

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17065

研究課題名(和文) 歯周組織の慢性炎症における低酸素誘導性コラーゲンの役割

研究課題名(英文) Role of hypoxia-induced collagen in chronic periodontal inflammation

研究代表者

森本 千晶 (Morimoto, Chiaki)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70806801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年、細胞外基質産生に重要な役割を担うことが注目されている低酸素誘導因子(HIF)が、歯周組織におけるコラーゲンの合成と成熟に与える影響を解析した。その結果、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)、ヒト歯根膜細胞(HPDL)において、HIF-1 $\alpha$ の活性化がプロコラーゲン合成水酸化酵素(P4HA1、PLOD2)の産生を誘導し、P4HA1はコラーゲンの産生を、PLOD2はコラーゲン線維の架橋構造の形成を各々亢進させることが明らかとなった。これらの結果から、歯周組織における低酸素環境の誘導は、HIFを介してコラーゲンの量と質の両方を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織における低酸素下でのコラーゲン産生亢進の分子機序については、これまでに全く報告がなかった。そこで本研究では、HIFに着目し、HGF、HPDLを用いて低酸素下でのコラーゲン産生亢進の分子機序について解析を行った。本研究にて明らかとなったHIF-1 $\alpha$ 依存性P4HA1、PLOD2の産生亢進は、内因性の組織修復に重要な役割を担っていると考えられ、両分子の発現低下や機能不全が歯周病の重症化へ関与していると考えている。今後、両分子の歯周病病態形成過程における役割がin vivoにて明らかになれば、歯周組織における組織修復能を診査する新たな診断方法の確立につながるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the effect of hypoxia-inducible factor (HIF), which has recently attracted attention as playing an important role in extracellular matrix production, on collagen synthesis and maturation in periodontal tissues. As a result, I revealed that activation of HIF-1 $\alpha$  resulted in increased expression of collagen prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I (P4HA1) and procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (PLOD2) in human gingival fibroblasts (HGF) and human periodontal ligament cells (HPDL). In HGF and HPDL cultured in hypoxic condition, increased expression of P4HA1, PLOD2 stimulated collagen production and cross-linking of collagen fiber, respectively.

There results suggested that when local oxygen concentration decreased in periodontal tissue, quantity and quality of collagen could be regulated by HIF.

研究分野：保存治療系歯学関連

キーワード：低酸素 細胞外基質 歯周病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌バイオフィーム(デンタルプラーク)が原因となって発症し、歯周組織における炎症反応の遷延化により同組織が破壊される疾患である。病変局所では、細胞外基質(ECM)が過剰産生され、肉芽組織が形成される。組織破壊の原因である炎症性サイトカインはECM中に取り込まれ、長期間停滞することで同部の炎症を遷延化することが明らかとなっている。一方、局所酸素濃度は解剖学的構造や生理学的機能の違いにより、器官や組織ごとに適切に調節されており、各組織の恒常性維持と密接に関与している。しかしながら、創傷治癒過程、メカニカルストレスがかかった際、炎症などの生体反応時、あるいは虚血性疾患や腫瘍、線維症等の病態においては、各組織における局所の酸素濃度が定常状態と比較し低下するために低酸素状態が誘導される。低酸素状態に陥った組織ではHIFの働きが中心となって低酸素応答を生じる。近年、低酸素応答の一つとしてECMの産生制御が、生理学的、ときには病態生理学的に重要な役割を果たすことが報告されている。

申請者が行った予備実験の結果から、低酸素環境にて培養したHGF、HPDLにおいて、コラーゲンの産生が亢進することを明らかとした。一方で興味深いことに低酸素環境はコラーゲン遺伝子の発現に顕著な影響を与えなかった。この結果は、両細胞において低酸素環境が転写後のコラーゲン合成過程の一部を活性化することにより、コラーゲン産生を亢進させていることを示唆している。しかしながら、低酸素環境における培養で、コラーゲンが産生亢進する分子機序については十分な情報がなく、また、低酸素誘導性コラーゲンが歯周組織に与える影響については、これまでに全く報告がない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、低酸素誘導性に産生亢進するコラーゲンの分子機序を解明し、それが歯周組織に与える影響について解析することで、歯周組織の恒常性維持の一端を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 低酸素下でのHGF、HPDLにおけるコラーゲン発現上昇の分子機序に関する解析

