



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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻

口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

森本 千晶

(指導教員：村上 伸也 教授)

緒言

解剖学的構造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^(1, 2)、メカニカルストレスがかかった際⁽³⁾、炎症^(4, 5)などの生体反応時、あるいは虚血性疾患⁽⁶⁾や腫瘍⁽⁷⁾、線維症⁽⁸⁾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が誘導されることになる。低酸素状態に陥ると、酸素供給を増加させるために **vascular endothelial growth factor** 等の血管誘導因子が産生され⁽⁹⁾、マクロファージや血管内皮細胞の遊走⁽¹⁰⁾が活性化することで血管新生⁽¹¹⁾が誘導される等の反応が生じる。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⁽¹²⁾や、場合によっては細胞死誘導⁽¹³⁾等の反応が生じる。このような局所酸素濃度の低下に対する生体反応を一般に低酸素応答と呼ぶ。

低酸素応答の機序については様々な分子機構が知られているが、低酸素環境下にて発現が上昇する **hypoxia inducible factor**（以下、**HIF** と略す）が中心的な役割を担っている⁽¹⁴⁾。**HIF** は、 α サブユニットと β サブユニットで構成されるヘテロ二量体である。**HIF- β** は酸素濃度に依存せず安定して存在する⁽¹⁵⁾が、 α サブユニットには 1~3 までの 3 つのアイソフォームが存在し、そのうち **HIF-1 α** と **HIF-2 α** は、通常酸素濃度下では水酸化酵素である **prolyl hydroxylase**（以下、**PHD** と略す）による水酸化を受け、ユビキチン **E3** リガーゼである **von Hippel-Lindau** 酵素によってユビキチン化された後、プロテアソームにより分解される⁽¹⁶⁾。この **PHD** による水酸化は酸素を必要とするため、低酸素環境では **PHD** による水酸化が阻害され、**HIF- α** が安定化することになる。安定化した **HIF- α** は **HIF- β** とヘテロ二量体を形成し、核内へ移行し、ターゲット遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー領域に存在する **hypoxia response element** (5'-ACGTG-3'もしくは 5'-GCGTG-3') と結合し、さらに転写共役因子である **p300/CBP** と相互的に作用することによって転写を制御する^(17, 18)。

細胞外基質は、生体組織に機械的強度や柔軟性、可塑性を与え、周囲の細胞が接着する際の足場、組織や器官の形成、維持に重要な役割を担っている。さらに、細胞外基質は細胞膜状に発現するインテグリン等の分子を介してシグナル伝達することで、発生、分化、免疫応答、血液凝固、創傷治癒などの多様な生体反応を制御する。近年、低酸素応答の一つとして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を果たし、最終的には組織を修復する構成因子として必須である。また血管新生の過程においては、血管内皮細胞が低酸素環境下にて血管基底膜の主要な構成分子である IV 型コラーゲンに加え、Thrombospondin や Angiopoietin-like 4 などの **matricellular** タンパクを産生することにより新生血管を安定化させると報告されている⁽¹⁹⁾。一方で、創傷治癒過程における炎症反応が遷延化すると、局所における低酸素環境が持続し、過剰な細胞外基質の産生が誘導された結果、線維症や癒痕化の原因となる⁽²⁰⁾。また、乳がんや肉腫においては、腫瘍中の低酸素環境がコラーゲン産生を活性化するとともに、プロコラーゲン水酸化酵素の一つである **lysyl hydroxylase (PLOD2)** の発現を亢進させることにより腫瘍の硬度を上昇させるのみならず癌細胞の転移を促進させることが明らかになっている^(21, 22)。

