

Title	低酸素状態が歯周組織構成細胞におけるコラーゲン産生に及ぼす影響
Author(s)	森本, 千晶
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61641
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (森本 千晶)

論文題名

低酸素状態が歯周組織構成細胞におけるコラーゲン産生に及ぼす影響

論文内容の要旨

【研究目的】

解剖学的形態や生理的機能の違いにより、局所酸素濃度は器官や組織ごとに適切に調節されており、同部の恒常性の維持と密接に関与している。しかしながら、創傷治癒過程、メカニカルストレスがかかった際、炎症などの生体反応時、あるいは虚血性疾患や腫瘍、線維症等の病態においては、各組織における局所酸素濃度が定常状態と比較し低下するために低酸素状態となる。低酸素状態に陥ると、酸素供給を増加させるために血管新生の促進等の反応が生じる一方で、酸素消費を減少させるために酸素依存的なミトコンドリアにおけるエネルギー代謝からミトコンドリア非依存性のエネルギー供給への変換や、場合によっては細胞死誘導等の反応が生じる。このような反応を一般に低酸素応答という。

近年、低酸素応答の一つである細胞外基質の産生制御が、生理学的、ときには病態生理学的に重要な役割を果たすことが報告されている。例えば、創傷治癒過程における低酸素環境によって産生誘導された細胞外基質は、細胞遊走の足場として機能するばかりか成長因子の保管庫としての役割も果たし、最終的には組織を修復する構成因子として必須である。一方で、腫瘍の転移や肝臓などにおける線維化の増悪過程においては、低酸素誘導性細胞外基質の産生促進が病態の形成や増悪に関与するとの報告もある。

歯周組織構成細胞を用いた研究から、低酸素応答に中心的な役割を担う転写因子である低酸素誘導因子Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) がvascular endothelial growth factorや炎症性サイトカインの産生制御、さらには歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化の過程において重要な役割を担うことが報告されている。しかしながら、低酸素環境、あるいは同環境によって誘導されるHIF-1 α が歯周組織構成細胞の細胞外基質の産生に及ぼす作用については十分に解明されていない。

そこで本研究では低酸素状態が歯周組織構成細胞の細胞外基質産生に及ぼす影響とその分子機序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】

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) とヒト歯根膜細胞 (HPDL) 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、20%酸素濃度 (通常酸素環境) あるいは1%酸素濃度 (低酸素環境) 下にて培養した。両細胞の低酸素応答の誘導の有無は、HIF-1 α のタンパク発現を指標とし、ウェスタンブロット (WB) 法で検証した。次に、HGFあるいはHPDLを通常酸素環境あるいは低酸素環境で培養した際の培養上清中のI型コラーゲン、フィブロネクチン、パーシカン、デコリン、パイグリカンのタンパク発現をWB法にて解析し、細胞周囲のI型コラーゲン、フィブロネクチンの発現を免疫蛍光細胞染色法にて解析した。さらに培養上清中のプロコラーゲンC末端プロペプチド (PIP) 濃度をELISA法にて定量的に解析した。

次にHIF-1 α がI型コラーゲンの発現に及ぼす影響に関して検討するために、HIF-1のコアクチベーターであるP300/CBPと競合的に作用することで、HIF-1の転写活性を抑制するchetominを用いたHIF-1抑制実験を行った。すなわち、chetomin存在あるいは非存在下でHGFあるいはHPDLを低酸素環境で培養し、培養上清中に含まれるI型プロコラーゲン発現、PIP濃度に加え、細胞周囲のI型コラーゲン発現を解析した。また、HIF-1 α の水酸化を阻害し、通常酸素環境下でHIF-1 α を安定化させるdeferioxamine (DFO) を用いたHIF-1 α 安定化実験を行った。すなわち、DFO存在下あるいは非存在下にてHGFを培養し、I型プロコラーゲン発現、PIP濃度、I型コラーゲンについて解析した。

また、HGFおよびHPDLを培養した際のI型コラーゲンの遺伝子発現 (COL1A1, COL1A2) をリアルタイムPCR法 (qPCR法) にて検討した。さらに、コラーゲン合成に必須であるプロコラーゲン合成水酸化酵素P4HA1~3, PLOD1~3の遺伝子発現をqPCR法にて、タンパク発現をWB法にて検討した。一方で、chetominあるいは

DFOの両試薬を用いてHIF-1が低酸素誘導性P4HA1、PLOD2の発現に及ぼす影響について解析を加えた。

さらに、P4HA1、PLOD2の両水酸化酵素の低酸素誘導性のコラーゲン産生亢進に及ぼす影響について検討するために、P4HA1あるいはPLOD2の発現を抑制したHGFを用いて機能解析した。まず各々のsiRNAをLipofectamine®3000存在下でreverse transfection法にてHGFに導入することによりP4HA1発現を抑制したHGF (si P4HA1)、PLOD2発現を抑制したHGF (si PLOD2)を作製した。なお、コントロールにはnegative control siRNAを導入したHGF (si control) を用いた。まず、各々のsiRNA導入効率について検討するために遺伝子発現をqPCR法にて、タンパク発現をWB法にて解析した。そして、各細胞を通常酸素環境あるいは低酸素環境で培養した際の培養上清中に含まれるI型プロコラーゲン発現、PIP濃度、並びに細胞周囲におけるI型コラーゲンの発現を解析した。

