



Title	歯根膜におけるPLAP-1による低酸素応答の制御
Author(s)	山本, 智美
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56146
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (山本 智美)

論文題名

歯根膜におけるPLAP-1による低酸素応答の制御

論文内容の要旨

【研究目的】

歯根膜は歯を歯槽窩に保持し、軟組織の性質を維持しながら咬合力や矯正力といったメカニカルストレスを緩衝する一方で、組織再生に必須である未分化間葉系幹細胞の供給源として歯周組織の恒常性維持にとって非常に重要な役割を担う。解剖学的には、歯槽骨とセメント質の二つの硬組織の間に介在する血流の豊富な軟組織であることから、同組織にメカニカルストレスがかかった際や炎症が惹起された際には、酸素供給の低下あるいは酸素需要の亢進が発生し、容易に低酸素状態に陥るのではないかと推察される。

一般に、低酸素状態が生じている組織では、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF) の活性化を介して様々な低酸素応答が誘導されることにより、生体の恒常性が維持されるのみならず、各種疾患の病態形成にも関与していることが明らかとなっている。HIFのアイソフォームの一つであるHIF-1は、酸素濃度だけでなくTGF- β やIL-1などのサイトカイン、オステオポンチンやペリオスチン等の細胞外基質タンパクの働きによってもその活性が制御されていることが報告されており、HIF-1による低酸素応答は組織特異的かつ状況に応じた緻密な制御を受けていることが推察される。

一方、歯根膜に高発現している細胞外基質タンパクPLAP-1 (Periodontal Ligament Associated Protein-1) はTGF- β 、BMP-2、FGF-2といったサイトカインの機能を調節する一方、TLR2、TLR4の活性化を抑制するなど、歯根膜細胞の分化や炎症反応等を制御することにより、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たす多彩な機能を持つ分子である。しかしながら、同分子の発現制御に関する分子メカニズムは未だ十分に解明されておらず、歯根膜の低酸素応答における同分子の役割については、これまで全く報告がない。そこで本研究では、ヒト歯根膜細胞を用いて低酸素状態におけるPLAP-1分子の発現制御メカニズムについて明らかにするとともに、同分子が低酸素応答を如何に制御するのかを明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

ドナーの異なる3種のヒト歯根膜細胞 (HPDL1~3) を酸素分圧の調整が可能であるO₂-CO₂インキュベーターを用いて、1%酸素濃度下で培養し、PLAP-1遺伝子の発現をReal-Time PCR法にて解析した。さらにHPDL1~3に加えて、歯肉線維芽細胞、骨髄由来幹細胞、脂肪組織由来幹細胞におけるPLAP-1の発現に関しても同様に解析を行った。次にHPDL1~3のうち最もPLAP-1の発現変化率が高かったHPDL1 (以下HPDL1をHPDLと記す) を用いて培養上清中のPLAP-1のタンパク量をWestern blotting法により検討した。さらにPLAP-1と同じsmall leucine rich repeat proteoglycan (SLRP) familyに属するBiglycan、Decorinの発現に関しても解析を加えた。なお、HPDLにおける低酸素応答の誘導は、HIF-1 α のタンパク発現をWestern blotting法により検討することにより検証した。

また、PLAP-1遺伝子上流にHIF-1との結合領域Hypoxia Response Elements (HREs) が二つ存在したため、各々のHRE配列含む領域を特異的に増幅するよう設計したプライマーを作成した。1%酸素濃度下で培養したHPDLよりDNA断片を調整後、抗HIF-1 α 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法にて得たDNAを鋳型として上記プライマーを用いてReal-time PCR法による解析を行った。

次に、HPDLにおける低酸素下でのPLAP-1の発現変化に対し、HIF-1 α が関与するか否かについて検討を行うため、HIF-1 α 分解阻害薬Deferoxamine (DFO) あるいはHIF-1転写活性阻害薬chetomin存在下にてHPDLを培養し、上記方法と同様にPLAP-1の発現を解析した。

さらに、歯根膜の低酸素応答におけるPLAP-1の機能に関して検討するため、siRNA導入によりPLAP-1抑制HPDL (si PLAP-1) を作製した。コントロールとしてnegative control 配列を導入したHPDL (si control) を用いた。si PLAP-1を1%酸素濃度下で2時間培養した際のHIF-1 α のタンパク発現をWestern blotting法にて検討するとともに、核タンパクを抽出しTrans AM kit® (DNA結合ELISA) を用いてHIF-1とHREとの結合量を解析した。さらに、si PLAP-1における

機能回復実験を行った。すなわち、HPDLを通常酸素濃度下で3日間培養し、培養上清を回収した後Amicon Ultra®を用いて濃縮し、si PLAP-1に添加することにより、PLAP-1抑制により生じた変化が回復するか否かに関して検討を行った。

次に、これまでにPLAP-1が機能を制御することが明らかとなっているサイトカインの低酸素下における発現に関してELISA法による検討を行い、発現に変化が認められたTGF- β がPLAP-1によるHIF-1 α の発現制御機構に関与しているか否かについて検討した。まず、HPDLを1%酸素濃度下でTGF- β の中和抗体存在下にて培養し、Western blotting法にて低酸素下でのHIF-1 α の発現変化にTGF- β が関与していることを確認した。そしてsi PLAP-1をTGF- β の中和抗体存在下にて培養し、HIF-1 α の発現についてWestern blotting法にて検討した。さらに、低酸素下におけるPLAP-1によるHIF-1 α の発現制御の分子機序を明らかにするために、HIF-1 α の分解に作用する水酸化酵素であるprolyl hydroxylase (PHD)の発現についてReal-time PCR法にて解析を加えた。

