

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593125

研究課題名(和文)低酸素誘導因子の歯周病への影響とその抑制蛋白の治療薬としての可能性

研究課題名(英文)Effect of hypoxia inducible factor on periodontal diseases and possibility of HIF inhibition as therapeutic drug

研究代表者

木戸 淳一(KIDO, Junichi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10195315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周ポケット内の低酸素環境が歯周病病態に与える影響を検討するため、低酸素作用の主因子であるHypoxia-inducible factor(HIF)が関連する炎症や免疫反応等への影響を調べた。その結果、口腔上皮細胞や線維芽細胞で低酸素によりHIFが増加し、炎症性サイトカインや血管新生因子の発現が増加する一方、カルプロテクチン(CPT)等の抗菌ペプチドの発現が減少した。HIF阻害剤であるchetominは、低酸素によるTNF- α やVEGFの増加を抑制し、CPTの抑制を減少させた。この結果から、歯周ポケットの低酸素環境は、歯周組織に炎症を惹起し、HIFの抑制は改善を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of hypoxia and hypoxia-inducible factor (HIF) on inflammation and immune response to examine hypoxic functions in periodontal pocket was investigated in this study. Hypoxia increases the expression of inflammatory cytokines and angiogenetic factor, however decreases calprotectin, an antibacterial peptide, in oral keratinocytes and gingival fibroblasts. Chetomin, an inhibitor of HIF function, inhibited hypoxia-induced up-regulation of TNF- α and VEGF, and suppressed down-regulation of calprotectin. These results suggest that hypoxia in periodontal pocket enhances inflammation of periodontal tissues and inhibition of HIF induces improvement of inflammatory responses.

研究分野：歯周治療学

キーワード：低酸素環境 HIF 炎症性サイトカイン 抗菌ペプチド 血管新生因子 LPS

1. 研究開始当初の背景

生体が低酸素状態(Hypoxia)になると様々な組織で炎症反応が生じる。低酸素環境は組織と細胞レベルで炎症ばかりでなく、血管新生、免疫反応、酸化ストレスやアポトーシスなど複数の生体反応に影響を与える。これらの影響は低酸素状態により組織や細胞中に蓄積される低酸素誘導性因子(Hypoxia-inducible factor: HIF)により制御されている。特に、HIF-1 α は組織中の炎症性サイトカインの発現を増加させる。

一方、歯周病や歯周組織における低酸素症やHIFに関する報告は少なく、これまでに歯根膜線維芽細胞の低酸素培養でIL-1 β が上昇することやヒト歯周炎組織中にHIF-1 α が同定されているが、低酸素環境が歯周ポケット周囲の歯周組織においてどのような影響を及ぼしているかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病においてHIFを介して低酸素環境が引き起す作用が口腔上皮細胞や線維芽細胞に及ぼす様々な影響を調べることにより、低酸素環境が歯周病病態に及ぼす影響を検討した。また、低酸素環境下で歯周病原因子のLPSが歯周組織細胞へ及ぼす影響についても調べた。さらに、HIFの抑制が低酸素誘導性の炎症や免疫反応に与える作用を明らかにすることにより低酸素環境の抑制が歯周病の治療となる可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞の低酸素培養と生存率:

ヒト口腔上皮細胞株(TR146細胞)とヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を10%ウシ胎児血清含有Ham's F12培地とDMEM培地に播種し、5日間培養後、1% O₂/5% CO₂培養器に移し48時間まで培養を行った。細胞の生存率はCell Counting kit-8(Dojindo)を用いて測定した。

(2) DNA マイクロアレイ分析: 上皮細胞および線維芽細胞を24時間1%O₂下で低酸素培養した後、通法に基づいてRNAを抽出した。分離したRNAを用いてDNAマイクロアレイ分析し(Human Gene 1.0 ST Array; Affymetrix社)、発現変化のあった遺伝子の網羅的解析を行った。

(3) 遺伝子発現分析(RT-PCR および定量的PCR): 培養細胞から分離したRNAから通法に従いcDNAを合成し、各種サイトカインや抗菌ペプチドなどのプライマーを用いてRT-PCRおよび定量的real time PCR法により遺伝子発現のレベルを検討した。

(4) 蛋白発現分析: 培養した細胞およびその上清中のカルプロテクチン, TNF- α やVEGFなどの蛋白量をELISAキットにて測定した。また、抗HIF-1 α 抗体を用いてwestern

