

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月19日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792478

研究課題名（和文）歯周組織の炎症と再生における低酸素環境が遺伝子転写活性へ及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect for transcriptional activity by hypoxic condition on periodontal regeneration and inflammation

研究代表者

岩田 倫幸 (TOMOYUKI IWATA)

広島大学・病院・助教

研究者番号：30418793

研究成果の概要（和文）：本研究において、低酸素が低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$  と間葉系幹細胞 (MSCs) の未分化マーカー転写因子からなる転写因子群およびマイクロ RNA の相互作用によって分化能を中心とした MSC の機能が制御される可能性が示唆された。これにより、これら遺伝子の発現制御に着目した酸素濃度調整を中心とする低酸素誘導性転写因子群の制御によって“歯周組織の恒常性を維持した効果的な歯周組織再生”につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, it can be suggested that hypoxic condition can regulate MSCs cell function, mainly differentiation potential, by the interaction with hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and a group of transcription factors consisting of MSCs undifferentiating markers and micro RNA. Therefore, it can be expected that the regulation of hypoxia inducible transcription factors, especially by the control of local oxygen tension focused on the regulation of these gene expression, can result in “effective periodontal tissue regeneration with sustained homeostasis in periodontal tissue”.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：低酸素, 間葉系幹細胞, 歯周予防学, 転写活性, 再生歯学, microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

生体内において、末梢組織に進むにつれ酸素濃度は低下し、炎症局所における酸素濃度は0～1%とされている。また、慢性炎症に関与する喫煙によって歯周炎局所の酸素濃度は低下する。細胞が低酸素状態に晒されると、低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$  が細胞内に蓄積される。HIF-1 $\alpha$  は様々な遺伝子発現を制御す

るとされ、低酸素環境において好中球の活性酸素放出の促進に関与することなどから、低酸素は炎症の発生および持続に関与すると考えられている。

間葉系幹細胞 (MSCs) は多能性細胞とされ、骨、軟骨、脂肪組織を含む様々な組織を構成する細胞へと分化する能力がある。更に歯周組織を構成する骨とセメント質にも分化

可能である。このことから、MSCs は歯周組織再生に有用であると考えられている。MSCs の分化メカニズムは未だ不明な点が多いが、HIF-1 $\alpha$  の標的遺伝子の一つである DEC1 が骨分化を促進すること、更には、同じく標的遺伝子の一つである TWIST-1 が歯周靭帯細胞 (HPL cells) に高く発現され、HPL cells の石灰化に関与していることが報告されている。これらの遺伝子はプロモーター領域に HIF-1 結合配列 (HIF-1 binding site; HBS) を持つ転写因子であり、骨関連転写因子 Osterix も同様に HBS を持つ。このことから、HIF-1 $\alpha$  を中心とした転写因子群が骨分化に関与していると考えられる。また、低酸素環境にある骨髄中で MSCs は未分化状態かつ多能性を維持していることから、低酸素環境において HIF-1 $\alpha$  および標的遺伝子が細胞分化を制御するという可能性が考えられる。また、MSCs の未分化マーカーとされる遺伝子の中にも HBS を含む転写因子が含まれていることから、MSCs の未分化状態維持にこれらの転写因子群が関与すると考えられる。

更に、歯周炎局所において、炎症の原因除去によって自発的な骨再生が認められる点および炎症性サイトカインによって HIF-1 $\alpha$  が誘導される点から、歯周炎局所における歯周組織構成細胞の細胞機能制御は、HIF-1 $\alpha$  および標的遺伝子の働きに加えて、酸素濃度による細胞機能の恒常性維持が行なわれていることが示唆される。

これらのことより、低酸素誘導性転写因子群の細胞機能維持および歯周組織での恒常性維持への関与が考えられる。

## 2. 研究の目的

歯周組織の酸素濃度は、歯周炎の病態と恒常性維持に深く関わり、細胞機能の制御に関与していることが示唆されている。本研究では、低酸素環境が培養細胞の分化能を中心とした細胞機能に及ぼす影響および炎症の制御を中心とした恒常性維持に関する影響を、低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$  および間葉系幹細胞の未分化マーカー転写因子からなる転写因子群の関与という観点から明らかにする。

本研究課題の具体的な目的は、

- (1) 低酸素および HIF-1 $\alpha$  によって変化  
する未分化マーカー転写因子の細胞  
機能に対する影響を明らかにす  
る
- (2) これらの転写因子の発現・転写活性