一方で、歯周組織における **HIF-1** の役割に関する知見も集積しつつある。ヒトの歯周病病巣の組織切片を免疫染色にて解析した結果から、歯周組織に浸潤したマクロファージに **HIF-1** が強発現していることに加え⁽²³⁾、炎症歯周組織では健康な歯周組織に比べ歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞における **HIF-1** の発現が上昇している⁽²⁴⁾ことが報告されている。また、*in vitro* における解析から、低酸素環境での培養が歯根膜細胞の **IL-1 β** ⁽²⁵⁾や **MMP-2**⁽²⁶⁾の産生を活性化することが報告されている。さらに我々の研究室では、歯肉上皮細胞における **IL-1 β** 誘導性 **IL-6**、**IL-8** の産生が低酸素環境において **HIF-1** 依存性に抑制されることを明らかにした⁽²⁷⁾。このような炎症反応の制御に加え、**HIF-1** は歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化^(28, 29)においても重要な役割も担うことが報告されており、歯周組織の恒常性維持における同分子の関与も示唆されている。興味深いことに、免疫抑制剤シクロスポリン A 服用による歯肉増殖症では、局所の **HIF-1 α** 発現が上昇していること、さらに歯肉線維芽細胞をシクロスポリン A で刺激することにより **HIF-1 α** 依存性に線溶系抑制因子 **PAI-1** の発現が誘導されることが示されており、歯肉増殖症における **HIF-1 α** の細胞外基質の分解制御を介した病態生理学的な関与も示唆されている⁽³⁰⁾。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** 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検討されていない。

本研究では、低酸素環境が歯周組織における細胞外基質の産生に如何なる影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とし、歯肉線維芽細胞および歯根膜細胞を用いて低酸素環境における培養がコラーゲンをはじめとする細胞外基質の発現に及ぼす影響について解析するとともに、その分子機構について解析を行った。

材料および方法

1. 試薬

PHD に作用し、HIF-1 α の水酸化を阻害することにより、HIF-1 α を安定化させる deferoxamine (以下、DFO と略す) (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、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 (Sigma-Aldrich) を実験に供した。

2. 細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞 (以下、HGF と略す) は ScienCell Research Laboratories (Carlsbad、CA、USA) より、ヒト歯根膜細胞 (以下、HPDL と略す) は Lonza (Basel、Switzerland) より入手したものをを用いた。これらの細胞は 10% ウシ胎仔血清 (Equitech-Bio, Inc.、Kerrville、TX、USA、以下 FBS と略す) と 60 μ g/ml カナマイシン (和光純薬工業、大阪、日本) を加えた α -Modification of Eagle's Medium (和光純薬工業、以下 α -MEM と略す) 培地にて 5% CO₂、37°C、湿度 95% の条件下で培養を行った。継代培養の際には 0.05% トリプシン、0.02% EDTA (Life technologies、Carlsbad、CA、USA) 添加のリン酸緩衝液 (和光純薬工業、以下 PBS と略す) で処理し、細胞懸濁液を作製し 100 mm 培養ディッシュ (Corning、NY、USA) に播種した。HGF は継代 9 代から 19 代目まで、HPDL は継代 6 代から 15 代目までの細胞を実験に供した。

なお、低酸素環境での培養は、100 mm 培養ディッシュ、6 穴細胞培養プレート (Corning)、12 穴細胞培養プレートに細胞を播種し、サブコンフルエントまで培養した細胞を 1% 酸素濃度 (以下、低酸素環境) に調整した O₂/CO₂ インキュベーター (Panasonic、大阪、日本) 内で行った。

3. 全細胞画分および核タンパク質の回収

培養細胞を PBS にて 2 回洗浄した後にプロテアーゼインヒビターカクテル錠 (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA)、10 mM フッ化ナトリウム (和光純薬工業)、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich)、10 mM β -グリセロリン酸 (和光純薬工業) を加えた RIPA Lysis Buffer (Merck Millipore、Darmstadt、Germany) を加え、4°C で 20 分間処理した後回収し、さらに遠心 (12000 rpm、4°C、20 分) 後に、上清を回収し全細胞画分を得た。核タンパク質は Nuclear extract kit (ACTIVE MOTIF、Carlsbad、CA、USA) を用いて精製した。いずれのサンプルも、Bradford 法にてタンパク量を算出した後、濃度を同値に調整した。

