

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06964

研究課題名(和文) 歯根膜の低酸素応答におけるPLAP-1が及ぼす影響

研究課題名(英文) The role of PLAP-1 in hypoxic responses of periodontal ligament

研究代表者

山本 智美 (Yamamoto, Satomi)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70779107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、低酸素応答が各種疾患の病態形成に果たす役割が着目されており、歯周組織における同応答の役割も明らかになりつつある。本研究課題では、歯根膜に高発現する細胞外気質タンパクPLAP-1が、低酸素環境下で低酸素誘導因子HIF-1誘導性に発現が上昇する一方で、炎症性サイトカイン存在下では発現が抑制されることが明らかとなった。また歯根膜細胞のPLAP-1は歯根膜の低酸素応答を制御している可能性が示唆された。この結果は、歯周組織の恒常性維持におけるPLAP-1の新たな機能を見出したものといえる。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic responses have been demonstrated to play important roles in disease progression. The role of hypoxic responses in periodontal tissue is becoming clearer recently. In this study, we revealed that PLAP-1 which is highly expressed extracellular matrix protein in periodontal ligament can be upregulated by HIF-1 in hypoxia. On the other hand, PLAP-1 expression can be suppressed by inflammatory cytokines. Furthermore, hypoxia-induced PLAP-1 might regulate the hypoxic response in periodontal ligament cells. These results gave us a new insight about the role of PLAP-1 in periodontal tissue homeostasis.

研究分野：歯周病学

キーワード：PLAP-1 低酸素 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯を歯槽窩に保持し、軟組織の性質を維持しながら咬合力や矯正力といったメカニカルストレスを緩衝するという役割を担い、歯周組織の恒常性維持にとって重要な役割を担う。また、歯根膜は、歯槽骨とセメント質の二つの硬組織の間に介在する血流の豊富な軟組織であることから、メカニカルストレスがかかった際や炎症が惹起された際には、酸素供給の低下あるいは酸素需要の亢進により、容易に低酸素状態に陥ることが推察される。

低酸素状態に陥った組織では低酸素誘導因子 HIF (Hypoxia Inducible Factor) の働きが中心となって低酸素応答が生じる。低酸素応答は、血管新生の亢進、細胞遊走能の亢進、細胞死の誘導等を介して生体の防御機能の一つとして働く一方で、その応答が過剰である、あるいは長期化する場合には各種疾患の病態形成にも関与することになる。生体内では組織ごとに生理的な局所酸素濃度が異なる。また、HIF は酸素濃度依存的な制御を受け一方で、サイトカインや細胞外基質タンパクといった酸素濃度以外の因子による発現制御も受ける。つまり HIF を介した組織局所の低酸素応答は、その組織特異的に、かつ状況に応じた緻密な制御を受けているものと推察される。そのため、組織に特徴的あるいは疾患特異的な低酸素応答の解析は、疾患の病態に関する理解を深めるうえで必須であると考えられる。

これまでに歯周炎患者の歯周組織では、健康な歯周組織に比べ歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞における HIF の発現が上昇すること(文献①)や、培養歯根膜細胞を用いた解析から、低酸素環境が炎症性サイトカインの産生を亢進させること(文献②)に加えて、近年 HIF を介して産生された VEGF が血管新生を促進するだけでなく、骨芽細胞に作用し、RANKL/OPG 比を上昇させることで破骨細胞形成を促進させること(文献③)が明らかとなっている。このような HIF に関する知見は、同分子が歯周病病態形成に積極的に関与していることを示唆していると考えられる。

これまでに研究代表者が行った予備実験の結果から、低酸素にて培養した歯根膜細胞において、PLAP-1 (Periodontal ligament Associated Protein-1) の発現が上昇することが明らかとなっていた。PLAP-1 は当研究室にてヒト歯根膜 cDNA ライブラリーより同定された細胞外基質タンパクの一つであり、同分子が BMP-2 (文献④)、FGF-2 (文献⑤) といったサイトカインと結合し、歯根膜の細胞機能を制御することに加えて、TLR2 および TLR4 を介して抗炎症的に働くこと(文献⑥)が明らかにされていた。しかしながら、PLAP-1 の歯根膜での低酸素応答における役割については、これまでに全く報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、歯根膜における低酸素応答と歯根膜特異的分子である PLAP-1 に着目し、低酸素下での PLAP-1 の発現上昇の分子機序、PLAP-1 が歯根膜細胞の低酸素応答に果たす役割、並びに、同役割の *in vivo* での検証を目的に研究を実施した。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