【結果】

HPDLを1%酸素濃度下で培養することにより、HIF-1 α の発現が上昇することを確認した。そこで同条件にてHPDLを培養したところ、PLAP-1発現の有意な上昇を認めるとともに、培養上清におけるPLAP-1の発現も上昇していた。興味深いことに、PLAP-1の発現は実験に使用した3種のHPDLでは全て有意な発現上昇が認められたが、検討した他の間葉系細胞においては低酸素下でのPLAP-1の発現上昇は認められなかった。また、HPDLのBiglycan、Decorin発現はともに低酸素下での培養によって影響を受けなかった。

1%酸素濃度下で培養されたHPDLにおいて、PLAP-1の上流に存在するHREとHIF-1との結合が確認された。一方で、DFO添加によりHIF-1 α タンパクの発現亢進を確認するとともにDFO濃度依存的にPLAP-1の発現が上昇した。また低酸素誘導性のPLAP-1発現の上昇はchetoamin存在下で濃度依存的に有意に抑制された。

si PLAP-1は、si controlに比較し、20%酸素濃度下、1%酸素濃度下両条件においてHIF1Aの発現に変化は生じなかったが、タンパク発現に関しては1%酸素濃度下でのHIF-1 α の発現が亢進するとともに、HIF-1とHREとの結合量も有意に上昇した。このPLAP-1抑制による変化はPLAP-1を多量に含むHPDL培養上清濃縮物をsi PLAP-1に添加することにより、回復した。

HPDLにおいて、低酸素下ではTGF- β の発現が上昇しており、抗TGF- β 中和抗体存在下では、低酸素下で生じるHIF-1 α の発現上昇が一部抑制された。さらにPLAP-1抑制により生じたHIF-1 α の発現上昇は抗体濃度依存的に抑制された。また、si PLAP-1は、si controlに比較しPHD1,3の発現には有意な差を生じなかったが、PHD2の発現は有意に低下していた。

【考察および結論】

本研究結果から、低酸素状態の歯根膜においては、PLAP-1の発現が亢進することが明らかとなった。そして、その細胞内機序の一つとして、低酸素環境下で発現が亢進するHIF-1 α が積極的に関与していることが明らかとなった。さらに、低酸素下で発現誘導されたPLAP-1は低酸素応答を抑制的に制御し、そのメカニズムの一部にTGF- β が関与していることが示唆された。過度な低酸素応答や低酸素応答の長期化は生体の恒常性の破たんや様々な疾患において病態形成に関与することが報告されているが、低酸素下でHIF-1 α 依存的に誘導されるPLAP-1は、HIF-1 α 発現に対してnegative feedback作用を有し、過度な低酸素応答を抑制することで、生体防御的に働いていると考えられる。

歯根膜は、咬合力などのメカニカルストレスに絶えずさらされている組織であるが、過度なメカニカルストレスがかかった際には歯根膜が圧迫、変性するとともに、局所の酸素濃度が低下し、発現上昇したHIF-1 α を介した低酸素応答が生じることが骨性癒着の一因になるのではないかと考えられる。低酸素によって誘導されるPLAP-1は、BMP-2のアンタゴニストとして作用することによりHPDLの硬組織への分化を抑制することに加えて、HIF-1 α の発現を負に制御することにより歯根膜組織の軟組織としての役割を維持し、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たしているのではないかと考察される。歯周病は、原因となる歯周病原性細菌の影響に加えて、喫煙等の環境因子、全身状態、遺伝的素因等の宿主因子等をリスクファクターとする多因子疾患である。さらにこれまでの報告から、歯周病の進行には歯根膜の低酸素応答も関与していると考えられる。そして本研究結果により、歯根膜の低酸素応答にはPLAP-1によるHIF-1 α の制御が関与していることが示唆された。HIF-1 α とPLAP-1の両分子は他の疾患で疾患感受性に影響を与えることが報告されている遺伝子多型が存在しており、歯周病においてもこれら両分子の遺伝子多型が個人の歯周病の罹患リスクに影響を与えている可能性は高いと考える。今後両分子の遺伝子多型に対する解析を行うことで、歯周病の発症前診断、早期治療が可能になることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 本 智 美)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	村上 伸也
	副 査	教 授	野田 健司
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講 師	伊藤 祥作

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜細胞の低酸素応答における PLAP-1 分子の役割に着目し、同分子の低酸素環境下における発現制御について明らかにするとともに、低酸素誘導因子 HIF-1 α の制御に果たす役割について解析したものである。

その結果として、低酸素状態の歯根膜細胞においては、HIF-1 α 依存的に PLAP-1 の発現が亢進することが明らかとなった。さらに低酸素状態により発現誘導された PLAP-1 は HIF-1 α の発現を抑制的に制御し、そのメカニズムに TGF- β が関与していることが明らかとなった。

以上の研究成果は、低酸素応答における PLAP-1 分子の役割の一端を明らかにし、多因子疾患である歯周病の病態を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。