4. Western blot 法による解析

細胞外基質である I 型コラーゲン、フィブロネクチン、バーシカン、デコリン、バイグリカンの解析には培養上清を、水酸化酵素 P4HA1、PLOD2 の解析には全細胞画分を、HIF-1 α の解析には全細胞画分もしくは核タンパク質を用いた。全細胞画分を解析に用いた際には β -actin を、核タンパクを解析に用いた際には Lamin A をコントロールとした。

得られた培養上清、全細胞画分、核タンパク質を 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業) 含有 Laemmli の 5x サンプルバッファーを用いて 95°C 5 分間熱処理することにより還元し、至適濃度のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて電気泳動を行い、タンパク質溶解画分を展開した。その後、PVDF トランスファーメンブレン (GE Healthcare、Buckinghamshire、UK) にブロッキング装置 (BioRad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用いて、転写した (室温、60 V、3 時間)。メンブレンは 5% スキムミルク (雪印、東京、日本)、0.1% Tween20 (和光純薬工業) を含むトリス緩衝生理食塩水 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム (和光純薬工業)) を用いてブロッキングを行った (室温、1 時間)。一次抗体にはウサギ抗-ヒト I 型コラーゲン抗体 (0.2 μ g/ml ; Abcam、東京、日本)、ラビット抗-ヒトフィブロネクチン抗体 (1 μ g/ml ; Abcam)、ウサギ抗-ヒトバーシカン抗体 (1 μ g/ml ; Abcam)、ウサギ抗-ヒトデコリン抗体 (1 μ g/ml ; Abcam)、マウス抗-ヒトバイグリカン抗体 (2 μ g/ml ; Abcam)、ウサギ抗-ヒト P4HA1 抗体 (1 μ g/ml ; NOVUS BIOLOGICALS、Littleton、USA)、マウス抗-ヒト PLOD2 抗体 (0.5 μ g/ml ; Abnova、Taipei、Taiwan)、ウサギ抗-ヒト HIF-1 α 抗体 (1:1000 ; Cell Signaling、Danvers、MA、USA)、マウス抗-ヒト β -actin 抗体 (0.2 μ g/ml ; Sigma-Aldrich)、ウサギ抗-ヒト Lamin A 抗体 (1 μ g/ml ; Abcam)、を用いて、二次抗体に HRP 標識ヤギ抗-ウサギ IgG 抗体 (1:5000 ; GE Healthcare) あるいは HRP 標識ヒツジ抗-マウス IgG 抗体 (1:10000 ; GE Healthcare) を反応させ、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を用いて発光シグナルを増幅した後、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) にてバンドを検出した。得られた画像を画像解析ソフトウェア WinROOF (三谷商事、福井、日本) に取り込み、バンドの密度を数値化した。また I 型プロコラーゲンのバンドの密度は得られた値を、P4HA1 および PLOD2 のバンドの密度はコントロールである β -actin のバンドの密度の値で除したものを、それぞれ用いて比較した。

5. 免疫蛍光細胞染色法による解析

HGF もしくは HPDL を、12 穴細胞培養プレート内に設置したマイクロカバ

ーガラス（松波硝子、大阪、日本）上に播種し、10%FBS および 60 µg/ml カナマイシン含有の α -MEM でサブコンフルエントまで培養し、1%酸素濃度下にて48 時間培養した。PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液（和光純薬工業）を用いて 15 分、室温にて固定した。PBS で洗浄した後、1.5%ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich）含有 PBS（以下、ブロッキング溶液と略す）で 1 時間、室温にてブロッキングを行った。一次抗体にはウサギ抗-ヒト I 型コラーゲン抗体（20 µg/ml ; NOVUS BIOLOGICALS）、マウス抗-ヒトフィブロネクチン抗体（2.5 µg/ml ; BD biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA）を用い、1 時間、室温にて反応させた。PBS で洗浄した後、二次抗体に Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗-マウス IgG 抗体（4.0 µg/ml ; Life Technologies）、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗-ウサギ IgG 抗体（4.0 µg/ml ; Life Technologies）を用い、30 分、室温にて反応させ、DAPI（Sigma-Aldrich）にて 5 分、室温で核染色を行った。なお、一次抗体および二次抗体は、それぞれブロッキング溶液で希釈した。PBS にて洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI（VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA）を用いて封入した後、蛍光顕微鏡 Nikon ECLIPSE Ti-U（Nikon、東京、日本）あるいは共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8（Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany）を用いて観察した。

