

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18506

研究課題名(和文) HIF-1誘導性コラーゲンが歯周病の病態形成に与える影響

研究課題名(英文) Effects of HIF-1-induced collagen on the pathogenesis of periodontal disease

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病原因子・修飾因子が歯肉線維芽細胞(HGF)の低酸素誘導因子(HIF)誘導性コラーゲン産生に及ぼす影響について検討する一方でHIF誘導性コラーゲン制御がHGFの炎症反応に及ぼす影響について検討した。その結果、HGFをIL-1刺激することによりHIF誘導性に上昇するプロコラーゲン合成水酸化酵素(P4HA1、PLOD2)の遺伝子発現が亢進することに加え、P4HA1発現抑制HGFでは、IL-1誘導性IL-6およびIL-8の発現が有意に上昇することが明らかとなった。このことから、歯周組織において低酸素誘導性P4HA1が炎症反応を制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織において過度な低酸素応答の結果生じるコラーゲンのP4HA1およびPLOD2による組織の構造変化は、組織破壊の原因である炎症性サイトカインの細胞外基質内への取り込みを増強させ、炎症を遷延化し、炎症性肉芽組織の形成を促進させる一因となるのではないかと考えられる。そこで、歯周病に対する罹患リスクや治療に対する反応性を診断するマーカーとして、P4HA1、PLOD2は有効ではないか、また、これら水酸化酵素の発現量を調整することで細胞外基質の構造の制御ができれば、これまで例のない低酸素誘導性コラーゲンの制御に基づく治療法もしくは予防法の確立が可能になるのではないかと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of periodontal pathogenic factors on hypoxia-inducible factor (HIF)-induced collagen production and the effects of HIF-induced collagen on the inflammatory responses of human gingival fibroblasts (HGF). As a result, I revealed that the hypoxia stimulated-gene expressions of Procollagen-prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I (P4HA1) and procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (PLOD2) were significantly increased in HGF in the presence of recombinant IL-1. In addition, IL-1-induced IL-6 and IL-8 was significantly increased in P4HA1-suppressed HGF. These results suggested that hypoxia-induced P4HA1 may control the inflammatory response in the periodontal tissue.

研究分野：保存治療系歯学関連

キーワード：歯周病 HIF-1 コラーゲン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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低酸素状態が誘導される。生体は、この低酸素状態に対し、低酸素誘導因子 HIF (Hypoxia Inducible Factor) の働きを中心に酸素消費量の制限、血管新生、細胞外基質産生の制御等の低酸素応答を生じる。申請者は、歯周組織の恒常性維持において低酸素応答が果たす役割に着目し検討を重ねてきた。これまでに、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) を用いた解析から、歯周組織を構成する最も主要な細胞外基質であるコラーゲンの重合過程とその架橋形成反応が HIF による低酸素応答によって制御されていることを見出した (若手研究: 課題番号 18K17065、代表森本)。すなわち、HGF および HPDL を低酸素下で培養することにより、コラーゲンの重合過程で重要な役割を担う水酸化酵素である P4HA1 の発現が HIF 依存性に亢進するとともに、架橋構造の形成に必須の水酸化酵素である PLOD2 の発現も同様に上昇し、これら水酸化酵素の発現上昇を介してコラーゲン合成が促進されていることが明らかとなった。このことは歯周組織における器質性変化と同組織の機械的強度が HIF によって制御されていることを示唆している。

一方で、歯周組織における低酸素応答としてのコラーゲンの量と質の制御は、歯周治療に対する反応性や病因論に関連する可能性があると考えられるが、その情報を積極的に活用した歯周組織の診断法や治療法は存在しない。

そこで、歯周病に対する罹患リスクや治療に対する反応性を診断するマーカーとして、P4HA1、PLOD2 は有効ではないか、また、これら水酸化酵素の発現量を調整することで細胞外基質の構造の制御ができれば、これまで例のない低酸素誘導性コラーゲンの制御に基づく治療法もしくは予防法の確立が可能になるのではないかと期待される。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、HIF 誘導性のコラーゲン産生制御が歯周病の進行・修飾過程に如何なる役割を果たすのかについて解析し、新規診断法や治療法の開発 基盤となる基礎的情報を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯周病原因子・修飾因子が HIF 誘導性コラーゲン産生に及ぼす影響に関する解析

HGF において①炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  (0.01 ng/ml)、②タバコ由来物質である nicotine (25  $\mu$ M)、③歯肉増殖原因薬剤の 1 つである nifedipine (100 ng/ml) が HIF 誘導性コラーゲン産生に及ぼす影響について解析を行った。すなわち、①から③の存在、非存在下にて、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 を 1%の酸素濃度条件下にて培養し、P4HA1、PLOD2 発現について real-time PCR 法にて検討した。