ヒト歯根膜細胞は Lonza 社より入手したものを継代培養し、実験に供した。低酸素下での培養は、酸素濃度を調整することができる O₂-CO₂ インキュベータを用いて行った。PHD 阻害薬 deferoxamine (DFO) および HIF-1 alpha 阻害薬 chetomin は Sigma-Aldrich 社より購入し、リコンビナント IL-1 beta、TNF-alpha は R&D 社より購入したものを実験に供した。

2) Western blotting 法による解析

培養細胞を PBS にて 2 回洗浄した後にプロテアーゼインヒビターカクテル錠、10 mM フッ化ナトリウム、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、10 mM beta-グリセロリン酸を加えた RIPA Lysis Buffer を加え、4°C で 20 分間処理した後回収し、さらに遠心 (12000 rpm、4°C、20 分) 後に、上清を回収した。核タンパク質は Nuclear extract kit (ACTIVE MOTIF、Carlsbad) を用いて精製した。いずれのサンプルも、Bradford 法にてタンパク量を算出した後、濃度を同値に調整した。その後、2-ME による還元下にて SDS-PAGE にて電気泳動を行い、PVDF トランスファーメンブレンに転写後、5% スキムミルク含有バッファーにてブロッキングを行った。そして各分子に対する特異抗体および HRP 標識二次抗体を順次反応後、ECL を用いて発光シグナルを検出した。

3) siRNA の導入

抗生剤を除いた培養培地に negative control siRNA あるいは PLAP-1 siRNA を Lipofectamine 2000 存在下にて reverse transfection 法にて導入した。

4) Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

培養細胞から核酸抽出試薬 RNA-Bee™ (TEL) を用いて抽出し、精製した全 RNA を鋳型として、Random Hexamer Primer、M-MLV を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。遺伝子発現解析は、得られた cDNA を鋳型として、各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー、Fast SYBR® Green PCR Master Mix を用いて、Step One Plus Real-time PCR System にて解析した。なお、各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子の一つである *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)* 内在性コントロール遺伝子として同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

5) マウス矯正モデルの作製

C57BL/6 の上顎第一臼歯と第二臼歯の歯間部に厚み0.54mm のOリングエラスティックモジュールを挿入し、歯牙にメカニカルストレスを加えた。過剰麻酔により屠殺後、上顎骨を採取した。

6) 絹糸結紮歯周病モデルの作製

C57BL/6 の上顎第二臼歯に5-0 絹糸 を結紮し、7 日後に過剰麻酔により屠殺後、上顎骨を採取した。

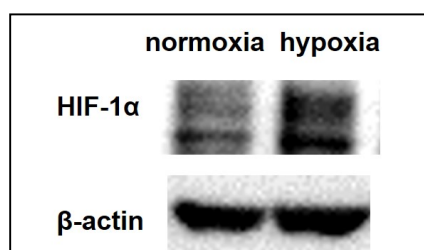
7) 免疫染色法

採取した上顎骨を 4%PFA にて固定後、EDTA を用いて脱灰し、OCT コンパウンドに包埋後、凍結薄切切片を作製した。3%BSA 含有 PBS にてブロッキング後、抗 HIF-1 alpha 抗体を反応させ、検出した。

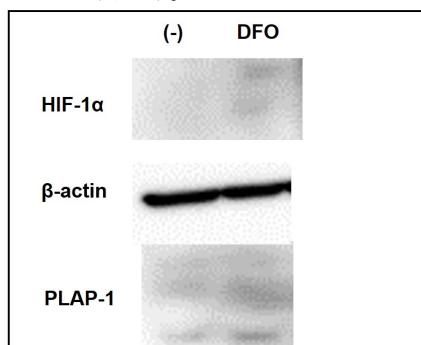
4. 研究成果

1) 低酸素下での PLAP-1 の発現に関する解析

HPDL を 1%酸素濃度下で培養した際の HIF-1alpha の発現をウェスタンブロッティング法にて解析した結果、通常酸素濃度下にて培養したもの 비해、HIF-1 の発現上昇が確認された (下図)。



そこで、低酸素下での PLAP-1 の発現上昇が HIF-1 alpha 誘導性であるか否かを検討するために、まず HPDL を DFO 存在下にて培養し PLAP-1 の発現を RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法にて解析した。その結果、通常酸素濃度で DFO 存在下にて培養することにより HPDL に HIF-1 alpha の集積が確認されるとともに、PLAP-1 遺伝子の有意な発現上昇と培養上清中の PLAP-1 発現の亢進が認められた (下図)。