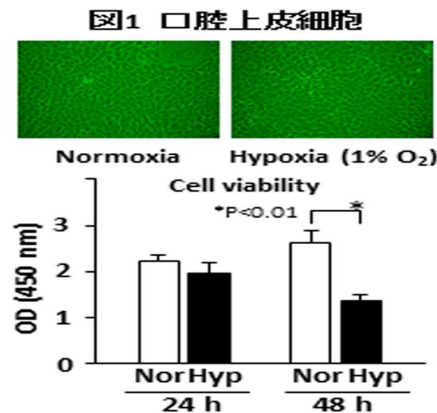
blottingを行い、低酸素環境がHIF-1 α 蛋白の蓄積に及ぼす影響を調べた。

(5) HIFの関与とシグナル経路の分析: HIF-1 α 作用の阻害剤であるchertomin(CTM)により細胞を前処理した後、低酸素培養し、低酸素環境による作用がHIF-1 α を介している可能性を検討した。また、低酸素刺激シグナルとMAPK経路の関係をERK, p38およびJNKの阻害剤(U0126:10 μ M, SB203580:30 μ M, SP600125:10 μ M)を用いて検討した。

(6) 低酸素環境下での歯周病原因子の影響の検討: *P.gingivalis*由来LPS(1 μ g/ml)を細胞に添加した後、低酸素培養を行い、RT-PCRにて遺伝子(TLR2, TNFA, S100A8, S100A9)発現に及ぼす両因子の影響を検討した。

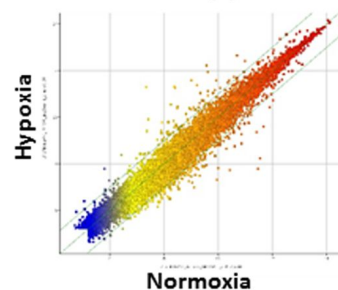
4. 研究成果

(1) 低酸素環境の細胞への影響: 口腔上皮細胞を1% O₂/5% CO₂下で培養した場合、24時間までは細胞形態および細胞生存率に影響は認められなかったが、48時間培養では細胞活性の低下が認められた(図1)。



(2) 低酸素環境による遺伝子発現への影響: 口腔上皮細胞と線維芽細胞を低酸素培養し遺伝子発現への影響をDNAマイクロアレイで分析した結果、上皮細胞で237個、線維芽細胞では42個の遺伝子の発現変化がみられた(図2: 上皮細胞での発現変化)。

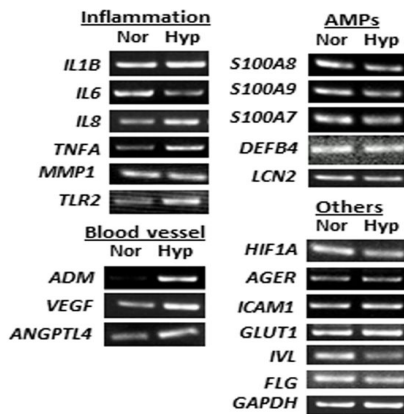
図2 DNA microarray (TR146 cell)



上皮細胞について変化のあった遺伝子の詳細をRT-PCRで調べた。その結果、炎症性サイトカインのIL-1 β , TNF- α やIL-8の発現は低酸素環境により増加したが、IL-6発現は減

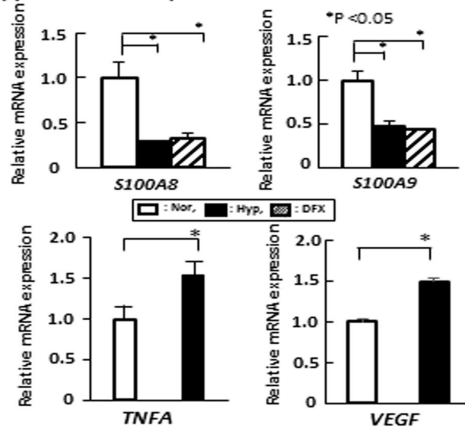
少した。炎症に関連する TLR-2 は発現が増加したが、MMP-1, -2, -3 のレベルは変化しなかった。また、低酸素環境により血管新生に関連した adrenomedullin(ADM), VEGF および angiopoietin-like 4 は発現が増加したが、抗菌ペプチドである S100A7, S100A8, S100A9 や lipocalin2 の遺伝子発現は減少した。さらに、上皮細胞の分化マーカーである involucrin や filaggrin の発現は減少したが細胞接着因子の ICAM-1 や糖代謝関連因子の GLUT1 は発現上昇した (図 3)。