#### (2) HIF 誘導性 P4HA1、PLOD2 が HGF の炎症反応に及ぼす影響の解析

まず P4HA1 あるいは PLOD2 を強発現させた HGF を、レンチウイルス用いて導入し、作製した。作製した各細胞を 20%酸素濃度下にて培養した際に、(1) の結果より P4HA1、PLOD2 の発現を有意に上昇させた IL-1 $\beta$  (0.01 ng/ml) で刺激し、炎症メディエーターである IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析し、タンパク発現を ELISA 法にて定量的に解析した。次に、P4HA1 あるいは PLOD2 の発現を抑制した HGF を 20%あるいは 1%酸素濃度下にて培養した際、各細胞を IL-1 $\beta$ にて刺激し、IL-6 および IL-8 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて、タンパク発現を ELISA 法にて定量的に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 歯周病原因子・修飾因子が HIF 誘導性コラーゲン産生に及ぼす影響に関する解析

HGF において、①IL-1 $\beta$  (0.01 ng/ml)、②nicotine(25  $\mu$ M)、③nifedipine(100 ng/ml)が HIF 誘導性コラーゲン産生に及ぼす影響について解析を行った。すなわち、HGF を①から③の存在、非存在下にて、1%の酸素濃度条件下で 12 時間培養し、P4HA1、PLOD2 の遺伝子発現について real-time PCR 法にて検討した。その結果、HGF において、IL-1 $\beta$ 存在下で P4HA1 および PLOD2 の遺伝子発現が有意に上昇し、さらに IL-1 $\beta$ は、低酸素の培養により誘導された同遺伝子発現を有意に上昇させること明らかとなった (図 1)。

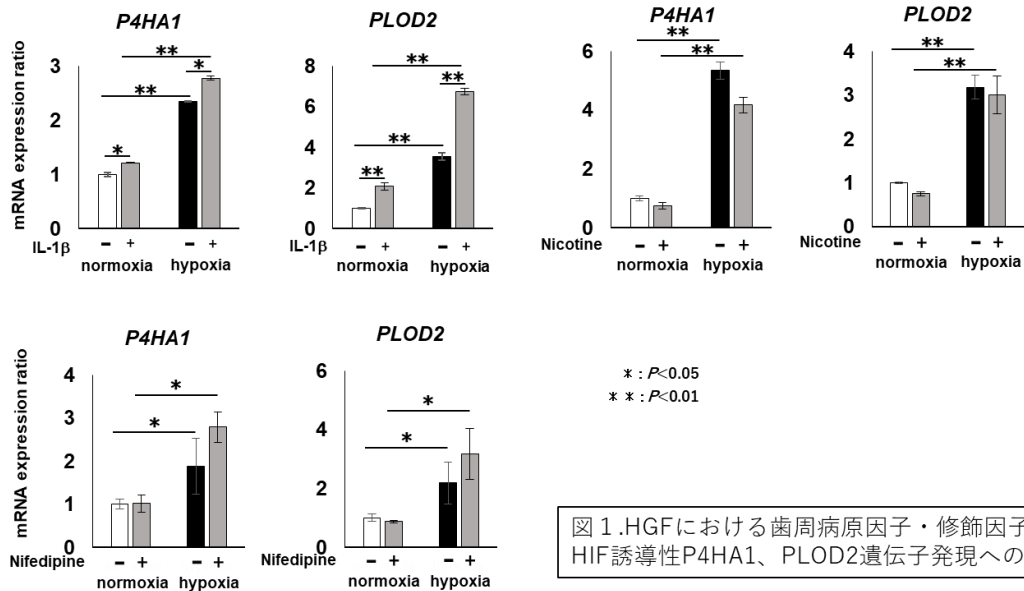


図1.HGFにおける歯周病原因子・修飾因子によるHIF誘導性P4HA1、PLOD2遺伝子発現への影響

(2) HIF 誘導性 P4HA1、PLOD2 が HGF および HPDL の炎症反応に及ぼす影響の解析

P4HA1 あるいは PLOD2 を強発現させた HGF をレンチウイルスにて導入し、作製した。作製した各細胞を 20%酸素濃度下にて培養した際に、(1) の結果より P4HA1、PLOD2 の発現上昇をさせた IL-1β (0.01 ng/ml) で刺激し、IL-6 および IL-8 の発現について、遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析し、タンパク発現を ELISA 法にて定量的に解析した。その結果、HGF において、P4HA1 の過剰発現は IL-6 の発現に著明な影響は与えず、IL-8 の遺伝子発現を有意に上昇させることが明らかとなった。また、PLOD2 の過剰発現は IL-6、IL-8 の遺伝子発現に著明な影響は与えなかった (図 2a、b)。

