

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592232
 研究課題名（和文） 炎症による低酸素関連遺伝子・時計遺伝子 DEC のシグナル伝達の解析
 研究課題名（英文） Signaling pathway analysis of hypoxia-related gene and clock gene DEC in gingival inflammation
 研究代表者
 伊藤 由美（ITO YUMI）
 鶴見大学・歯学部・講師
 研究者番号：00176372

研究成果の概要（和文）：本研究は、口腔内の炎症進展機構に関連した低酸素関連遺伝子ならびに時計遺伝子 DEC の変化を明らかにし、両者の関連性を解明することを目的とする。実際には患者から採取した歯肉上皮細胞・線維芽細胞に炎症性サイトカインを添加し、DEC の発現を解析する。また、炎症性サイトカインがどのシグナル伝達経路（NF- κ B、COX-2、及び PI-3-K-Akt）を介して DEC に影響するのかを明らかにする。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to examine the expression of hypoxia responsive gene and clock gene DEC1 in gingival inflammation. We demonstrate that the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) up-regulated DEC1 and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein and elevated the HIF-1 α -responsive gene vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human primary gingival cells. Furthermore, we clarify the signaling pathways (NF-kB, COX-2, and PI-3K-Akt) involved in the regulation of IL-1 β -mediated DEC1 protein expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,020,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：炎症、低酸素関連遺伝子、時計遺伝子、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

生体の様々な生理機能には 24 時間の日内リズム(概日リズム)が存在し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。近年、これらの概日リズムの発振機構が分子レベルで

解明され、その本態はほぼすべての細胞の細胞内に存在する時計遺伝子の転写・翻訳フィードバックループ（体内時計）であることが明らかとなった。またこの体内時計の障害は、悪性腫瘍、糖尿病など、様々な病態と密接に

関連していることも証明されてきた。

申請者らは、これまでに（１）慢性歯肉炎、慢性歯周炎、慢性潰瘍の組織では、正常歯肉に比し低酸素に関連する遺伝子である

HIF-1 α 、DEC1、DEC2のタンパク発現量が増加しており、HIF-1 α とDECの発現量には相関を認めること、（２）ヒト歯肉線維芽細胞および上皮細胞を炎症性サイトカインであるIL-1 β で刺激すると、DECに概日リズムを認めること（現在、論文投稿中）、（３）DEC2は体内時計のコア遺伝子であるBMALタンパク質およびその結合領域であるE-box配列（CACGTG）と直接結合し、時計遺伝子の発現を抑えること（Fujimoto K, Sato F, Bhawal UK et al. Int J Mol Med 19: 925-932; 2007）を明らかにした。したがって、DECは口腔内の炎症時に概日リズムを制御し、炎症の進展や治癒に影響を与えている可能性がある。

近年、歯周病は、糖尿病と同様に動脈硬化性疾患など全身性疾患のリスクファクターであることが明らかになっており、その関連性が非常に注目されている。糖尿病では様々な末梢組織の時計遺伝子発現が障害されていることが知られており、これが動脈硬化を始めとする血管病変や神経障害を進行させる一因となっていることが示唆される。口腔領域は、最も外的侵襲を受けやすい環境のため、様々な生理機能の概日リズムが攪乱されることにより、歯周炎が増悪して悪循環をまねき、全身の炎症へと波及することが推測される。

2. 研究の目的

本研究は、口腔内の炎症進展機構に関連した低酸素関連遺伝子ならびに時計遺伝子DECの変化を明らかにし、両者の関連性を解明することを第一の目的とする。具体的には、患者から採取した歯肉上皮細胞・線維芽細胞に

炎症性サイトカインを添加し、DECの発現を解析する。また、炎症性サイトカインがどのシグナル伝達経路（NF- κ B、COX-2、及びPI-3-K-Akt）を介してDECに影響するのかを明らかにする。さらに、歯周病と糖尿病罹患者の口腔内組織におけるDECの影響をそれぞれ解析し、共通する病態（治療標的）を見出すことを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炎症性サイトカインがDEC発現に及ぼす影響の解析

概日リズム下で発現している時計遺伝子に対し、炎症性サイトカイン（IL-1 β 、IL-6、TNF- α ）がどのように影響を及ぼすかを解析する。抜歯時に歯牙に付着している歯肉から上皮細胞と線維芽細胞を分離し培養する。これらの細胞と上皮細胞株に炎症性サイトカインを添加し、低酸素下で培養を行う。経時的（0,1,3,6,12,24時間）に培養細胞からmRNAとタンパク質を回収し、リアルタイムPCRとウェスタン・ブロット法を用いてそれぞれDECのリズム発現の変動を解析する。

(2) 炎症シグナル伝達の解析

炎症のシグナル伝達を解析するために、培養細胞にNF- κ B、COX-2、PI3-K-Aktのインヒビターを添加する。各分子の発現はリアルタイムPCR、ウェスタン・ブロット法、ELISA法を用いて解析する。

(3) 患者の病理組織標本を用いて免疫染色を行い、DECの発現を確認する。

患者から得た正常歯肉、慢性歯肉炎、慢性歯周炎、慢性潰瘍の病理組織検体に免疫染色を施し、DECの発現を検討する。またその臨床病理学的パラメーターとの関連を検索し、ヒトにおいて炎症マーカーとなるかを評価する。

(4) 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*

に感染したマウスを用いて、DEC の発現を確認する。

歯周病は、偏性嫌気性グラム陰性桿菌である *P. gingivalis* をはじめとする歯周病原細菌が歯肉縁下プラークで優勢となり、歯周組織破壊を引き起こす疾患であるが、その発症・進行のメカニズムは複雑でいまだに不明な点が多い。我々は、低酸素関連遺伝子の発現が歯周病の進行に関連することを報告した。しかし、歯周病の進展を評価する動物実験系が確立されていないことから、根本的な解明には至っていないと言える。そこで、*P. gingivalis* 生菌をラット口腔内に直接接種して動物実験モデルを作製し、低酸素関連遺伝子の歯周病への影響について検討する。口腔内への *P. gingivalis* の定着は PCR 法にてプラークサンプルにより検証し、*P. gingivalis* の定着を確認後、経時的 (1, 2, 3 週間後) に歯肉組織を採取し、病理学的並びに分子生物学的に DEC の発現を検討する。

(5) 糖尿病患者における DEC の発現の解析
歯科治療を行う糖尿病患者からも正常歯肉、慢性歯肉炎、慢性歯周炎、慢性潰瘍の組織を得て、同様に DEC 発現量を解析する。糖尿病患者では、しばしば歯周病を合併するため、健常人、歯周病患者、歯周病のない糖尿病患者、歯周病のある糖尿病患者の DEC 発現を比較することにより、それぞれの病態に特有の影響と両者に共通の影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 炎症性サイトカインが DEC 発現に及ぼす影響を解析では、ヒト歯肉より樹立した歯肉線維芽細胞および上皮細胞を用いて、IL-1 β を作用させ、低酸素に関連する遺伝子 (CA9, ADM, VEGF, PGK1, DEC1, DEC2) の mRNA 発現量にどのような影響を示すかを調べるために経時的に観察した結果、IL-1 β は DEC1

および HIF-1 α を制御し HIF-1 α 反応性の VEGF の発現を上昇させることを明らかにした。また実際の組織を用いた解析においては、慢性歯肉炎、慢性歯周炎、慢性潰瘍等の炎症病態では、正常歯肉に比し HIF-1 α 、DEC1、DEC2 のタンパク発現量が増加しており、HIF-1 α と DEC の発現量には相関を認めることを確認した。さらに実際に組織切片を用いて免疫染色を行ったところ、同様の結果を得た。

(2) 炎症におけるシグナル伝達を解析するために、培養細胞に NF- κ B、COX-2、PI-3K-Akt のインヒビターを添加し、各分子の発現はリアルタイム PCR、ウエスタン・ブロット法、ELISA 法を用いて解析した結果、IL-1 β が Akt を含む古典的な炎症のシグナル伝達の DEC1 や HIF-1 α を制御していることが明らかとなり、PI-3K-Akt シグナルは IL-1 β が媒介する DEC1、HIF-1 α の誘導の中の上流領域にあることが強く示唆された。このことは以下による。

① IL-1 β は Akt の 473 セリンのリン酸化を引き起こす。② IL-1 β 媒介性の Akt 活性化は、PI-3K 依存性に生じ、PI-3K の制御により Akt のリン酸化は抑制される。③ Akt の抑制は IL-1 β 媒介性の DEC1、HIF-1 α 誘導を抑制する。

(3) 糖尿病患者における DEC の発現の解析においては現在解析中である。

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 14 件)

- ① Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK, Kurihara M, Kirita T, Kuniyasu H, Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral

- squamous cell carcinoma, *Clinical Experimental Metastasis*, 査読有, 30(2), 2013, 165-176
- ② Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Ohmori H, Fujii K, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H, Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma, *Human Pathology*, 査読有, S0046-8177(12), 2013, 00360-00367
- ③ Kuboyama N, Kiba H, Arai K, Uchida R, Tanimoto Y, Bhawal UK, Abiko Y, Miyamoto S, Knight D, Asakura T, Nishiyama N, Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration, *Journal of Biomedical Material Research B Appl Biomaterial*, 査読有, 101(2), 2013, 295-302
- ④ Bhawal UK, Ito Y, Tanimoto K, Sato F, Fujimoto K, Kawamoto T, Sasahira T, Hamada N, Kuniyasu H, Arakawa H, Kato Y, Abiko Y, IL-1 β -mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway, *Journal of Cellular Biochemistry*, 査読有, 113(10), 2012, 3246-3253
- ⑤ Wu Y, Sato F, Yamada T, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Hakamada K, Abiko Y, Kato Y, Kijima H, The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer, *International Journal of Oncology*, 査読有, 41(4), 2012, 1337-1346
- ⑥ Sato F, Kawamura H, Wu Y, Sato H, Jin D, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H, The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- β -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells, *International Journal of Molecular Medicine*, 査読有, 30(3), 2012, 495-501
- ⑦ Ikuta T, Bhawal UK, Tsushima K, Aoki A, Kuboyama N, Abiko Y, Identification by DNA microarray of genes involved in *Candida albicans*-treated gingival epithelial cells, *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 査読有, 41(10), 2012, 769-778
- ⑧ Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Ueda N, Shimomoto T, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H, Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer, 査読有, 107(4), 2012, 700-706
- ⑨ Sato F, Sato H, Jin D, Bhawal UK, Wu Y, Noshiro M, Kawamoto T, Fujimoto K, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H, Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver, *Biochemical Biophysics Research Communication*, 査読有, 419(2), 2012, 441- 446
- ⑩ Ito Y, Bhawal UK, Sasahira T, Toyama T, Sato T, Matsuda D, Nishikiori H, Kobayashi M, Sugiyama M, Hamada N, Arakawa H, Kuniyasu H, Involvement of HMGB1 and RAGE in IL-1 β -induced gingival inflammation, *Archives of Oral Biology*, 査読有, 57(1), 2012, 73-80
- ⑪ Bhawal UK, Sato F, Arakawa Y, Fujimoto K, Kawamoto T, Tanimoto K, Ito Y, Sasahira T, Sakurai T, Kobayashi M, Kashima I, Kijima H, Kuniyasu H, Abiko Y, Kato Y, Sato S, *Journal of Pathology*, 査読有, 224 (3) , 2011, 420-429

- ⑫ Sato F, Wu Y, Bhawal UK, Liu Y, Imaizumi T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H, PERIOD1 (PER1) has anti- apoptotic effects, and PER3 has pro- apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer CA9- 22 cells, European Journal of Cancer, 査読有, 47(11), 2011, 1747- 1758
- ⑬ Wu Y, Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Morohashi S, Kato Y, Kijima H, Basic helix- loop- helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel- induced apoptotic pathway of MCF- 7 human breast cancer cells, International Journal of Molecular Medicine, 査読有, 27(4), 2011, 491- 495
- ⑭ Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK, Kubota E, Abiko Y, Transcriptome analysis of β - TCP implanted in dog mandible, Bone, 査読有, 48(4), 2011, 864- 877

〔学会発表〕 (計 18 件)

- ① Ujjal K. Bhawal, Yoshimitsu Abiko, Transcription factor DEC1 and Epithelial-Mesenchymal Transition, 2013.03, Seattle, Washington, USA
- ② Ujjal K. Bhawal, Yoshimitsu Abiko, Molecular mechanism of transcription factors DEC1 and DEC2 in cancer, 日本分子生物学会, 2012.12, 福岡
- ③ Ujjal K. Bhawal, Yoshimitsu Abiko, Molecular mechanism of transcription factors DEC1 and DEC2 in tumor, IADR. 2012.11, Seoul, Korea
- ④ Ujjal K. Bhawal, Yoshimitsu Abiko, IL-1 β -mediated up-regulation of DEC1 in gingiva cells via Akt pathway, アメリカ歯周病学会共催日本歯周病学会, 2012.09, LA, USA
- ⑤ Ujjal K. Bhawal, Yumi Ito, Tomonori Sasahira, Hiroki Kuniyasu, Yoshimitsu Abiko, Smad3 shows circadian expression in human gingival fibroblasts and human mesenchymal stem cells, 日本癌学会学術総会, 2012.09, 札幌
- ⑥ Tomonori Sasahira, Ujjal K. Bhawal, Miyako Kurihara, Nobuhiro Ueda, Kazuhiko Yamamoto, Tadaaki Kirita, Hiroki Kuniyasu, Expression of TANGO in oral cancer, 日本癌学会学術総会, 2012.09, 札幌
- ⑦ UK. Bhawal, Dawei He, N Hamada, N Kuboyama, Y Abiko, H Arakawa, Micromolar level NaF promotes epithelial cell growth and reduces Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss, FDI Annual World Dental Congress, 2012.08, Hong Kong, China
- ⑧ Ujjal K. Bhawal, Yoshimitsu Abiko, Functional analysis of transcription factors DEC1 and DEC2 in tumor, 国際歯科研究学会議(IADR), 2012.06, イグアスフォーラムズ、ブラジル
- ⑨ UK. Bhawal, Dawei He, Y Arakawa, H Arakawa, Y Abiko, Identification by DNA microarray of genes involved in micromolar level NaF-treated epithelial cells, 日本口腔衛生学会総会, 2012.05, 横須賀
- ⑩ Dawei He, UK. Bhawal, Y Arakawa, Y Abiko, H Arakawa, Micromolar Fluoride Reduces Alveolar Bone Loss in Experimental Rat Periodontitis, 日本口腔衛生学会総会, 2012.05, 横須賀
- ⑪ パワー ウジャール, 伊藤由美, 安孫子宜光, 口腔扁平上皮癌における CXCL14 のエピジェネティック機構

を介した遺伝子発現制御, 日本病理学会
総会, 2012.04, 東京

- ⑫ Sato F, Wu Y, Bhawal UK, Kato Y, Kijima H, Functional analysis of BHLH transcription factor DEC1 and DEC2 in tumor, 日本分子生物学会年会, 2011.12, 横浜
- ⑬ Bhawal UK, Sato F, Sasahira T, Ito Y, Kuniyasu H, Kijima H, Abiko Y, Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC1 regulates CyclinD1 expression through E-box element, 日本癌学会学術総会, 2011. 10, 名古屋
- ⑭ Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H, Functional analysis of miR-126 in oral cancer, 日本癌学会学術総会, 2011. 10, 名古屋
- ⑮ Fujii K, Luo Y, Bhawal UK, Yoshikawa M, Maruyama H, Chihara Y, Kuniyasu H, Anti-angiotensin and hypoglycemic treatments suppress liver metastasis of colon cancer cells, 日本癌学会学術総会, 2011. 10, 名古屋
- ⑯ Bhawal UK, 伊藤由美, 安孫子宜光, ヒト口腔扁平上皮癌におけるPERIOD (PER1) と PER3の発現, 歯科基礎医学会, 2011.10, 岐阜
- ⑰ Bhawal UK, 伊藤由美, 安孫子宜光, 炎症におけるDEC1とDEC2の役割, 歯科基礎医学会, 2011.10, 岐阜
- ⑱ Ujjal K. Bhawal, Katsumasa Tsushima, Tonami Ikuta, Yoshimitsu Abiko, ヒト口腔扁平上皮癌におけるPERIOD (PER1) と PER3の発現, 国際歯科研究学会日本部会総会(IADR), 2011.10, 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 由美 (ITO YUMI)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：00176372

(2) 研究分担者

バワール ウジャール (Bhawal Ujjal)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号：50433339

(3) 連携研究者

なし