

令和元年5月28日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19758

研究課題名(和文)低酸素応答遺伝子を介した代謝リプログラミングによる口蓋癒痕形成抑制への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to control the palatal scar formation and to analyze the regulatory mechanism of metabolic reprogramming via hypoxia inducible genes

研究代表者

井澤 俊 (IZAWA, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：30380017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口蓋粘膜創傷治癒過程においてHIF-1 シグナル伝達経路の機能を明らかにするために、HIF-1 ヘテロノックアウトマウスを用いて検討した。HIF-1 ヘテロノックアウトマウスでは対照群と比較して、創傷治癒が有意に遅延しており、さらにマクロファージ浸潤の減少が認められたことから、マクロファージに対するCCケモカインであるMCP-1、MIP-1 の発現を検討したところ、HIF-1 ヘテロノックアウトマウスの創傷治癒組織においてMCP-1、MIP-1 の発現低下が認められた。今後、M1/M2マクロファージの分布状態に関するさらなる解析が必要となり、現在さらに詳細な解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇口蓋裂患者における裂隙閉鎖術後の癒痕組織はその強い癒痕鉤縮により、上顎裂成長や上顎歯列弓狭窄をもたらし、患者は重篤な不正咬合を呈する。また矯正歯科治療施術後も歯の後戻りの原因となり、歯列・咬合の安定を非常に困難にさせることが知られている。本研究成果は、癒痕組織形成の抑制・減少を可能にすることで先に述べた現象を最小限に抑えることを意味し、矯正歯科臨床に大きな飛躍をもたらすことになると思われる。

研究成果の概要(英文)：The blood flow in the wound scar region is known to be decreased compared to the surrounding area of the wound closure. Wound healing is a well-orchestrated complex process leading to the repair of injured tissues. It is suggested that HIF-1 signaling is involved in wound healing by regulating inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , MIP-1, and MCP-1. Here, we investigated the role of HIF-1 signaling on M1/M2-like macrophage expression of heterozygous HIF-1-deficient (HIF-1<sup>HET</sup>) mice palatal wound healing. Histological examination showed that palatal wound closure in HIF-1<sup>HET</sup> mice was delayed by the decreased infiltration of M1/M2 macrophage markers in parallel with the diminished production of Col1a1, MCP-1, MIP-1 compared with WT mice. These results suggest that HIF-1 signaling may play an important role in the regulation of palatal wound healing and HIF-1 deficiency aggravate the infiltration of M1/M2 macrophage.

研究分野：口腔科学

キーワード：低酸素応答遺伝子 口蓋癒痕 創傷治癒 代謝リプログラミング 歯学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂患者における裂隙閉鎖術後の癒痕組織はその強い癒痕鉤縮により、上顎骨劣成長や上顎歯列弓狭窄をもたらし、その結果患者は重篤な不正咬合を呈する。また矯正歯科治療施術後も歯の後戻りの原因となり、歯列・咬合の安定を非常に困難にさせることが知られている。また、これまでに当教室ではレーザー・ドップラー式血流画像化装置を用いて口唇裂患者の口唇形成術後の上唇表層部の血流分布の測定を試みた結果、多くの症例において癒痕付近に限局した明らかな低血流領域を認めた。そこで、低酸素ストレスに対する細胞の適応応答の中心的な役割を果たす転写因子である低酸素応答遺伝子 hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) を分子標的として口蓋粘膜の創傷治癒における癒痕組織への影響を検討する。

### 2. 研究の目的

本研究では、低酸素応答遺伝子である HIF-1 $\alpha$  に着目し、口蓋粘膜の創傷治癒における癒痕形成のメカニズムのさらなる解明と、その機能阻害を遺伝子レベルとタンパクレベルで図り、その臨床的效果を判定する。本研究計画では、HIF-1 $\alpha$  を分子標的とした発現制御方法として HIF-1 $\alpha$  の発現を制御する分子である PHD の阻害薬 dimethylxaloylglycine (DMOG) や遺伝子改変マウスを用いる。また、創傷治癒過程で低酸素環境に集積するマクロファージは、炎症型の M1 型と、炎症性に働き創傷治癒や血管新生に傾く M2 型に分かれることが知られていることから口蓋粘膜における HIF-1 $\alpha$  を介したマクロファージ極性についても解析することを目的とした。本研究は口腔内の癒痕形成と癒痕に起因する矯正歯科治療上の問題点を一度に解決する方法としての可能性が高く、さらには核酸創薬等の医学分野への波及効果も期待できるものと思われる。