の調整が歯周組織再生に及ぼす影響  
を解明する

- (3) 炎症性サイトカイン発現に関わる低酸  
素誘導性転写因子群を同定し、その影  
響を明らかにする

これらにより、本研究期間では、

- (1) 低酸素環境が歯周組織での炎症の惹起  
ならびに歯周組織再生に対して重要  
であることを明らかにする
- (2) 酸素濃度の調整による低酸素誘導性転  
写因子群を制御することで、歯周組織  
の恒常性を維持しつつ効果的な歯周  
組織再生を行なう方法を開発する

ことを最終的な目的とする。

最終的には、局所の酸素濃度を制御すること  
で、これらの転写因子の発現を制御し、移植  
間葉系幹細胞および残存歯周組織細胞の機  
能を制御し、安全かつ効果的な歯周組織再生  
および歯周炎の予防を達成することを目的  
とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 未分化マーカー転写因子に対する低酸 素および HIF-1 $\alpha$ の影響

MSCs および HPL cells を培養して HIF-1 $\alpha$   
を誘導し、0~72 時間での MSCs の未分化マ  
ーカー転写因子の発現に対する評価を行なっ  
た。

HIF-1 $\alpha$  誘導因子として、低酸素、塩化コバ  
ルト (CoCl<sub>2</sub>) を用い、未分化マーカー転写因子  
として報告されている 9 つの転写因子 : ETV1,  
SOX11, FOXP1, GATA6, SIM2, ETV5, HMGA2,  
PRDM16, KLF12 およびポジティブコントロ  
ールとして LIF に対する検討を行なった。

未分化状態誘導因子のポジティブコントロ  
ールとして、脱分化などの作用が知られてい  
る Noggin およびヒストン脱アセチル化酵素  
(HDAC) 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA)  
を用いた。

評価方法は、リアルタイム PCR による mRNA  
レベル の検討を行なった。

### (2) 骨分化および炎症性サイトカイン発現 に対する低酸素および HIF-1 $\alpha$ の影響

MSCs および HPL cells を低酸素環境下で培  
養することによって低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$   
を誘導し、0~28 日目での骨関連遺伝子の発  
現レベル、石灰化に対する評価を行なった。

また、歯肉線維芽細胞 (HGF) を含めた歯  
周組織構成細胞を用いて炎症性サイトカイ

ンの発現レベルも検討した。

HIF-1 $\alpha$  誘導因子として低酸素および CoCl<sub>2</sub> を用い、評価する骨関連遺伝子として、TWIST-1, Runx2, Osterix などの骨分化関連転写因子、および Osteopontin, Alkaline phosphatase (ALPase), Osteocalcin, BMP2 などの骨関連遺伝子、炎症性サイトカインに関しては、IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-4, IL-10 に加えて、慢性炎症時に上昇されるとされる Ceruloplasmin (CP) の検討を行なった。

評価方法は

- ① リアルタイム PCR による mRNA レベル
- ② 骨基質染色による石灰化・ALP 活性のレベル

の検討を行なった。

骨分化誘導培地は 10% ウシ胎児血清, デキサメサゾン (0.1  $\mu$ M), アスコルビン酸 (0.05mM),  $\beta$ -グリセロリン酸 (10mM) を含む  $\alpha$  MEM を用いた。

### (3) 低酸素環境下において誘導されうる micro RNA の網羅的解析

MSCs および HPL cells を HIF-1 $\alpha$  誘導条件下で 0~72 時間培養し、低酸素環境下で影響される micro RNA を網羅的に解析する。

HIF-1 $\alpha$  誘導因子として、低酸素, CoCl<sub>2</sub> を用い、ポジティブコントロールとして、Noggin および TSA を用いた。

影響されうる micro RNA の網羅的解析は Applied Biosystem から提供されている一般的に機能が定義されている主要な 374 種の micro RNA の発現解析をおこなうことが可能な TaqMan<sup>®</sup> Array MicroRNA Card を用いて行なった。

### (4) 低酸素環境下における細胞機能制御に関与する micro RNA の同定

MSCs および HPL Cells において低酸素によって影響される micro RNA の中から、遺伝子ライブラリーを用いて低酸素誘導性未分化マーカー転写因子の遺伝子上に存在する micro RNA を選択した。更に、これらの発現が転写因子の発現制御により影響を受けることを確認した。

