持に有効な培養環境の検討がなされていない。

本邦では本学医歯学総合病院等で自家培養口腔粘膜を現在まで100例以上の患者に臨床応用し、良好な治癒経過を得ている(Izumi et al., *Int J Oral Surg.* 2003, 寺師ら、頭頸部癌, 2006)。これは移植された培養口腔粘膜が分泌する成長因子による創傷治癒促進効果によるものであり、組織学的に《有棘細胞層》で産生されることが報告されている(Nakanishi et al., *Int J Oral Surg.* 2007)。ところが、現実的に複数の培養口腔粘膜を作成した場合、作成される上皮の厚さは一定せず、上皮が極端に薄い場合がある。これは《有棘細胞層》が絶対的に少なく、細胞が増殖能を失い急速に分化したことに起因している。しかし、上皮が薄い培養口腔粘膜を移植前に発見する方法はまだ見つかっていないため、培養期間中の確実な“有棘層”細胞の増加がカギである。そのメカニズムの解明と実践は、喫緊の課題でありこれを解決することは培養口腔粘膜の機能向上、さらには口腔粘膜の再生医療の発展につながる。

多くの正常組織の幹細胞が存在する微小環境(ニッチ)が低酸素状態であることが報告されており、低酸素応答の主要な役割を担う転写因子である低酸素誘導性因子 1

(HIF-1)が発現し、安定状態であることが、幹細胞微小環境を維持する機能を発揮している(Mohyeldin et al., *Stem Cell Rev.* 2010)。また、低酸素濃度により幹細胞ニッチ環境を *in vitro* で再現させると、ES細胞、間葉系、神経幹細胞では自己複製能が亢進し、iPS細胞では再プログラミング効率が向上するといった報告もあり、低酸素環境は幹細胞を用いた再生医療の領域での有用性が認識されてきている(Hawkins et al., *Regen Med.* 2013)。

そこで口腔粘膜上皮細胞のHIF-1発現で調節される細胞増殖、分化やエネルギー代謝、血管新生などの細胞反応は、培養口腔粘膜上皮の質の向上に有効利用できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本申請では、(1)口腔粘膜上皮細胞の低酸素応答がHIF-1を介した反応かを確認し、次に(2)口腔粘膜上皮細胞のHIF-1発現誘導レベルと未分化性維持の相互関係を分析することを目的として研究をすすめる。

## 3. 研究の方法

実験に用いる細胞は、本学医歯学総合病院口腔外科外来で、本研究の実施協力の依頼に対して同意を得た患者から小手術時に得られた正常口腔粘膜組織片を使用した。口腔粘膜の採取にあたっては、本学の倫理委員会の承認を得ている(25-R2-04-08)。本学医歯学総合病院の培養口腔粘膜臨床応用プロトコールと同一の培養法を用いて、口腔粘膜上皮細胞を酵素処理により単離し、フィーダー細胞、ウシ下垂体抽出物、ウシ血清を含まない培地、試薬を用いる。増殖培地(Epilife 0.06mMカルシウム添加: low calcium)と分化培地(Epilife 1.2mMカルシウム添加: high calcium)で培養したヒト口腔粘膜初代培養細胞の2~5継代目を用いた。

(1) 薬理的に発現させた HIF-1 発現と低酸素下での発現の比較解析

(a) HIF-1 活性化剤の使用濃度の検討

HIF-1 活性化剤の第 1 選択としては Dimethylloxaloylglycine (DMOG) を培地に添加し、明らかな細胞死がおこらない濃度を決定する。また、その濃度以下で HIF-1 の発現レベルを 2%酸素培養群と比較する。その濃度で 7 日間培養後に継代可能であることも確認する。

(b) HIF-1 の RNA 干渉を施した細胞の HIF-1 発現を確認するため、20%酸素濃度培養細胞と低酸素培養細胞で RNA 干渉を行った細胞に対し、HIF-1 の Western blot で発現レベルを確認した。

(2)(1)で決定した DMOG 濃度と低酸素培養群における細胞未分化性との関連の解析

培養 3 日目の細胞増殖と未分化マーカーとして用いられ、接着因子の一つである 6 integrin の発現を Western blot により検討した。

#### 4. 研究成果

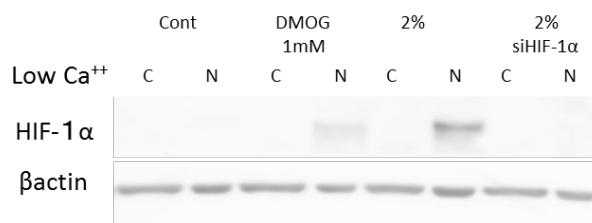
(1) (a) DMOG の濃度検討として、10mM, 1mM を比較したところ、10mM では細胞死がおこったため、1mM を用いることとした。

(b) DMOG 又は 2%の酸素濃度に 3 日間暴露した群、HIF-1 の RNA 干渉下に 2%の酸素濃度に 3 日間暴露した群、コントロールとして通常酸素濃度で培養したサンプルから NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents を用い、細胞質(Cytoplasma:C)と核(Nuclea:N)を分離してタンパク質を溶解させ Western blot を行った。HIF-1 とローディングコントロールの actin の結果を示す (図 1)。増殖培地である low calcium 培地ではコントロールで HIF-1 の発現はみられず、DMOG1mM 添加群並びに 2%酸素群では核(N)での発現がみられた。2%酸素群で