HGF、HPDLにおいて低酸素下の培養でコラーゲン遺伝子の発現に影響を与えることなく、タンパクレベルでの発現が誘導されるという分子機序について、転写後修飾に着目し、*in vitro*にて解析した。すなわち、酸素分圧の調節が可能であるO<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>インキュベータを用いて、HGF、HPDLを予備実験にて低酸素応答性が認められた1%の酸素濃度下にて培養した。さらにコラーゲンの合成過程の一つである水酸化について着目し、その際に必須のプロコラーゲン合成水酸化酵素(P4HA1、P4HA2、P4HA3、PLOD1、PLOD2、PLOD3)の発現について検討した。

低酸素下にて発現が上昇した水酸化酵素のsiRNAをReverse transfection法によりHGFに導入し、低酸素下で培養した際の、コラーゲンの発現について解析した。なお、コラーゲン産生の解析方法として、以下の方法を用いた。

①Western blot法による解析: 培養上清に含まれるI型プロコラーゲン発現を、抗I型コラーゲン抗体を用いて検討する。

②ELISA法による解析: 培養上清に含まれるI型コラーゲン産生の指標となるI型プロコラーゲンC末端プロペプチド(PIP)の濃度を定量的に解析する。

③免疫蛍光細胞染色法による解析: 細胞周囲におけるI型コラーゲンの発現を、抗I型コラーゲン抗体を用い、共焦点顕微鏡にて観察する。

### (2) マウス歯牙結紮歯周病モデルを用いた歯周組織の低酸素部位の特定に関する解析

マウス歯牙結紮歯周病モデルをC57BL/6マウスに施し、*in vivo*にて歯周病の病態形成における低酸素部位の特定を行った。すなわち、60mg/kgのpimonidazoleを腹腔内投与し、1時間後に顎骨採取し、組織切片を作製した。その後、抗pimonidazole抗体を用いた免疫学的手法により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 低酸素下でのコラーゲン産生に関する解析

まずHGFにおいて、P4HA1、P4HA2、P4HA3、PLOD1、PLOD2、PLOD3が低酸素によって影響を受けるか否かについて検討した。すなわち、HGFを低酸素下で12時間培養し、上記水酸化酵素の遺伝子発現についてリアルタイムPCR法にて検討した。その結果、低酸素での培養によりP4HA1、P4HA2、PLOD2の遺伝子発現が有意に上昇することが明らかとなった(図1)。

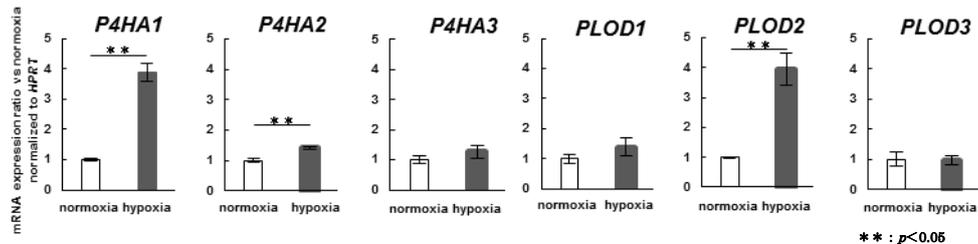


図 1. HGF における低酸素下での HIF-1alpha 依存性プロコラーゲン合成水酸化酵素の遺伝子発現

次に HIF-1alpha が、低酸素下での培養にて著明な上昇した P4HA1、PLOD2 の発現に及ぼす影響に関して検討するために、HIF-1 のコアクチベータである p300/CBP と競合的に作用することで、HIF-1 の転写活性を抑制する chetomin を用いた HIF-1 抑制実験を行った。すなわち、HGF、HPDL を 300 nM の chetomin 存在あるいは非存在下で培養し、低酸素によって誘導される P4HA1、PLOD2 の発現に及ぼす影響について検討した。その結果、HGF、HPDL の両細胞において、低酸素下での培養によって、HIF-1alpha 依存性に水酸化酵素 P4HA1、PLOD2 の発現が遺伝子レベル (図 2)、タンパクレベル (図 3) においても亢進することが明らかとなった。