【結果】

HGFおよびHPDLを低酸素環境下で培養することにより、HIF-1 α の発現上昇を確認するとともに培養上清中のI型プロコラーゲンおよびフィブロネクチンの発現上昇が認められ、細胞周囲のI型コラーゲンおよびフィブロネクチンの発現も上昇していることが明らかとなった。また低酸素環境での培養により、HGFおよびHPDLに認められた培養上清中のI型プロコラーゲンの発現上昇、PIPの濃度上昇並びに、細胞周囲におけるI型コラーゲンの発現上昇はchetomin存在下で抑制された。またHGFにおいてDFO刺激によりHIF-1 α のタンパク発現上昇を確認するとともに、培養上清中のI型プロコラーゲン発現上昇、PIP濃度の上昇並びに細胞周囲におけるI型コラーゲンの発現上昇が明らかとなった。

一方で、HGFおよびHPDLのI型コラーゲンの遺伝子発現は低酸素環境での培養により上昇を認めなかったが、プロコラーゲン水酸化酵素であるP4HA1、PLOD2の発現は、低酸素環境での培養で遺伝子レベル、タンパクレベルとともに上昇した。また、両分子の発現上昇はchetomin存在下で抑制された。さらにHGFにおいてDFO添加により両分子の発現は、遺伝子レベル、タンパクレベルともに上昇した。

si P4HA1では、si controlと比較し通常酸素環境、低酸素環境下両条件においてI型コラーゲンの発現が著明に抑制されていることが明らかとなった。一方、si PLOD2は、si controlと比較し通常酸素環境、低酸素環境下両条件において培養上清中のI型プロコラーゲンの発現およびPIP濃度に著明な変化を認めなかったが、I型コラーゲンの免疫蛍光細胞染色法により細胞周囲のI型コラーゲン発現の抑制が認められた。

【結論および考察】

本研究結果から、HGF、HPDLを低酸素下で培養することによりI型コラーゲンとフィブロネクチンの産生が亢進することが明らかとなった。また低酸素環境におけるHIF-1 α 依存性のプロコラーゲン合成水酸化酵素P4HA1、PLOD2の発現上昇がそれぞれI型コラーゲンの産生とI型コラーゲン線維の架橋構造の構築に重要な役割を担うことが示唆された。

本研究にて明らかとなった低酸素環境がコラーゲンの遺伝子発現を上昇させることなく、コラーゲンの水酸化酵素P4HA1、PLOD2の発現を誘導することによってコラーゲンの産生制御に寄与するという機序は、歯周組織の特異性を考える上で大変興味深い。他の組織の細胞を用いた研究では、コラーゲンの遺伝子発現および水酸化酵素の発現を上昇させ、コラーゲン産生を促進するという二段階の制御機構が報告されている。歯周組織はコラーゲンに富む組織であることから、その構成細胞であるHGFやHPDLは、恒常的に比較的多量のコラーゲンを産生しているものと考えられる。過剰なコラーゲンの産生促進は、線維化などの病態形成につながると考えられることから、他の細胞の低酸素応答とは異なり、コラーゲンの遺伝子発現に影響を与えず、水酸化酵素の発現のみを制御することでコラーゲンの過剰産生を抑制しているのではないかと考えられる。

また、本研究にて明らかとなった歯周組織における低酸素応答としての細胞外基質産生は、炎症反応によって惹起された組織破壊に対して生体防御的に働き、病態の進行に対して抵抗するメカニズムとして作用しているものと考えられる。一方で、低酸素誘導性の細胞外基質産生は、場合によっては歯周治療に対する抵抗性や病因論に関連する可能性があるのではないかと考えている。例えば、喫煙者においては、ニコチンの血管収縮作用により歯周組織が恒常的に低酸素状態となりHIF-1 α の発現が誘導されるとの報告がある。この場合、HIF-1 α を介するPLOD2産生促進によりコラーゲンの質が必要以上に強固となり、喫煙者の歯肉が健康な歯肉と比較し固く繊維質であるという特徴を説明する一つのメカニズムになっているのではないかと考えられる。また、薬剤性歯肉増殖症の原因薬剤の一つであるシクロスポリンAがHIF-1 α の発現を誘導するとの報告がある一方で、フェニトインによる歯肉増殖では、コラーゲンの遺伝子発現が減少するとの報告がある。このような薬剤性歯肉増殖症患者の歯肉におけるP4HA1あるいはPLOD2の発現を検討することで、新たな病態のメカニズム解明の手掛かりになるのではないかと期待している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森本 千晶)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	西村 理行
	副 査	准教授	中澤 敬信
	副 査	講師	佐藤 淳
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、ヒト歯肉線維芽細胞およびヒト歯根膜細胞を用いて、低酸素環境がコラーゲン、フィブロネクチン等の細胞外基質の産生に及ぼす影響について検討し、さらに、両細胞における低酸素誘導性のコラーゲン産生亢進について、その分子機序を解析したものである。</p> <p>その結果として、低酸素状態のヒト歯肉線維芽細胞およびヒト歯根膜細胞においては、I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの産生が亢進することが明らかとなった。さらに、低酸素環境は、両細胞に HIF-1αを介してプロコラーゲン水酸化酵素 P4HA1 および PLOD2 の発現を誘導することにより、I 型コラーゲンの産生量とコラーゲン線維の架橋構造の形成を促進的に制御していることが明らかとなった。</p> <p>以上の研究成果は、歯周組織における低酸素応答としての細胞外基質産生制御の一端を明らかにし、歯周病における宿主の生体反応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。</p>			