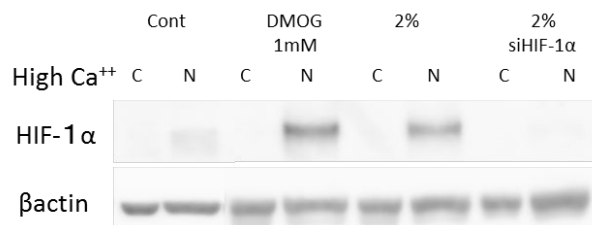
HIF-1 の RNA 干渉を行った群では発現が認められなかった(図 1(a))。分化培地である high calcium 培地ではコントロールでわずかに核に HIF-1 の発現が認められた。また、low calcium 培地と同様に DMOG1mM 添加群並びに 2%酸素群では核での発現がみられ、2%酸素群で HIF-1 の RNA 干渉を行った群では発現が認められなかった(図 1(b))。コントロールサンプルと negative control siRNA を暴露したサンプルは同様の結果を示した (data not shown)。

図 1

(a)



(b)

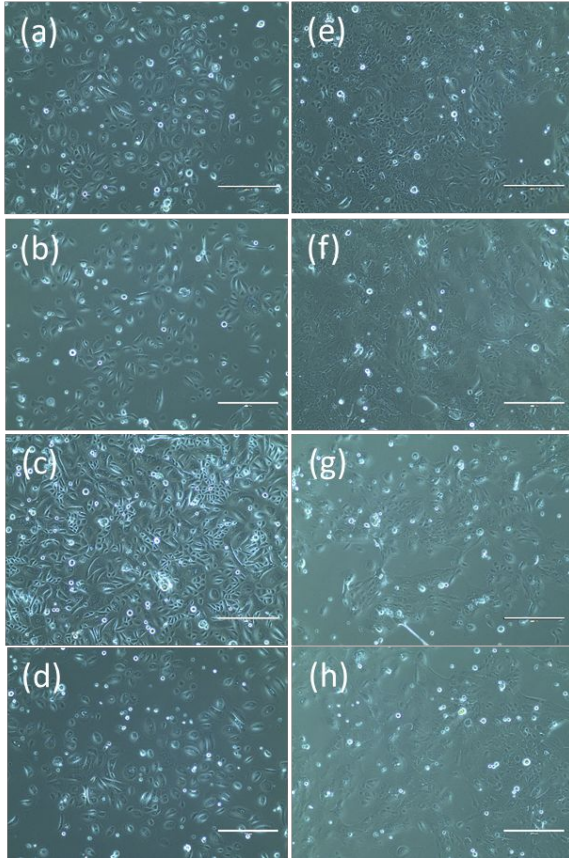


(2) 図 2 に培養 3 日目の細胞写真を示す。

(a)-(d) low calcium、(e)-(h) high calcium、(a)(e) コントロール、(b)(f) 1mM DMOG、(c)(g) 2%酸素、(d)(h) 2%酸素 siHIF-1。スケールバー 400 μm。

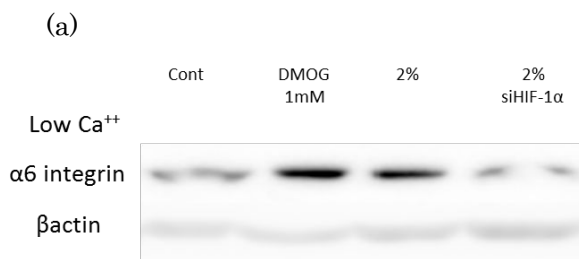
low calcium 培地では 2%酸素群ではコントロールと比較して細胞増殖の亢進が認められたが、DMOG 群並びに HIF-1 の RNA 干渉下に 2%の酸素濃度に暴露した群では細胞増殖の亢進は認められなかった(図 2(a)-(d))。high calcium 培地ではどの群においても細胞増殖に著しい変化は認められなかった(図 2(e)-(h))。

図 2

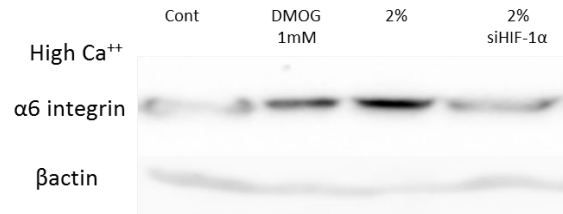


Whole cell lysate を用いて Western blot を行った。α6 integrin とローディングコントロールの actin の結果を示す (図 3)。low calcium 培地、high calcium 培地ともにコントロールでの α6 integrin の発現と比較し、DMOG1mM 添加群並びに 2%酸素群では発現が亢進し、2%酸素群で HIF-1 の RNA 干渉した群ではコントロールと同程度の発現を示した。(図 3(a)(b))

図 3



(b)



これらの結果から、DMOG を用いて HIF-1 を薬理的に活性化させることで、細胞の増殖には変化が見られなかったが、未分化性を維持させる可能性が示唆された。

### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3 件)

Kato H, Sugimoto M, Hara Y, Saito N, Shiomi A, Izumi K: Metabolomic profile of human oral keratinocytes under hypoxic culture condition. Tissue Niches & Resident Stem Cells in Adult Epithelia, Gordon Research Conference, Hong Kong (China), 2016. 8. 7-12, Program Book: 10, 2016.

Kato H, Sugimoto M, Hara Y, Saito N, Shiomi A, Izumi K: Metabolomic Profile of Human Oral Keratinocytes Under Hypoxic Culture Condition. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Lombok (Indonesia), 2016. 1. 10, Abstracts and program book, p 65.

加藤 寛子, 泉 健次, 原 夕子, 塩見 晶, 上野山 敦士, 前田 健康, 低酸素環境が培養ヒト正常口腔粘膜上皮細胞に及ぼす影響, 日本組織培養学会 第 88 回大会, 広仁会館, (広島県, 広島市), 2015 年 5 月 26 日, 組織培養研究 34(1): 34, 2015 .

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

加藤 寛子 ( Kato, Hiroko )

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70749994