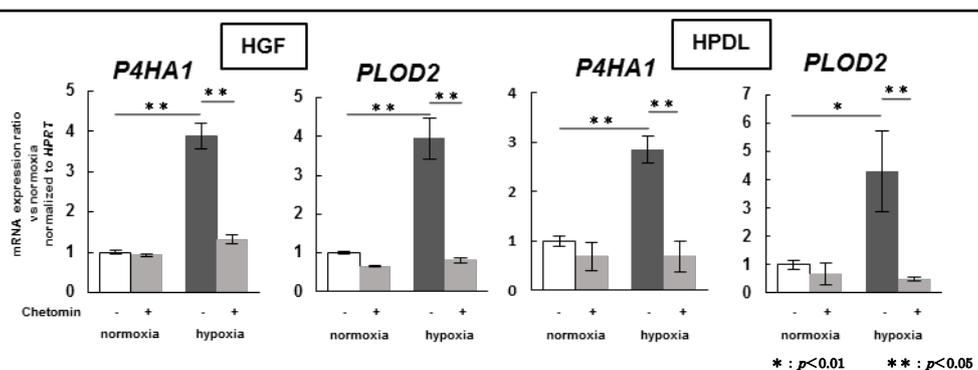


図 2. HIF-1alpha を介した低酸素誘導性水酸化酵素の遺伝子発現

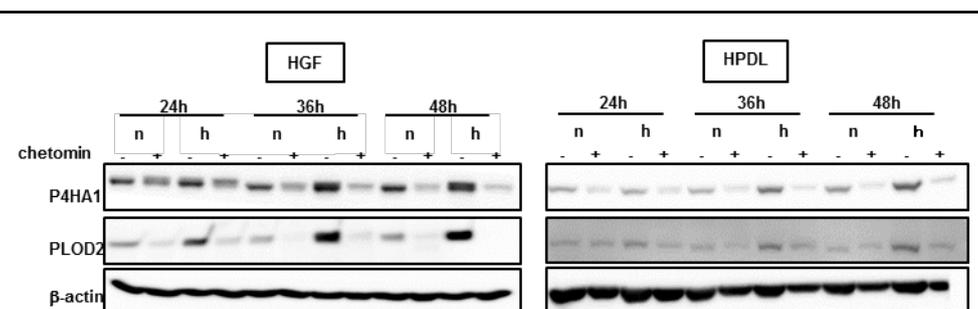
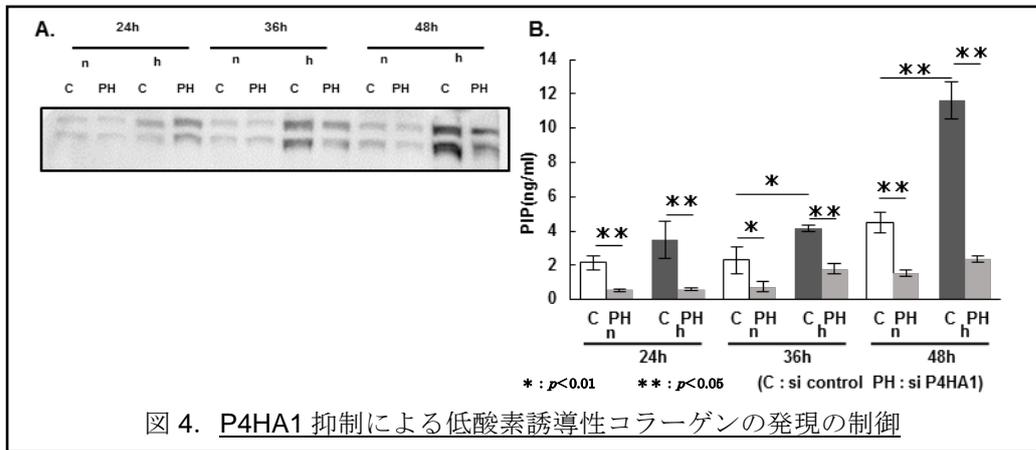
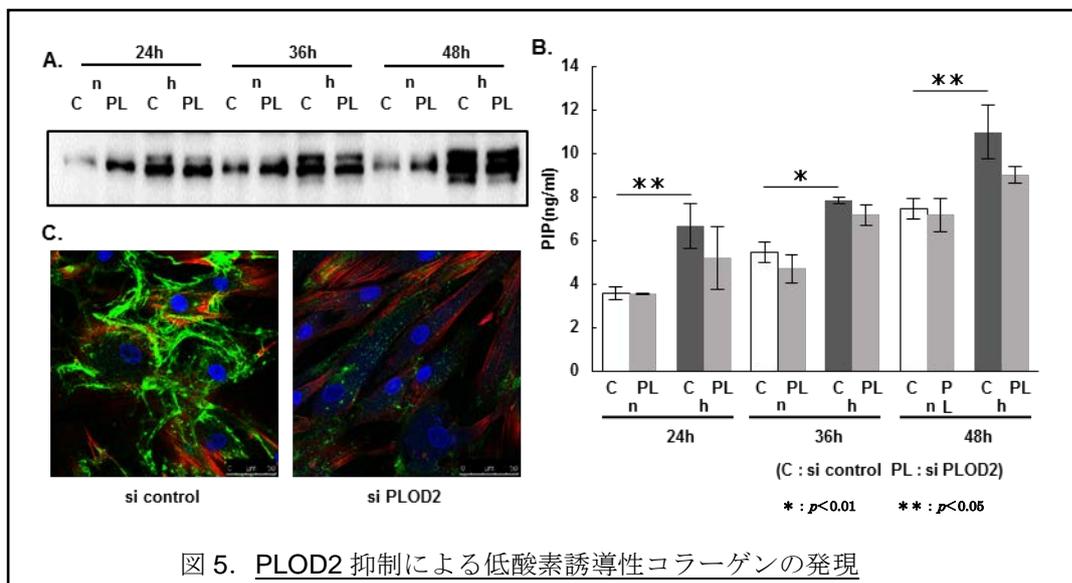