### 3. 研究の方法

- (1) 実験動物：野生型マウスを対照群 (n=35) とし、HIF-1 $\alpha$  ヘテロノックアウト (HKO) マウスを実験群 (n=35) とした。マウスは 12 時間明暗サイクルの下、放射線滅菌飼料、滅菌水を常時与え、specific pathogen-free (SPF) にて飼育し、実験に用いた。なお、本研究は徳島大学における遺伝子組み換え実験および実験動物に関する各委員会の承認を得て行われた (承認番号 12131)。
- (2) 口蓋粘膜における創傷・標本作製方法および創傷閉鎖の評価：マウス口蓋粘膜の創傷治癒・癒痕形成の動物モデルについては当教室においてすでに確立されており、8 週齢の HIF-1 $\alpha$  HKO マウスと野生型マウスを試料として用い、ソムノペンチルにて麻酔後、尖刀メスを用いて、上顎第一臼歯から第三臼歯までの口蓋粘膜正中部に幅 1.0 mm、長さ 3.0 mm の間隔で切開し、ピンセットにて正中口蓋部粘膜を剥離して骨面を露出させた。創傷作製 4, 5, 6, 7 日後の上顎骨を摘出し、組織学的観察のために厚さ 4  $\mu$ m の前頭断切片を作製した。作製した上顎骨の前頭断組織切片に HE 染色を施し、光学顕微鏡 (KEYENCE Biorevo BZ9000) にて創部の形態組織学的観察を行った。口蓋粘膜創傷治癒の評価部位については上顎左右第二臼歯を通る前頭断連続切片の中から、第二臼歯の形態から近遠的に中央部を使用する切片として選択した。
- (3) RNA の抽出、逆転写およびリアルタイム RT-PCR 法：RNA 抽出 kit を用いて添付プロトコールに従って全 RNA を抽出した。得られた cDNA のうち 2  $\mu$ l を鋳型とし、各遺伝子の特異的プライマーからなる反応液を調節し、PCR 反応を行った。各遺伝子の mRNA 量は comparative cycle threshold 法 (CT 法) により、内在性コントロールである GAPDH 遺伝子の mRNA 量に対する比で評価した。
- (4) ウエスタンブロット法：口蓋創傷部組織を lysis buffer で溶解した後、タンパク質定量を行い、電気泳動、PVDF 膜への転写後、ブロッキング、各種一次抗体を用い 4  $^{\circ}$ C で一晩反応させた。さらに二次抗体を室温で 1 時間反応させ、化学発色法にてバンドの検出を行った。
- (5) 統計学的解析：創傷閉鎖率、およびリアルタイム RT-PCR 法における結果は平均  $\pm$  標準偏差で表し、Student's *t*-test を用いて統計学的処理を施し、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 口蓋粘膜における創傷閉鎖

低酸素応答遺伝子 HIF-1 $\alpha$  が口蓋粘膜創傷治癒に及ぼす影響を確認するために、DMOG を腹腔内に投与し、その創傷閉鎖について比較検討した。まず、DMOG を投与し、48 時間後に上顎第一大臼歯から第三臼歯までの創部周囲の口蓋粘膜部を剥離した。創傷治癒 5 日後における創傷閉鎖はコントロールと比較して、DMOG 投与群では明らかに促進していた。以上のことより HIF-1 $\alpha$  安定化のための DMOG 投与によって創傷閉鎖が促進されることが明らかとなった。

#### (2) 口蓋粘膜創傷治癒における創傷閉鎖およびケモカインの発現

口蓋粘膜創傷治癒における HIF-1 $\alpha$  の役割についてより詳細に検討するために、HIF-1 $\alpha$  HKO マウスの口蓋粘膜創傷閉鎖について野生型マウスを対照群として比較検討した。創傷治癒 5 日後での再上皮化および結合組織の修復は、野生型マウスと比較して HIF-1 $\alpha$  HKO マウスでは 23.4% で、野生型マウスの 62.5% と比較して有意に遅延していた ( $p < 0.05$ )。