### (5) micro RNA 発現調整による未分化マーカー転写因子に対する影響

MSCs および HPL cells において、低酸素環境下における低酸素誘導性未分化マーカー

転写因子の発現に関与すると考えられる micro RNA の発現および機能調整を行ない、未分化マーカー転写因子として報告されている 9 つの転写因子: ETV1, SOX11, FOXP1, GATA6, SIM2, ETV5, HMGA2, PRDM16, KLF12 および LIF に対する検討を行なった。

なお、micro RNA 発現調整は micro RNA のトランスフェクションにより行ない、機能制御は micro RNA inhibitor のトランスフェクションにより行なった。それぞれの導入効率は標的 micro RNA に対して Applied Biosystem の TaqMan<sup>®</sup> microRNA assay を用いて行なった。

評価方法は、リアルタイム PCR による mRNA レベル の検討を行なった。

### (6) micro RNA 発現調整による細胞機能に対する影響

MSCs および HPL cells において、低酸素環境下における低酸素誘導性未分化マーカー転写因子の発現に関与すると考えられる micro RNA の発現調整および機能調整を行ない、0~28 日目での細胞増殖および骨分化に対する影響を検討した。

なお、micro RNA 発現調整は micro RNA のトランスフェクションにより行ない、機能制御は micro RNA inhibitor のトランスフェクションにより行なった。それぞれの導入効率は標的 micro RNA に対して Applied Biosystem の miRNA assay を用いて行なった。更に、骨分化誘導は骨分化誘導培地を用いて行なった。

評価方法は

- ① 細胞計測による細胞増殖
- ② リアルタイム PCR による骨分化関連遺伝子の mRNA レベル
- ③ 骨基質染色による石灰化・ALP 活のレベルによる石灰化

の検討を行なった。

### (7) micro RNA 発現調整による歯周組織での炎症制御に対する影響

歯周組織構成細胞 (HPL cells および HGF) および MSCs において micro RNA の発現調整および機能調整を行ない、炎症性サイトカインの発現に対する影響を検討した。なお、micro RNA 発現調整は micro RNA のトランスフェクションにより行ない、機能制御は micro RNA inhibitor のトランスフェクションにより行なった。それぞれの導入効率は標

的 micro RNA に対して Applied Biosystem の TaqMan® microRNA assay を用いて行なった。

評価方法は、リアルタイム PCR による炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルの検討を行なった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 未分化マーカー転写因子に対する低酸素および HIF-1 $\alpha$ の影響

間葉系幹細胞 (MSCs) を低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$  誘導因子存在下または通常条件下で培養して HIF-1 $\alpha$  を誘導し、0~72 時間での MSCs 未分化マーカー転写因子の発現に対する評価を行なった。HIF-1 $\alpha$  誘導因子として低酸素、塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) を用い、分化状態のポジティブコントロールとして、脱分化などの作用が知られている Noggin およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤トリコスタチン A (TSA) を用いた。未分化マーカー転写因子として ETV1, SOX11, FOXP1, GATA6, SIM2, ETV5, HMGA2, PRDM16, KLF12 など 9 つの転写因子および LIF に対する mRNA レベルを検討したところ、それぞれの刺激において、9 つの転写因子のうち GATA6, ETV5, SIM2 の発現上昇が 12~24 時間で認められた。

##### (2) 骨分化および炎症性サイトカインに対する低酸素および HIF-1 $\alpha$ の影響

MSCs を低酸素環境下で培養することによって HIF-1 $\alpha$  を誘導し、骨関連遺伝子の発現レベルおよび石灰化に対する評価を行なった。

HIF-1 $\alpha$  誘導因子として低酸素および CoCl<sub>2</sub> を用い、骨関連遺伝子として、Runx2, Osterix, Osteopontin, Osteocalcin の mRNA 発現の検討を行なった。骨分化誘導は、骨分化誘導培地を用いた。

結果、骨分化誘導前に低酸素培養を行なうことにより、石灰化の著明な促進は認めないが、Runx2, Osterix, Osteopontin の促進が認められた。

また、同様な実験系において、骨分化誘導前に Noggin または TSA 刺激を行なうことにより同様に著明な石灰化の促進は認めないが、Runx2, および Osterix の促進は認められた。炎症性サイトカインの発現に関しては、MSCs を HIF-1 $\alpha$  誘導条件下で 12~24 時間培養すると、セルロプラスミンおよび IL-8 は 12 時間、

IL-1 $\beta$  は 48 時間での発現が亢進された。更に、未分化状態を誘導する目的で Noggin 刺激をおこなうと、IL-8 に加えて、IL-10 および IL-4 の発現が亢進した。