図 3. HIF-1alpha を介した低酸素誘導性水酸化酵素の発現

そこで、P4HA1 が低酸素誘導性のコラーゲン産生亢進に及ぼす影響について検討するために、P4HA1 の発現を抑制した HGF を用いて機能解析した。si P4HA1 (siRNA 導入により P4HA1 発現を抑制した HGF) および si control (negative control siRNA を導入した HGF) の両細胞を低酸素環境下で 24 時間、36 時間、48 時間培養し、コラーゲン産生について検討した。Western blot 法の結果より、培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現は P4HA1 抑制により si control と比較し減少した (図 4A)。また ELISA 法の結果より、培養上清中の PIP の発現も P4HA1 抑制により si control と比較し有意に減少した (図 4B)。以上の結果より、低酸素誘導性コラーゲン産生の亢進は P4HA1 の産生亢進に起因することが示唆された。



次に PLOD2 が低酸素誘導性のコラーゲン産生亢進に及ぼす影響について検討するために、PLOD2 を抑制した HGF を用いて機能解析した。si PLOD2 (siRNA 導入により PLOD2 発現を抑制した HGF) および si control (negative control siRNA を導入した HGF) の両細胞を低酸素環境下で 24 時間、36 時間、48 時間培養し、コラーゲン産生について検討した。Western blot 法の結果より、培養上清中のコラーゲンの発現は PLOD2 抑制により si control と比較し変化を認めなかった (図 5A)。また ELISA 法の結果より、培養上清中の PIP の発現も PLOD2 抑制により si control と比較し著明な変化を認めなかった (図 5B)。次に si PLOD2 および si control の両細胞を低酸素環境下で 48 時間培養し、細胞周囲におけるコラーゲンの発現について免疫蛍光細胞染色法にて検討した。その結果、低酸素では PLOD2 を抑制すると低酸素によって誘導された細胞周囲におけるコラーゲンの発現は減少した (図 5C)。以上の結果より、低酸素環境では PLOD2 の産生亢進により培養上清中のコラーゲン産生に明らかな変化を与えることなく細胞周囲におけるコラーゲンの発現が増加していることが明らかとなった。



(2) マウス歯牙結紮歯周病モデルを用いた歯周組織の低酸素部位の特定に関する解析  
 まず歯周病の病態形成における低酸素状態の有無について検討した。上顎の左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮すると、結紮 7 日後には根尖に及ぶ歯槽骨吸収を伴う歯周炎が惹起された (図 6A)。また、組織学的解析から絹糸結紮により第二後臼歯周囲の歯肉上皮が失われ潰瘍状態になることがわかった (図 6B)。

