

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24137

研究課題名（和文）HIF1aが修飾するヒト歯髄細胞からの炎症性メディエーター産生メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of HIF1a-modulated production of inflammatory mediators in human dental pulp cells

研究代表者

藤井 真由子（Fujii, Mayuko）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80844357

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯髄炎を低酸素状態がどのように修飾しているのかについて不明な点が多い。本研究においては、ヒト歯髄細胞をLPSにて刺激し、炎症性メディエーター、シグナル経路について検討した。その結果、HIF1aの強制発現により、LPS刺激によるNFκBシグナルの活性化、IL1b、TNFαといった炎症性メディエーター発現がさらに亢進した。一方、IL6産生はLPS刺激により誘導されるが、HIF1aの強制発現により産生が抑制された。IL6はNFκBシグナル以外にCEBP/bシグナルの活性化も関与する。今回、SOCS3がHIF1a存在下で発現が亢進し、LPS刺激下でのCEBP/b産生の制御に関与することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄組織は健全な状態においても低酸素状態にあり、硬組織で囲まれているため、歯髄炎によりさらに低酸素状態が誘発される。HIF1aによって歯髄細胞からの炎症性メディエーター産生や炎症の病態がどのように修飾されているのか、HIF1aが関与する歯髄炎の特性を明らかにし、制御法を開発することにより歯髄保存に関する新しい知見を得られ炎症歯髄に対する新規治療の開発の端緒となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is unclear how hypoxia modulates pulpitis. In this study, we stimulated human dental pulp cells with LPS and investigated inflammatory mediators and signaling pathways. We found that forced expression of HIF1a further enhanced LPS-stimulated activation of NFκB signaling and mRNA of inflammatory mediators such as IL1b and TNFα. On the other hand, IL6 production was induced by LPS stimulation, but suppressed by forced expression of HIF1a. In this study, we confirmed that SOCS3 is upregulated in the presence of HIF1a and is involved in the regulation of CEBP/b production under LPS stimulation.

研究分野：細菌性炎症

キーワード：歯髄炎 低酸素 HIF1a LPS

1. 研究開始当初の背景

進行した歯髄炎が惹起された歯に対しては抜髄処置が余儀なくされる。そこで、歯髄炎の特性を解析し、それを制御する手法の開発が望まれている。歯髄組織は周囲を硬組織で囲まれていることから、歯髄炎に伴う歯髄内圧の亢進に伴い歯髄内血管が圧平され、循環障害に陥り、その結果歯髄内は低酸素状態となる。低酸素状態において特異的に誘導される転写調節因子の一つが hypoxia-inducible factor (HIF) 1a であり、代謝、生存、血管新生などに関連する種々の因子の産生を誘導すると報告されている。歯髄炎の進展における HIF1a の関与について不明な点が多く十分な解析がなされていない。我々は、低酸素培養した歯髄細胞を細菌由来の内毒素である lipopolysaccharide (LPS) にて刺激したところ、炎症性メディエーターである IL1b、TNFa 産生が亢進するとともに、HIF1a 発現も増加した。我々は歯髄細胞での HIF1a による炎症における修飾に着目し、HIF1a 発現の制御によって歯髄炎の進展を制御できるかを目標として研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は LPS 刺激ヒト歯髄細胞の炎症性メディエーター産生に対する HIF1a の働きを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト抜去歯より分離した歯髄幹細胞 (hDPCs) を用いて解析を行った。酸素濃度 21% (通常酸素) あるいは 1% (低酸素) で前培養を行ったあと、lipopolysaccharide (LPS: 100ng/ml) にて刺激した。HIF1a の強制発現には、human HIF1a ORF あるいは PHD 結合領域に変異を加えた human HIF1a ORF が挿入されたタンパク発現ベクターを用いた。炎症性メディエーター Interleukin (IL) 1b, 腫瘍壊死因子 (TNFa), IL-6 の mRNA 発現は、細胞より RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、その cDNA をテンプレートにして、特異的プライマーを用い、リアルタイム PCR を行った。また ELISA にて IL-6 タンパク発現を確認した。また、HIF1a、nuclear factor-kappa B (NFkB), suppressor of cytokine signaling (SOCS)3、CCAAT-enhancer-binding proteins (CEBP) b の発現は、western blotting にて検討した。CEBPb の強制発現ベクターについては CEBPb ORF が挿入されたタンパク発現ベクターを作成し、使用した。発現抑制には CEBPb 特異的 short interfering RNA (siRNA) を使用した。SOCS3 の強制発現には、human SOCS3 ORF が挿入されたタンパク発現ベクターを用い、発現抑制には SOCS3 特異的 siRNA を使用した。

4. 研究成果

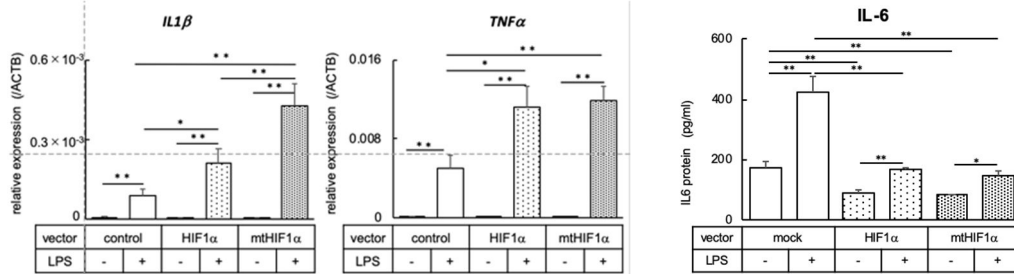
(1) 低酸素下または HIF1a 発現下における LPS ヒト歯髄細胞の炎症性メディエーターの遺伝子発現

hDPCs において、炎症性メディエーター IL1b, TNFa は LPS 刺激 3 時間後に遺伝子発現が一過性に亢進した。低酸素下または HIF1a の強制発現下では LPS 刺激により遺伝子発現が増強された。一方で IL-6 は LPS 刺激 3 時間後に遺伝子発現が上昇し、12 時間まで持続した。低酸素下または HIF1 α の強制発現下での LPS 刺激により 6 時間後以降に IL-6 の

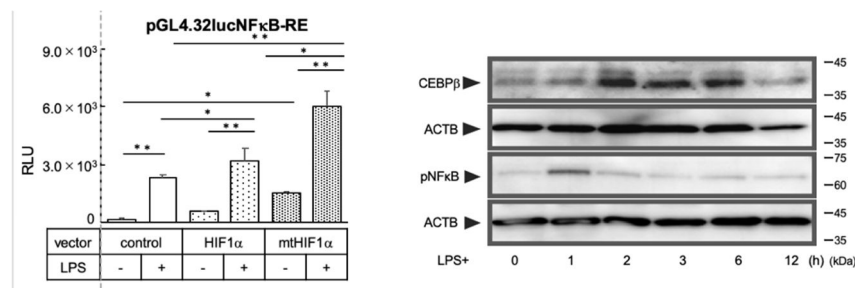
遺伝子発現と蛋白発現が減少した。

(2) 炎症性メディエーターの遺伝子発現に関するシグナル解析

低酸素下または HIF1 α の強制発現下では通常酸素下またはコントロールベクター下と比較し、LPS 刺激後、核内移行した NFkB が増強された。通常酸素下でリン酸化 NFkB p65 の

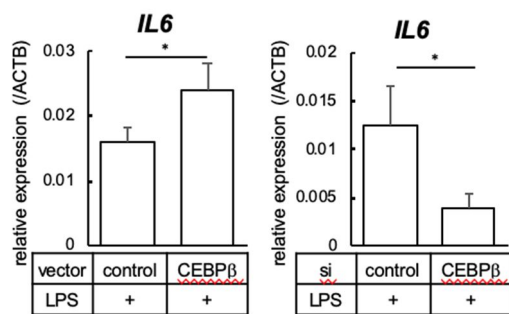


発現は 1 時間で一過性に発現した一方で、CEBP β は 2 時間から 6 時間発現が継続した。NFkB 阻害剤の添加は LPS 刺激 3 時間後の IL-6 発現抑制に有効であった。炎症性メディエーター IL1b, TNF α は LPS 刺激 hDPCs において主に NFkB シグナルを介して発現が亢進すると考えられた。また IL-6 は NFkB 以外の転写亢進因子 CEBPb が関与すると示唆された

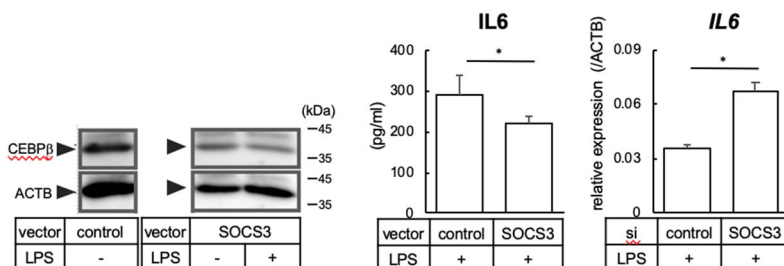


(3) CEBPb を介した IL-6 発現産生メカニズムの解析

hDPCs に CEBPb を強制発現させ、LPS 刺激を行うと IL-6 発現は亢進した。一方で siRNA により CEBPb 発現を抑制し、LPS 刺激を行うと IL-6 発現は抑制された。低酸素下または HIF1 強制発現下において LPS 刺激後、CEBPb 発現の抑制を認めた。



低酸素培養した hDPCs において SOCS3 の遺伝子、タンパク発現を確認した。低酸素下または HIF1a を強制発現させると SOCS3 発現が上昇し、LPS 刺激によりさらに亢進した。hDPCs に SOCS3 を強制発現させ、LPS 刺激を行うと IL-6 発現は抑制され、また CEBPb 発現の抑制を認めた。一方で SOCS3 発現を阻害し、LPS 刺激を行うと IL-6 発現は亢進した。



以上より低酸素状態において HIF1a は LPS 刺激による炎症性メディエーター産生を複雑に制御している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 M Fujii, N Kawashima, K Tazawa, K Hashimoto, K Nara, S Noda, S Nagai, T Okiji.	4. 巻 53
2. 論文標題 Hypoxia-inducible Factor 1 Promotes Interleukin 1 and Tumour Necrosis Factor Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Dental Pulp Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Endodontic Journal	6. 最初と最後の頁 636-646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iej.13264	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 M Fujii, N Kawashima, K Tazawa, K Hashimoto, K Nara, S Noda, M Kuramoto, S Oriyasa, S Nagai, T Okiji.	4. 巻 522
2. 論文標題 HIF1 inhibits LPS-mediated induction of IL-6 synthesis via SOCS3-dependent CEBP suppression in human dental pulp cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 308~314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.032	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 K Tazawa, N Kawashimai, M Kuramoto, S Noda, M Fujii, K Nara, K Hashimoto, T Okiji.	4. 巻 190
2. 論文標題 Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Is Up-Regulated in Response to Lipopolysaccharide via P38/Mitogen-Activated Protein Kinase in Dental Pulp Cells and Promotes Mineralization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2417~2426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.08.016	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 M Kuramoto, N Kawashima, K Tazawa, K Nara, M Fujii, S Noda, K Hashimoto, K Nozaki, T Okiji.	4. 巻 53
2. 論文標題 Mineral trioxide aggregate suppresses pro inflammatory cytokine expression via the calcineurin/nuclear factor of activated T cells/early growth response 2 pathway in lipopolysaccharide stimulated macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Endodontic Journal	6. 最初と最後の頁 1653~1665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iej.13386	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fujii M, Kawashima N, Oriyasa S, Noda S, Nara K, Hashimoto K, Tazawa K, Nagai S, Okiji T
2. 発表標題 HIF1a inhibits LPS-mediated induction of IL-6 synthesis via SOCS3-dependent CEBPb suppression in human dental pulp cells
3. 学会等名 The 21th KACD-JSCD Joint Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020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
---------	---------