次に、HPDL を 1%酸素濃度下にて培養した際に chetomin を添加し、PLAP-1 の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、chetomin の添

加は低酸素誘導性の PLAP-1 の発現を遺伝子レベル、タンパクレベルで抑制することが明らかとなった。

2) PLAP-1 発現抑制 HPDL の作製と機能解析

低酸素により誘導される PLAP-1 が歯根膜細胞の低酸素応答にどのような影響を及ぼすのかを検討するために、ヒト歯根膜細胞に siRNA を導入することにより PLAP-1 抑制歯根膜細胞を作製した。同細胞の低酸素応答性を検討するために siRNA control を導入した細胞とともに、5%酸素濃度下で培養し、HIF-1 alpha 制御遺伝子である vegf の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。その結果、PLAP-1 抑制歯根膜細胞では vegf の発現が低下する傾向を示した。

3) マウス歯牙矯正モデルにおける HIF-1 alpha の発現解析

マウス臼歯間に矯正用エラスティックゴムを挿入し、矯正力をかけることで歯根膜を低酸素状態にしたマウスの顎骨を採取し、作製した切片を用いて歯根膜組織における HIF-1 alpha の発現を免疫組織学的に解析した。その結果、圧迫側の歯根膜に HIF-1 alpha の発現亢進が認められた。

Ueda ら (文献⑦) はマウス歯牙矯正モデルの圧迫側歯根膜での asporin/PLAP-1 の発現亢進を報告していることから、歯根膜における HIF-1 誘導性の PLAP-1 発現上昇が示唆される。

4) 歯周病モデルマウスの歯根膜における PLAP-1 の発現解析

一般に、炎症性疾患の病巣局所では、末梢血流の循環障害および炎症細胞浸潤による酸素消費の増加により低酸素環境が誘導されると考えられている。そこで、低酸素状態で発現が亢進する PLAP-1 の歯周病局所における発現変化についてマウス歯周病モデルを用いて検討した。すなわち、C57BL/6 の上顎第二臼歯に 5-0 絹糸 を結紮し、7 日後の骨吸収を microCT にて確認後、凍結切片を作製した。同切片よりレーザーマイクロダイセクションにて歯根膜組織のみを採取し IL-6 および PLAP-1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて検討した。microCT 解析の結果、コントロールとして採取した非結紮側に比べ、絹糸結紮側では顕著な歯槽骨吸収が認められた。さらに、歯根膜組織において IL-6 遺伝子の発現が上昇する一方で、PLAP-1 遺伝子の発現は有意に減少することが明らかになった。

5) 炎症性サイトカインが PLAP-1 の発現に及ぼす影響に関する解析

4) で得られた結果を in vitro にて検証するためにヒト歯根膜細胞を IL-1beta あるいは TNF-alpha 存在下で培養し、炎症性サイトカインが PLAP-1 遺伝子の発現に及ぼす影響

について検討を加えた。その結果、両サイトカイン存在下で培養したヒト歯根膜細胞における PLAP-1 遺伝子発現は有意に抑制されていることが明らかとなった。

1)～5)の結果から、ヒト歯根膜細胞の PLAP-1 発現は低酸素環境下で HIF-1 alpha 誘導性に発現が亢進し、歯根膜細胞の低酸素応答に関与していることが明らかとなった。一方で、PLAP-1 の発現は炎症反応によって抑制されることが明らかとなった。

<引用文献>

- ① Ng KT et al., J Periodontol, 2011
- ② Motohira H et al. J Periodontol, 2007
- ③Huang H et al., Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2016
- ④ Kajikawa T et al. J Dent Res, 2014
- ⑤ Awata T et al. J Dent Res, 2015
- ⑥ Yamaba S et al. J Dent Res, 2015
- ⑦ Ueda M et al., Arch Oral Biol, 2016

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 2 件)

- ①Asae Hirai, Masahide Takedachi, Chiaki Morimoto, Satomi Yamamoto, Keigo Sawada, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama, Shinya Murakami; Suppressed expression of PLAP-1 in murine periodontitis, 12th Asian Pacific Society of Periodontology, Seoul, 2017
- ②平井麻絵、竹立匡秀、森本千晶、山本智美、岩山智明、沢田啓吾、村上伸也; 絹糸結紮マウス歯周病モデルにおける歯根膜組織の遺伝子発現の解析、第 60 回春季日本歯周病学会、福岡、2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 智美 (YAMAMOTO, Satomi)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 70779107