図3 Effect of hypoxia on gene expression



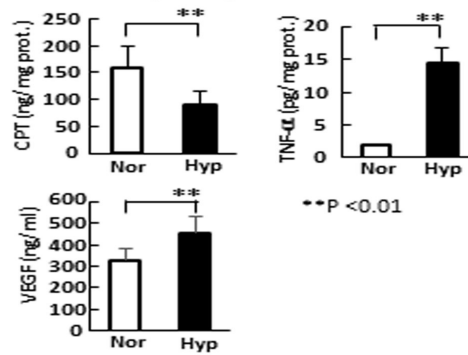
そこで、炎症関連因子として TNF- α 、血管新生因子として VEGF、抗菌ペプチドとして S100A8/S100A9 の遺伝子発現について定量的 real-time PCR を行った結果、低酸素環境により TNF- α と VEGF の発現は増加し、S100A8 と S100A9 発現は減少することから (図 4)、低酸素環境により歯周組織に炎症反応が誘引されていることが推測された。

図4 Effect of hypoxia on gene expression (q. real time PCR)



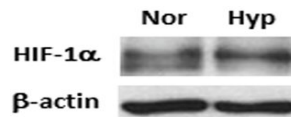
(3) 低酸素環境による蛋白発現への影響：低酸素環境で遺伝子発現に変化が認められた因子のうち炎症性サイトカインの TNF- α 、血管新生因子の VEGF および抗菌ペプチドのカルプロテクチンについて低酸素環境による影響を ELISA 測定にて調べた。その結果、低酸素環境により TNF- α と VEGF の蛋白発現は有意に増加したが、カルプロテクチンの発現は減少した。(図 5)

図5 Effect of Hypoxia on CPT, TNF- α and VEGF (ELISA)



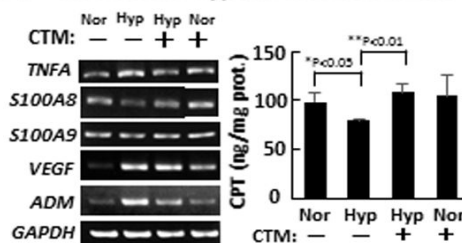
(4) 低酸素環境での HIF の関与の検討：低酸素環境の及ぼす作用が HIF-1 α を介しているかどうかを検討するために、HIF-1 α 蛋白を western blotting で調べた。その結果、低酸素培養により細胞中の HIF-1 α 蛋白の蓄積増加が認められた (図 6)。

図6 Increase of HIF-1 α by hypoxia



そこで、HIF-1 α シグナルを阻害する CTM を用いて低酸素による作用への影響を調べた。低酸素環境により低下した S100A8/S100A9 mRNA 発現は回復し、カルプロテクチンも CTM により低酸素環境誘発性の発現低下は認められなかった。また、TNFA, VEGF や ADM 等の遺伝子の発現は低酸素環境により増加し、CTM によりその上昇が低下した。これらの結果から、低酸素環境によるカルプロテクチン、TNF- α , VEGF や ADM の発現変化は、HIF-1 α を介していることが示唆された。(図 7)

図7 CTM restores hypoxia-induced effects



(5) 低酸素刺激シグナルにおける MAPK の関与：口腔上皮細胞において p38, ERK, JNK の各阻害剤を前処理し、その後低酸素培養刺激を行い S100A8/S100A9 と TNF- α 遺伝子 (TNFA) の発現を調べた。その結果、低酸素刺激により増加した TNFA 発現は SB203580 と U0126 の阻害剤により減少したことから、低酸素刺激による TNF- α の増加は p38 および ERK の経路を介していることが示唆された。一方、S100A8/S100A9 発現は低酸素刺激により低下し、3 種の MAPK 阻害剤によりさらに減少が認められた。低酸素刺激によるカルプロ

テクチン発現への MAPK の関与についてはさらなる検討が必要である (表 1)。

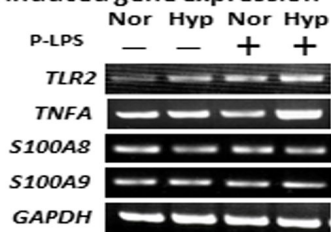
表1 Effect of MAPK inhibitors on hypoxia-induced gene expression