MCP-1、MIP-1 $\alpha$  は単球やマクロファージに特異性の高い走化性を示す CC ケモカインであり、MCP-1 は単球、線維芽細胞、血管内皮細胞、上皮細胞などから産生され、MIP-1 $\alpha$  は単球、マクロファージ、線維芽細胞などから産生されることが知られている。そこで口蓋粘膜創傷付与 5 日後に、創部周囲の組織を採取しリアルタイム RT-PCR 法にて HIF-1 $\alpha$  HKO マウスの口蓋粘膜における MCP-1、MIP-1 $\alpha$  の産生が抑制されることが明らかとなった。

(3) 口蓋粘膜創傷部におけるマクロファージの分布状態

口蓋粘膜創傷治癒の進展に応じた口蓋組織中のマクロファージの数や分布状態 (M1/M2 マクロファージ)、サイトカイン産生量 (TNF- $\alpha$ ) を検討した。そこで口蓋粘膜創傷付与 5 日後に、創部周囲の組織を採取し、リアルタイム RT-PCR 法にて HIF-1 $\alpha$  HKO マウスの口蓋粘膜における TNF- $\alpha$ 、iNOS mRNA 発現量を解析したところ、コントロールと比較して TNF- $\alpha$ 、iNOS の発現量は有意に低下していた。また免疫組織化学染色、ウエスタンブロットによる解析においても iNOS の発現量の低下がみられた。以上のことより、口蓋粘膜創傷部における HIF-1 $\alpha$  遺伝子発現抑制により、TNF- $\alpha$ 、iNOS の産生が抑制されることが明らかとなった。さらに低酸素応答遺伝子 HIF-1 $\alpha$  が口蓋粘膜創傷部におけるマクロファージの分布状態やプロファイルに与える影響を検討するために、蛍光組織免疫染色による各種特異抗体を用いた 2 重染色解析を行ったところ、HIF-1 $\alpha$  HKO マウスの口蓋粘膜における F4/80 陽性かつ iNOS 陽性細胞数、F4/80 陽性かつ Arginase-1 陽性細胞数はコントロールと比較して有意に低下していた。これらの結果から、口蓋粘膜創傷部における M1/M2 マクロファージの分布状態に関するさらなる解析が必要となると考える。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Hutami IR, Tanaka E, Izawa T\*. Crosstalk between Fas and S1P<sub>1</sub> signaling via NF- $\kappa$ B in osteoclasts controls bone destruction in the TMJ due to rheumatoid arthritis. *Japanese Dental Science Review*. 査読有 , 55(1), 12-19, 2019. doi:10.1016/j.jdsr.2018.09.004.
2. Izawa T\*, Hutami IR, Tanaka E. Potential role of rebamipide in osteoclast differentiation and mandibular condylar cartilage homeostasis. *Current Rheumatology Reviews*. 査読有 , 14(1), 62-69, 2018. doi:10.2174/1573397113666171017113441
3. Hutami IR, Izawa T\*, Mino-Oka A, Shinohara T, Mori H, Iwasa A, Tanaka E. Fas/S1P<sub>1</sub> crosstalk via NF- $\kappa$ B activation in osteoclasts controls subchondral bone remodeling in murine TMJ arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 査読有 , 490: 1274-1281, 2017 doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.006
4. Izawa T\*, Arakaki R, Ishimaru N. Role of Fas and RANKL signaling in peripheral immune tolerance. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. 査読有 , 8(4), 512, 2017. doi:10.4172/2155-9899.1000512
5. Izawa T\*, Hutami IR, Mori H, Tanaka E. Role of Smad3 and S1P signaling in mandibular condylar cartilage homeostasis. *Journal of Bone Research*. 査読有 , 5(2), 178, 2017. doi:10.4172/2576-3881.1000114
6. Izawa T\*, Arakaki R, Ishimaru N. Crosstalk between cytokine RANKL and AhR signaling in osteoclasts controls bone homeostasis. *Journal of Cytokine Biology*. 査読有 , 2(2), 114, 2017. doi:10.4172/2576-3881.1000114

[学会発表](計 15 件)