##### (3) 低酸素環境下において誘導される micro RNA の網羅的解析

MSCs を HIF-1 $\alpha$  誘導条件下で 0~72 時間培養し、低酸素環境下で誘導される miRNA を Applied Biosystem の TaqMan® Array MicroRNA Card を用いて網羅的に解析した。HIF-1 $\alpha$  誘導因子として低酸素、CoCl<sub>2</sub> を用い、未分化状態のポジティブコントロールとして、Noggin, TSA を用いた。解析の結果、374 種の micro RNA のうち、すべての誘導因子刺激において上昇を示した miRNA は 40 種であり、減少を示したのは 12 種であった。

##### (4) 低酸素環境下における細胞機能制御に関与する microRNA の同定

MSCs において HIF-1 $\alpha$  誘導条件下および未分化維持条件下で変化を示した microRNA は 377 種のうち 52 種 (増加: 40 種、減少: 12 種) であったが、これらの中から遺伝子ライブラリーを用いて低酸素誘導性未分化マーカー転写因子に関連する microRNA をさらに絞り込んだところ、低酸素誘導性 microRNA として知られている miR-210 の他に、2 つの microRNA が有力な候補として考えられた。

##### (5) micro RNA 発現調整による細胞機能に対する影響および歯周組織での炎症制御に対する影響の検討

絞り込まれた 2 つの micro RNA を MSCs にトランスフェクションさせることにより過剰発現させ、HIF-1 $\alpha$  およびこれまでの実験で発現上昇が確認された低酸素誘導性未分化マーカー転写因子 (GATA6, ETV5, SIM2) およびその他の MSC 未分化関連転写因子 (ETV1, SOX11, FOXP1, KLF12, PRDM16, HMGA2) の発現を確認したところ、ETV5 および GATA6 の発現は減少し、SIM2 は変化を認めなかったが、KLF12, SOX11 および HMGA2 の発現は増加した。また、細胞増殖に関する検討を行なったところ、有意な影響は認められなかった。更に、骨分化誘導を行なったところ、骨分化関連遺伝子: Runx2, Osterix, Osteopontin, Osteocalcin のうち、ほとんどの発現が促進された。また、炎症制御に関して炎症性サイ

トカインの発現を調べたところ、セルロプラスミンおよび IL-1 $\beta$ , IL-8 および IL-10 の発現が亢進した。

また、miR-210 の inhibitor をトランスフェクションすることにより、ETV5 の発現が抑制された。また、骨分化誘導時においては、オステオポンチンの発現抑制および BMP2 の発現亢進が確認された。以上のことから、これらの発現制御に対しては HIF-1 $\alpha$  の発現が直接関与している可能性が示唆される。

以上の結果により、低酸素で誘導される未分化関連転写因子と microRNA の相互作用によって、MSC の機能が制御されている可能性が示唆された。

今回得られた研究成果は、これまでに MSC の機能制御に関与する microRNA が報告されてきたが、MSC s に対して未分化状態の維持という概念で低酸素誘導性因子と microRNA の相互作用に着目したものは少なく、その可能性及び候補となる microRNA が明らかになった点で重要であると考えられる。

また、これらの成果によって、MSC 機能制御に対して重要な役割を果たす因子および制御機構の一端が明らかとなったため、今後は、絞り込まれた 2 つの micro RNA を中心に、これらの発現制御に着目した酸素濃度調整を中心とした低酸素誘導性転写因子群の発現制御および調整による効果的な歯周組織再生につながることを期待される。

#### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. Regulation of Osteogenesis in Mesenchymal Stem Cells by Periodontal Tissue, KANEDA, E., IWATA, T., FUJITA, T., ISHIDA, S., TAKAHASHI, K., SHIBA, H., and KURIHARA H., 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, March 20-23, 2013, Seattle, USA
2. 石田 充, 岩田倫幸, 柴 秀樹, 兼田英里, 河口浩之, 栗原英見, 間葉系幹細胞

の多分化能維持に関する基礎的研究, 第 22 回日本歯科医学会総会, 2012 年 11 月 9-11 日, 大阪市

3. 兼田英里, 岩田倫幸, 藤田 剛, 石田 充, 柴 秀樹, 河口浩之, 栗原英見, 歯肉線維芽細胞由来の液性因子が間葉系幹細胞の骨分化に与える影響, 第 55 回春季日本歯周病学会学術大会, 2012 年 5 月 18-19 日, 札幌市

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩田 倫幸 (TOMOYUKI IWATA)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号: 30418793

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: