

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：20K18792

研究課題名(和文)低酸素暴露したヒト歯根膜由来細胞でのC/EBP 発現制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of C/EBP beta expression control mechanism in hypoxia-induced modification human periodontal ligament cells

研究代表者

石山 未紗 (ISHIYAMA, Misa)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：80732502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：不死化ヒト乳歯由来歯根膜細胞SH9を用いて、通常培養(CO<sub>2</sub>:5%、air:95%、37℃)または低酸素培養(CO<sub>2</sub>:5%、O<sub>2</sub>:1%、37℃)を行いRNAおよびタンパク質を回収した。24時間の低酸素培養により、ANG及びVEGFのmRNA発現は増加し、CREBおよびSETD8の発現は減少した。通常培養後にDMOG処理を行った場合、ANG及びVEGF発現は増加しCREB及びSETD8減少し、低酸素培養と同じ結果になった。以上のことから低酸素下におけるANG、VEGF、CREB、SETD8発現の変動はHIF-1 を介してい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

歯の外傷では、受傷歯の歯根膜組織や周囲の歯槽骨の損傷を生じることが多い。外傷後の治癒過程は複雑で、低酸素環境に暴露された歯根膜細胞がどのような機序で組織再生、病的な歯根吸収に関与するのかについては不明な点が多い。本研究では低酸素培養した歯根膜細胞でANG、VEGFのmRNA発現は増加しCREB、SETD8の発現は減少することを見いだした。さらに通常培養後にDMOG処理を行った場合、ANG及びVEGF発現は増加しCREB及びSETD8減少し、低酸素培養と同じ結果になった。以上のことから低酸素下におけるANG、VEGF、CREB、SETD8発現の変動はHIF-1 を介している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Immortalized PDL cells derived from human deciduous teeth(SH9 cells)were cultured at 37℃ in 5% CO<sub>2</sub>/95% air (normoxic condition)or in 5% CO<sub>2</sub> 1% O<sub>2</sub> 24h.After an exposure to extract RNA and protein was recovered.Hypoxic culture for 24h increased the mRNA expression of ANG and VEGF, and decreased the expression of CREB and SETD8.When DMOG treatment was performed after normal culture, ANG and VEGF expression increased and CREB and SETD8 decreased, showing the same results as hypoxic culture.These findings suggest that changes in ANG, VEGF, CREB, and SETD8 expression under hypoxia may be mediated by HIF-1 .

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯根膜細胞 低酸素 HIF-1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯の外傷では受傷歯の歯根膜組織に損傷が生じ、治癒不全を起こす場合がある。強い外力を受けた歯根膜では、局所的な循環障害により虚血状態となり、低酸素状態に置かれると考えられる。また、治癒傾向にある歯では循環障害が改善され、再酸素化が起こると考えられている。

(2) 歯根膜における低酸素曝露と低酸素曝露後の再酸素化での遺伝子およびタンパク質の変化については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

申請者らは、株化ヒト歯根膜細胞に対する低酸素曝露により C/EBP の mRNA 発現が上昇することを明らかにした(文献 1)。C/EBP の発現調節には CREB も重要な働きをしていることが知られているが(文献 2) 歯根膜細胞におけるこれらの分子を介する発現制御メカニズムについて未だ未知の点が多い。本研究では、先の研究と同様に株化ヒト乳歯由来歯根膜細胞 (SH9) を用いて、低酸素曝露による HIF-1 ならびに CREB の役割を調べることを目的で計画した。

低酸素曝露における発現制御メカニズムが判明し、低酸素曝露後の下流遺伝子の変動パターンが明らかになれば、歯の外傷によって生じる不可逆的な歯根の吸収について、進行を停止させる方法を見いだすことができると期待される。また、低酸素曝露によって生じる、歯根膜細胞での初期応答経路が明らかになることで、その経路に関連している分子をターゲットにした歯根吸収の予防あるいは治療方法の開発にも寄与できると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) SH9 を大気 95%、CO<sub>2</sub> 5%、37 °C の条件下で通常培養(Control : Cont)したもの、ガス濃度調節剤 (アネロパックケンキ) 及び O<sub>2</sub> モニターを使用し、ガスバリア性パウチ袋にて O<sub>2</sub> 1%、CO<sub>2</sub> 5%、37 °C の条件下で培養した低酸素培養 (Hypoxia : Hypo) したもの、低酸素培養後、24 時間または 48 時間で通常培養したものを再酸素化(Reoxygenation : Reoxy)として実験を行った。

(2) 培養終了後、RNA およびタンパク質を回収した。再酸素化実験では、24 時間低酸素培養後に通常培養を 24 時間または 48 時間それぞれ培養し、RNA およびタンパク質を回収した。血管新生に関わる Angiogenin (ANG)・vascular endothelial growth factor (VEGF)、細胞増殖に関わる cAMP responsive element binding protein (CREB)・SET domain-containing protein 8 (SETD8) を解析対象とした。

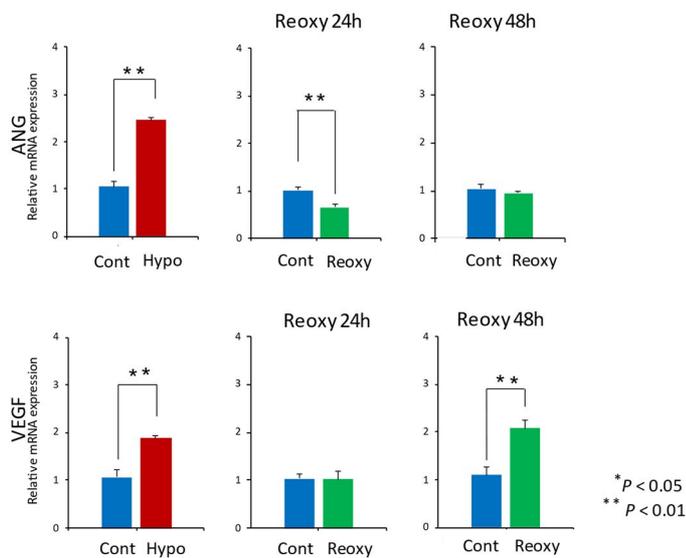
### 4. 研究成果

#### (1) 低酸素培養での RT-qPCR 結果

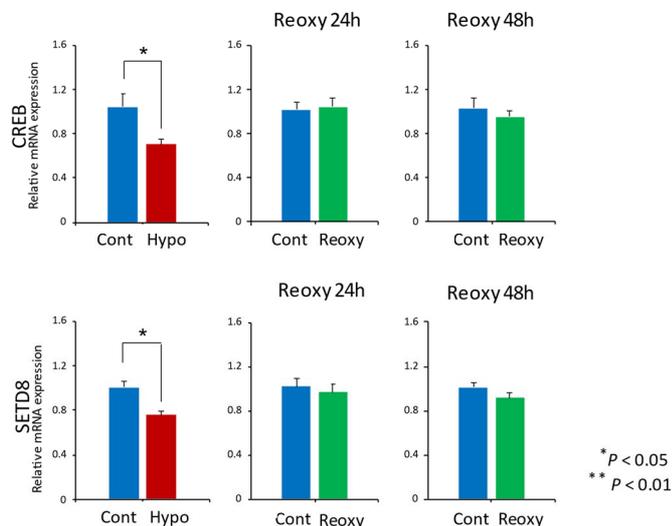
ANG では 24 時間低酸素化により有意に mRNA の発現上昇を認め、その後の 24 時間再酸素化で減少後、48 時間再酸素化で通常培養と同じ発現量になった(図 1)。

VEGF では 24 時間低酸素化により有意に mRNA の発現上昇を認め、その後の 24 時間再酸素化でいったん通常培養と同等の発現量になり 48 時間再酸素化で再び発現の上昇を認めた(図 1)。

CREB および SETD8 は共に 24 時間低酸素化で有意に減少を認め、その後の再酸素化では Cont と変化は認めなかった(図 2)。



( 図 1 )



( 図 2 )

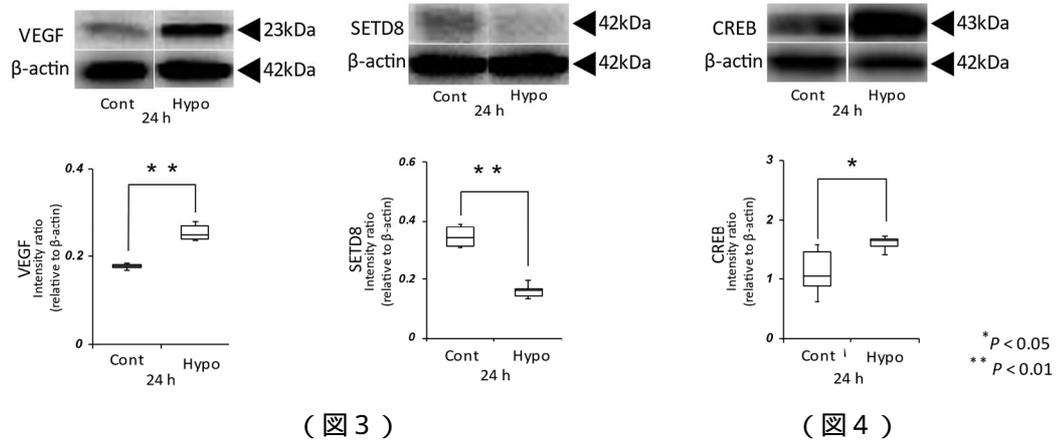
## ( 2 ) 低酸素化培養での Western blotting 結果

VEGF、SETD8 では mRNA と同様に 24 時間低酸素化でタンパク質の発現上昇を認めた ( 図 3 )。

CREB は mRNA の発現とは逆に、低酸素化でタンパク質の上昇を認めた ( 図 4 )。

低酸素環境では低酸素誘導因子 ( HIF-1 ) が発現し、プロリン残基水酸化酵素があまり活性化されず分解が起こりにくいため HIF-1 タンパクが安定する。

HIF-1 の安定化により直接下流遺伝子の発現が調節されるのか、あるいは未知の因子の活性を介して調節されているのかは明確でない。次に 4 つの調節因子が HIF-1 に関与しているか検討を行った。

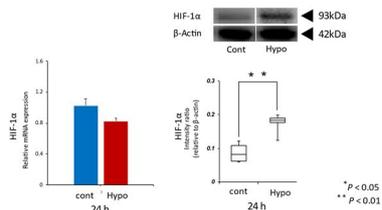


( 図 3 )

( 図 4 )

( 3 ) 低酸素下における HIF-1 mRNA 及びタンパク発現の違い

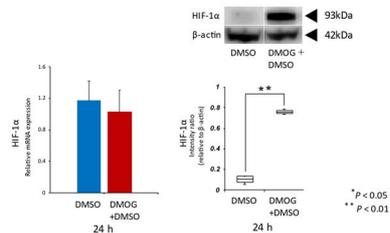
24 時間低酸素化では、HIF-1 の mRNA に変化は認めなかったが、タンパク質では HIF-1 の安定化を認めた ( 図 5 )。



( 図 5 )

( 4 ) DMOG 処理が HIF-1 mRNA 及びタンパク発現に及ぼす影響

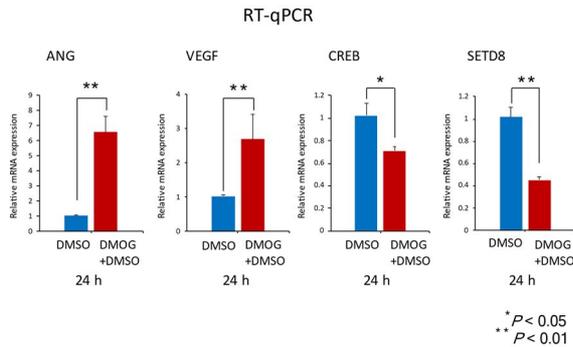
24 時間 DMOG を処理した場合、HIF-1 の mRNA では変化を認めなかったがタンパク質で安定化を認めた ( 図 6 )。



( 図 6 )

( 5 ) 24 時間 DMOG 処理後の mRNA 発現への変化

24 時間 DMOG 処理後の mRNA では、ANG・VEGF は上昇し、CREB・SETD8 は減少し、低酸素実験と同様な mRNA 変化になった (図 7)。



(図 7)

### 成果のまとめ

SH9 に対する 24 時間の低酸素曝露により、ANG 及び VEGF の mRNA 遺伝子は増加した。再酸素化 24 時間後の ANG の発現量は Cont と比較し減少し、さらに 48 時間後には Cont と有意差がない発現量となった。再酸素化 24 時間後の VEGF の発現量は Cont と有意差がなく、さらに 48 時間後には Cont と比較し増加した。24 時間の低酸素曝露により CREB 及び SETD8 の mRNA 遺伝子は減少を認め再酸素化 24 時間および 48 時間後に変化はなかったが、CREB タンパク質の発現は再酸素化 24 時間後に増加した。通常培養下にて SH9 に DMOG 処理を行った場合 mRNA の発現は、ANG 及び VEGF は増加し、CREB 及び SETD8 は減少した。以上のことから低酸素下での ANG、VEGF の発現量上昇や CREB、SETD8 の発現の減少は低酸素誘導因子である HIF-1 を介している可能性が示唆された。

### 【引用文献】

1. Effect of hypoxia on the expression of CCAAT/enhancer-binding protein and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand in periodontal ligament cells. Ito H, Kifune T, Ishiyama M, Iwasa S, Takei H, Hasegawa T, Asano M, Shirakawa T. Journal of Oral Science, 60:544-551 (2018)
- 2.4. A CREB-C/EBP cascade induces M2 macrophage specific gene expression and promotes muscle injury repair. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, Nerlov C. PNAS, 106:17475-17480 (2009)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷賢知 石山未紗 星まなみ 白川哲夫 菊入崇
2. 発表標題 株化ヒト歯根膜細胞の低酸素曝露とその後の酸素化が遺伝子発現に及ぼす影響について
3. 学会等名 第75回日本大学歯学会
4. 発表年 2023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
---------	---------