



Title	低酸素状態が歯肉上皮細胞の炎症反応に及ぼす影響
Author(s)	伊山, 舜吉
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59993
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	伊山 舞吉
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 25791 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文名	低酸素状態が歯肉上皮細胞の炎症反応に及ぼす影響
論文審査委員	(主査) 教授 村上 伸也 (副査) 教授 豊澤 悟 教授 西村 理行 准教授 永田 英樹

論文内容の要旨

【研究目的】

生体内における局所酸素濃度は、細胞の様々な生物学的機能の制御に関与していることが知られている。特に、相対的な低酸素状態では、生体が恒常性を維持するために、特有の応答性を示すことが広く知られており、幅広い分野での低酸素応答性の役割が報告されている。さらに近年、炎症反応によって惹起される組織の低酸素状態が、各種炎症性疾患の病態を修飾する可能性が明らかとなっており、そのメカニズムの一つとして低酸素状態にて活性が上昇する転写因子 *hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)* が中心的な役割を担うことが明らかにされている。しかしながら、歯周組織における低酸素部位の局在や、同組織の低酸素状態が歯周病の病態形成に及ぼす影響については十分な知見が得られていない。そこで本研究では、*Porphyromonas gingivalis (P.g.)* を経口感染させたマウス歯周炎モデルを用いて、炎症歯周組織における低酸素部位を明らかにするとともに、低酸素状態が歯肉上皮細胞に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

8週齢雄 C57BL/6 マウスに *P.g.* W83 株(10^9 CFU/匹)を 3 日毎に 10 回経口感染させること

で、歯周病モデルマウスを樹立し、歯槽骨吸収の程度をマイクロ CT (ScanXmate-E090S40 *in vivo*)にて検討した。また、屠殺の 1 時間前に低酸素部位と結合する *pimonidazole* 試薬(60 mg/kg)を腹腔内に投与し、抗 *pimonidazole* 抗体を用いた免疫化学染色法にて各組織の低酸素状態を検討した。次にヒト歯肉上皮細胞株 epi 4、OBA-9、ヒト歯肉上皮細胞 HGEC、さらにヒト歯肉線維芽細胞 HGF を用いて、各細胞の低酸素状態への応答性を *in vitro* にて検討した。まず *pimonidazole* 試薬存在下にて、低酸素インキュベーター内で培養し(0.5~20% 酸素濃度)、FITC 標識された抗 *pimonidazole* 抗体を用いた蛍光免疫染色法にて各細胞株の低酸素状態を検討した。さらに IL-1β 存在、あるいは非存在下にて、同低酸素条件下で各細胞を培養し、4、8 時間後に IL-6、IL-8 の遺伝子発現を Real-time PCR 法、1、2 日後のタンパクの産生量を ELISA 法にて検討した。次に epi 4 における低酸素下での HIF-1α の発現の変化を Western blotting および Trans AM kit® にて検討した。さらに HIF-1α の活性剤である deferoxamine、HIF-1α 阻害剤である chetomin、あるいは HIF-1α の siRNA を用いて、低酸素下での IL-1β 誘導性の IL-6、IL-8 発現の変化における HIF-1α の関与について検討を加えた。加えて、DNA メチル化阻害剤である 5-Azacytidine を用い、同発現変化に対する DNA メチル化の関与についても検討を加えた。

【結果】

P.g. 経口感染歯周病モデルマウスでは、非感染マウスと比較して有意な歯槽骨の吸収を認めた。また、*pimonidazole* の免疫化学染色の結果、歯肉上皮、歯根膜といった歯周組織や歯髓では心臓や腎臓などの組織に比べ、相対的に高い染色性を示した。さらに歯周病モデルマウスの歯肉上皮においては、*pimonidazole* 集積の亢進を認めた。次に *pimonidazole* 存在下にて epi 4、OBA-9、HGF を 5% 酸素濃度、HGEC においては 1% 酸素濃度にて培養した結果、4 時間後に同試薬の集積を認めた。そこで epi 4 を 5% 酸素濃度下で培養し、real-time PCR 法にて 4、8 時間後の IL-1β 誘導性 IL-6、IL-8 の遺伝子発現を検討した結果、低酸素条件下でこれら遺伝子発現が有意に抑制されることが明らかとなった。また 1、2 日後の培養上清中の IL-1β 誘導性 IL-6、IL-8 タンパク量においても、低酸素環境下での有意な産生の抑制が認められた。また、OBA-9 を 5% 酸素濃度、HGEC を 1% 酸素濃度で培養した際にも同様の結果が認められた。しかしながら、HGF の IL-1β 誘導性 IL-6、IL-8 産生においては低酸素条件下での抑制効果は認められなかった。次に epi 4 における HIF-1α の発現を Western blotting を用いて検討した。その結果、5% 酸素濃度での培養により HIF-1α の発現上昇を認め、さらに IL-1β 存在下にてその発現はさらに増強された。また、HIF-1α の DNA 結合活性について Trans AM kit® を用いて検討を加えた結果、5% 酸素濃度にて HIF-1α DNA 結合活性亢進が確認され、さらに IL-1β 添加により、同亢進がさらに増強されることが明らかとなった。そこで deferoxamine を用いて epi 4 を刺激すると、低酸素条件下での培養時と同様に HIF-1α の活性化が確認されるとともに、IL-1β 誘導性 IL-6、IL-8 の遺伝子発現は抑制された。一方で、chetomin、あるいは HIF-1α の siRNA を用いて HIF-1α の阻害実験を行った結果、epi 4 の低酸素環境下での IL-1β 誘導性 IL-6、IL-8 発現の抑制は有意に回復した。また、

5-Azacytidine を用いて同抑制効果について検討を加えたところ、著明な変化は認められなかった。

【結論および考察】

本研究結果から、歯周病の病変部では、歯肉上皮における低酸素状態が亢進し、その結果として歯肉上皮における炎症反応が修飾される可能性が示唆された。そしてその分子機構の一つとして、低酸素下で転写活性が亢進する HIF-1 α が積極的に関与していると考えられる。低酸素状態が亢進することによって、炎症反応が抑制的に制御されること、歯周組織における炎症反応を寛解し、歯肉上皮の機能を維持する上で重要であると考えられる。そのため、この新たな知見は、歯周病の病態形成に対する低酸素応答の関与をよりよく理解する上で、非常に重要な情報となり得るものと考えられる。また、近年、HIF-1 α の Single Nucleotide Polymorphism (SNP)が、糖尿病などの慢性疾患の発症・進行に関連するとの報告がされており、同 SNP と歯周病罹患状態との間にも関連が見出される可能性があるのではないかと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Porphyromonas gingivalis* 経口感染マウス歯周炎モデルを用いて、炎症歯周組織における低酸素部位の解析を試みると共に、低酸素状態が歯肉上皮細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響とそのメカニズムについて解析したものである。

その結果、歯周炎によって歯肉上皮組織が低酸素状態へ誘導されること、歯肉上皮細胞における IL-1 β 誘導性の IL-6、IL-8 産生が低酸素状態では抑制されること、そしてその機序の 1 つとして、低酸素状態で活性の亢進する HIF-1 α が関与していることが明らかとなつた。

以上の研究成果は、炎症歯周組織における低酸素状態が関与する炎症反応制御機構の一端を明らかにし、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）の学位を授与するに値するものと認める。