Gene	Nor	Hyp	Hyp SB*	Hyp U**	Hyp SP***
S100A8	1	0.3	0.06	0.05	0.08
S100A9	1	0.6	0.36	0.25	0.34
TNFA	1	21.6	7.8	12.8	25.2

(SB*:SB203580, U**:U0126, SP***:SP600125)

(6) 低酸素環境下での P-LPS の遺伝子発現への影響: 低酸素培養した口腔上皮細胞に P-LPS を添加し, 遺伝子発現への影響を RT-PCR にて検討した。その結果, 炎症に関連する TLR-2 と TNF- α の遺伝子は, 低酸素刺激あるいは P-LPS により発現上昇し, 低酸素と P-LPS の共刺激によりさらなる増加を示した。一方, S100A8/S100A9 発現は低酸素刺激により低下したが, P-LPS では著しい変化はなく, 低酸素と P-LPS の共刺激の明らかな影響は認められなかった (図 8)。

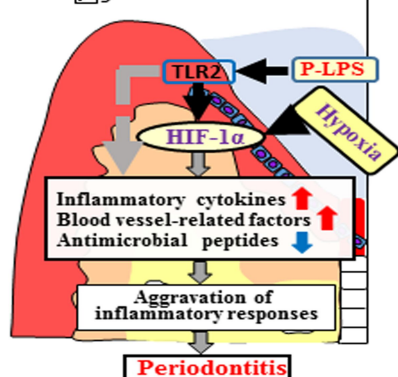
図8 Effect of LPS on hypoxia-induced gene expression



<まとめ>

低酸素環境により口腔上皮細胞において TNF- α などの炎症性サイトカインや VEGF などの血管関連因子の発現の上昇が認められた。一方, 低酸素環境はカルプロテクチンなどの抗菌ペプチド発現を減少させた。これらの結果は, 歯周ポケット内の低酸素環境が, 炎症の悪化と自然免疫の抑制を引き起こしている可能性を示唆している。さらに, LPS などの歯周病原因子は, ポケット内の低酸素環境と共に作用して歯周炎病態の増悪を引き起こしている可能性が考えられる (図 9)。

図9



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 2件)

Hiroshima Y, Bando M, Inagaki Y, Kido R, Kataoka M, Nagata T, Kido J. Effect of Hangeshashinto on calprotectin expression in human oral epithelial cells. *Odontology*, 査読有, in press. 2015.

Kajiura Y, Bando M, Inagaki Y, Nagata T, Kido J.

Glycated albumin and calprotectin levels in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontology*, 査読有, 2014, 85: 1667-1675.

DOI:10.1902/jop.2014.140241.

[学会発表](計 4件)

木戸淳一, 中島由紀子, 板東美香, 稲垣裕司, 永田俊彦.

低酸素症と *P. gingivalis* 由来リポ多糖はヒト口腔上皮細胞での炎症関連因子および血管関連因子の発現を調節する.

第140回日本歯科保存学会春季学術大会(滋賀県・大津市), 2014年6月20日.

Nakajima Y, Kido J, Bando M, Inagaki Y, Nagata T.

Effect of hypoxia and *P.gingivalis*-lipopolysaccharide on the expression inflammation-related molecules in human oral keratinocytes.

第57回春季日本歯周病学会学術大会,(岐阜県・岐阜市), 2014年5月23日.

中島由紀子, 木戸淳一, 稲垣裕司, 板東美香, 廣島佑香, 村田裕美, 永田俊彦.

低酸素環境がヒト口腔上皮細胞の各種遺伝子発現に及ぼす影響.

第56回秋季日本歯周病学会学術大会,(群馬県・前橋市), 2013年9月22日.

Nakajima Y, Kido J, Inagaki Y, Bando M, Hiroshima Y, Murata H, Nagata T.

Effect of hypoxia on gene expression in human oral keratinocytes.

10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Nara, Sept 4, 2013.

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

木戸 淳一 (KIDO, Junichi)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：10195315

(2)研究分担者

稲垣 裕司 (INAGAKI, Yuji)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：50380019

(*平成 24 および 25 年度に研究分担者)

(3)連携研究者

なし