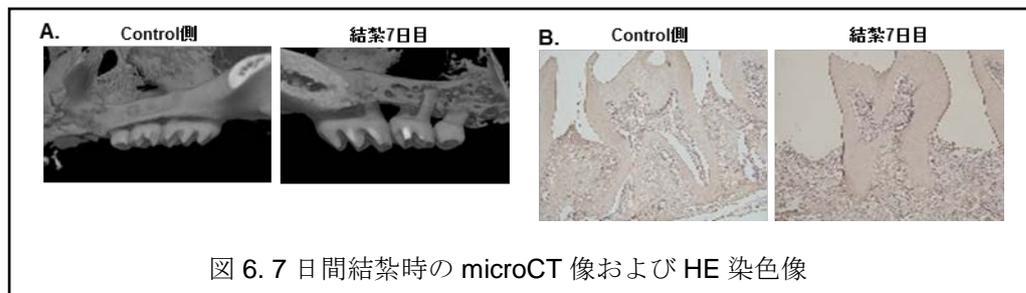


図 6. 7 日間結紮時の microCT 像および HE 染色像

次にこのマウスモデルに、低酸素状態にある細胞に集積することが知られている試薬 Pimonidazole を投与し、同試薬の歯周組織における発現を免疫組織学的に解析した。その結果、コントロール側と比較し、結紮 7 日後の歯根膜中心に pimonidazole が強く染色された (図 7)。しかしながら、詳細な低酸素部位の同定には至らなかったため、今後、さらに手法等を見直すとともに、上記水酸化酵素のノックアウトマウス等を用いた解析により、今回得られた成果を *in vivo* で検証する必要があると考えられる。

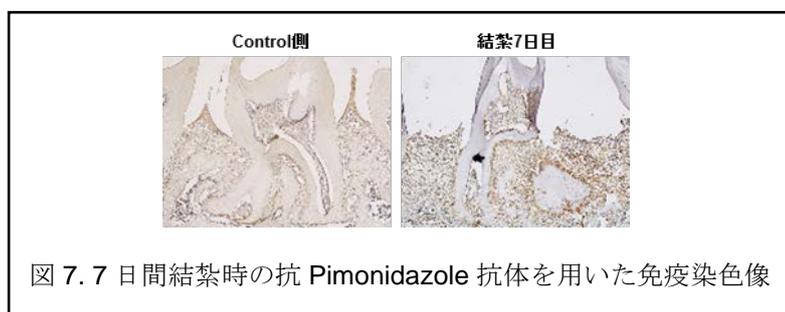


図 7. 7 日間結紮時の抗 Pimonidazole 抗体を用いた免疫染色像

本研究にて明らかとなった P4HA1、PLOD2 の発現亢進による低酸素誘導性のコラーゲンの量と質の制御は内在性の組織修復機構に寄与するのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平井 麻絵、竹立 匡秀、下村 純平、森本 千晶、山本 智美、岩山 智明、沢田 啓吾、山田 聡、村上 伸也
2. 発表標題 炎症歯根膜におけるPLAP-1の発現
3. 学会等名 第62回 春季日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Chiaki Morimoto, Satomi Yamamoto, Asae Hirai, Junpei Shimomura, Yuki Narukawa, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Clinical Evaluation of Periodontal Tissue Regeneration by ADMPC Transplantation
3. 学会等名 2018 IADR GENERAL SESSION (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asae Hirai, Masahide Takedachi, Junpei Shimomura, Keigo Sawada, Satomi Yamamoto, Chiaki Morimoto, Tomoaki Iwayama, Satoru Yamada, Shinya Murakami
2. 発表標題 Suppressed expression of PLAP-1 in inflamed periodontal ligament
3. 学会等名 2018 IADR GENERAL SESSION (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Morimoto, Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Satomi Yamamoto, Asae Hirai, Junpei Shimomura, Yuki Narukawa, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Therapeutic efficacy of autologous ADMPC transplantation for periodontal tissue regeneration
3. 学会等名 第66回JADR総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----