1. Izawa T . S1P<sub>1</sub>/Fas signal crosstalk via NF- $\kappa$ B activation in osteoclasts controls subchondral bone remodeling in murine arthritis . 日本免疫学会, 福岡 , 2018 年 12 月 .
2. Izawa T . Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice . 日本分子生物学会, 横浜 , 2018 年 11 月 .
3. Khurel-Ochir T, Izawa T, Mori H, Iwasa A, Hutami IR, Tanaka E. The role of p21 on the development of TMJ-OA. 6<sup>th</sup> Meeting of Mongolian Association of Orthodontists, Ulaanbaatar, Mongolia, September 2018.

4. Hutami IR, Tanaka E, Izawa T. Fas/S1P<sub>1</sub> crosstalk via NF-κB activation in osteoclasts controls subchondral bone remodeling in murine TMJ arthritis. American Society for Bone and Mineral Research 2018 Annual Meeting, Montreal, Canada, September 2018.
5. 井澤 俊 . AhR は RANK/c-Fos シグナル伝達経路を介して破骨細胞の分化を制御する . 歯科基礎医学会, 福岡 , 2018 年 9 月 .
6. 井澤 俊 , 田中栄二 . 樹状細胞による Fas 非依存的 T 細胞のアポトーシスが MRL/lpr マウスにおける自己免疫性関節炎を制御する . 日本骨代謝学会, 長崎 , 2018 年 7 月 .
7. Hutami IR, Mori H, Khurel-Ochir T, Mino-Oka A, Iwasa A, Tanaka E, Izawa T. HIF-1α regulates the palatal wound healing through M1/M2 macrophage reprogramming. 96<sup>th</sup> General Session & exhibition of the IADR, London, UK, July 2018.
8. 井澤 俊 , 田中栄二 . AhR は RANK/c-Fos シグナル伝達経路を介して破骨細胞の分化を制御する . 日本骨免疫学会, 沖縄 , 2018 年 6 月 .
9. Hutami IR, 井澤 俊 , 森 浩喜 , 岡 彰子 , Khurel-Ochir T, 岩浅亮彦 , 田中栄二 . 低酸素応答遺伝子 HIF-1α は M1/M2 マクロファージのリプログラミングを介して口蓋創傷治癒を制御する . 日本口蓋裂学会, 大阪 , 2018 年 5 月 .
10. Izawa T, Arakaki R, Tanaka E, Ishimaru N. Signal crosstalk between cytokine RANKL and AhR signaling in osteoclasts controls bone homeostasis. IMMUNOLOGY 2018, Annual Meeting of the American Association of Immunologists, Austin, USA, May 2018.
11. Izawa T, Arakaki R, Tanaka E, Ishimaru N . Crosstalk between cytokine RANKL and AhR signaling in osteoclasts controls bone homeostasis . 日本免疫学会, 仙台 , 2017 年 12 月 .
12. Izawa T, Arakaki R, Tanaka E, Ishimaru N . The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis . 日本分子生物学会, 神戸 , 2017 年 12 月 .
13. Hutami IR, Izawa T, Iwasa A, Mino A, Khurel-Ochir T, Mori H, Tanaka E. Role of hypoxia inducible factor-1 α in the palatal wound healing. 日本矯正歯科学会, 札幌 , 2017 年 10 月 .
14. Izawa T, Tanaka E, Ishimaru N. The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis. ASBMR 2017 annual meeting, Denver, USA, September 2017.
15. 井澤 俊 , 田中栄二 , 石丸直澄 . 核内受容体 AhR は RANK/c-Fos シグナル伝達経路を介して破骨細胞の分化を制御する . 日本骨代謝学会, 福岡 , 2017 年 7 月 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年 :  
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中 栄二  
ローマ字氏名：(TANAKA, Eiji)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：40273693

研究分担者氏名：泰江 章博  
ローマ字氏名：(YASUE, Akihiro)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：病院  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：80380046

研究分担者氏名：岩浅 亮彦  
ローマ字氏名：(IWASA, Akihiko)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：90746025

研究分担者氏名：森 浩喜  
ローマ字氏名：(MORI, Hiroki)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：病院  
職名：医員  
研究者番号（8桁）：90779985

### (2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。