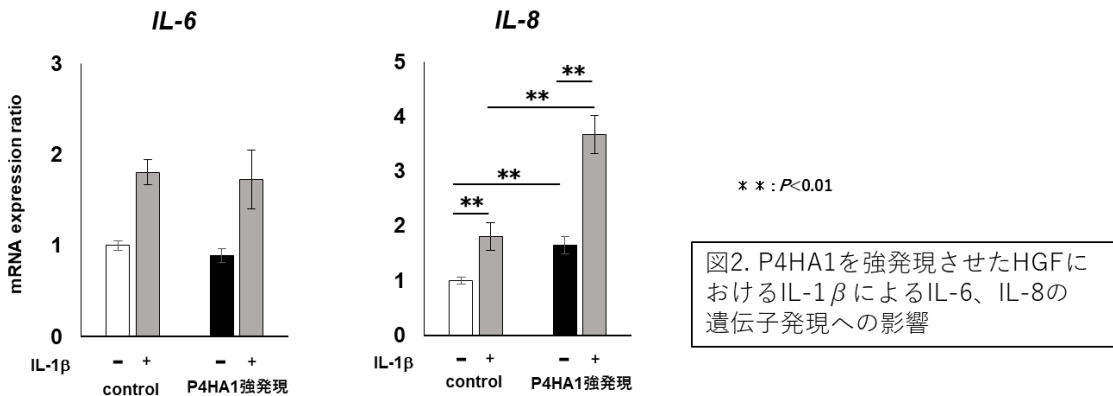


図2. P4HA1を強発現させたHGFにおけるIL-1βによるIL-6、IL-8の遺伝子発現への影響

さらに、P4HA1 あるいは PLOD2 の発現を抑制した HGF (既に作製済み) を 20%あるいは 1%酸素濃度下にて培養した際、IL-1β (0.01 ng/ml) にて刺激し、IL-6 および IL-8 の発現について遺伝子発現を real-time PCR 法にて、タンパク発現を ELISA 法にて解析した。その結果、P4HA1 を抑制すると IL-6、IL-8 とともに遺伝子発現およびタンパク発現も、有意に上昇した (図 3a、b)。

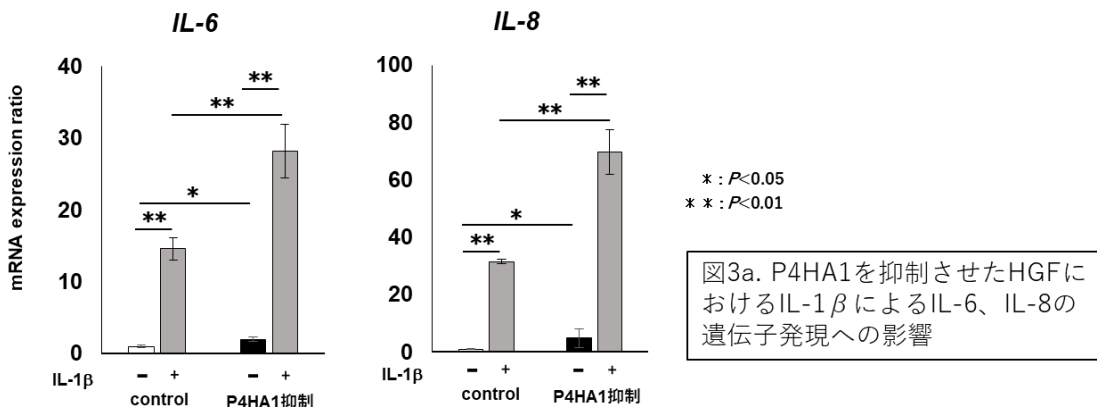
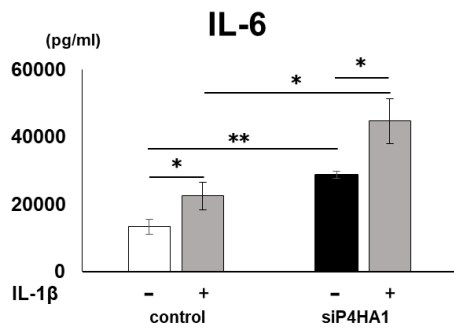


図3a. P4HA1を抑制させたHGFにおけるIL-1βによるIL-6、IL-8の遺伝子発現への影響



\* :  $P < 0.05$   
 \* \* :  $P < 0.01$

図3b. P4HA1を抑制させたHGFにおけるIL-1 $\beta$ によるIL-6のタンパク発現への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morimoto Chiaki, Takedachi Masahide, Kawasaki Kohsuke, Shimomura Junpei, Murata Mari, Hirai Asae, Kawakami Kazuma, Sawada Keigo, Iwayama Tomoaki, Murakami Shinya	4. 巻 92
2. 論文標題 Hypoxia stimulates collagen hydroxylation in gingival fibroblasts and periodontal ligament cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1635 ~ 1645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.20-0670	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takedachi Masahide, Yamamoto Satomi, Kawasaki Kohsuke, Shimomura Junpei, Murata Mari, Morimoto Chiaki, Hirai Asae, Kawakami Kazuma, Bhongsatiern Phan, Iwayama Tomoaki, Sawada Keigo, Yamada Satoru, Murakami Shinya	4. 巻 -
2. 論文標題 Reciprocal role of PLAP 1 in HIF 1 mediated responses to hypoxia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12976	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川崎公輔、竹立匡秀、山本智美、森本千晶、平井麻絵、下村純平、村田真理、河上和馬、沢田啓吾、村上伸也
2. 発表標題 PLAP-1による低酸素誘導因子HIFの活性制御
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会(第153回)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 下村純平、竹立匡秀、沢田啓吾、森本千晶、平井麻絵、川崎公輔、村田真里、河上和馬、岩山智明、藤原千春、村上伸也
2. 発表標題 セメント芽細胞が歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会(第153回)
4. 発表年 2020年 ~ 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------