6. ELISA 法による解析

培養上清に含まれる I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド（以下、PIP と略す）濃度を ELISA キット（タカラバイオ、大津、日本）を用いて定量的に測定した。吸光度は micro plate reader（BioRad Laboratories）を用いて 450 nm の波長を測定した。

7. 全 RNA の抽出および相補鎖 DNA（以下、cDNA と略す）の作製

培養細胞からの全 RNA 抽出には、核酸抽出試薬 RNA-Bee™（TEL-TEST、Friendwood, TX, USA）を用いた。抽出、精製した全 RNA を鋳型として、Random Hexamer Primer（Amersham Pharmacia Biotech, Milwaukee, WI, USA）、M-MLV（Life technologies）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

8. Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として、表 1 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー（タカラバイオあるいは Gene design、大阪、日本）を用いて行った。PCR 反応は Fast SYBR® Green PCR Master Mix

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、Step One Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems) にて行った。ハウスキーピング遺伝子の一つである *hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (*HPRT*) を内在性コントロール遺伝子として、同遺伝子の発現量に対する相対量として各遺伝子の発現量を算出した。

表 1 本研究で使用した Real-time PCR 用プライマーの一覧

Gene		Primer sequence
<i>CAL1A1</i>	F	5'-CCCGGGTTTCAGAGACAACTTC-3'
	R	5'-TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'
<i>CAL1A2</i>	F	5'-GAGGGCAACAGCAGGTTCACCTTA-3'
	R	5'-TCAGCACCAACCGATGTCCA-3'
<i>P4HA1</i>	F	5'-GCCAAAGCTCTGTACGTCTCCA-3'
	R	5'-TATAGGCCACTTTGCCCAACTCA-3'
<i>P4HA2</i>	F	5'-CCTGGCTCACCTGTGAATG-3'
	R	5'-ATCAGGGCTTTGGCAGCTC-3'
<i>P4HA3</i>	F	5'-AGTATCTGCAGGTGGTGAACCTATGG-3'
	R	5'-TTGGCATAGATGAAGGCTGTGG-3'
<i>PLOD1</i>	F	5'-AGCACTTTGGCCAGTGGTCTC-3'
	R	5'-GCTCAAAGCCGATCTGGTTCA-3'
<i>PLOD2</i>	F	5'-CCCAATTTCATGGACACAGGATAA-3'
	R	5'-ACACCTATTGATACGTTTGGATGGA-3'
<i>PLOD3</i>	F	5'-TGTACTGGTTCCCACTGCTGTC-3'
	R	5'-CACCTGCTTCATGTGGATGTC-3'
<i>HPRT</i>	F	5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3'
	R	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'

9. P4HA1 および PLOD2 siRNA の導入

カナマイシンを含まない 10% FBS 含有 α -MEM を用い、HPDL を 6 穴細胞培養プレートに播種し、2.5 nM Silencer® Select Negative Control siRNA、2.5 nM P4HA1 siRNA (5'-GAUACCAUCUCAAGGGUAtt) (Life technologies)、2.5 nM PLOD2 siRNA (5'-AUAACCACCAGAUUAUACGGct) (Life technologies) を共に Lipofectamine® 3000 (Life technologies) 存在下にて reverse transfection 法にて導入した。播種後 6 時間後に 60 μ g/ml カナマイシン添加 10% FBS 含有 α -MEM に培地交換し、細胞をサブコンフルエントまで培養し、実験に用いた。

10. 統計学的解析

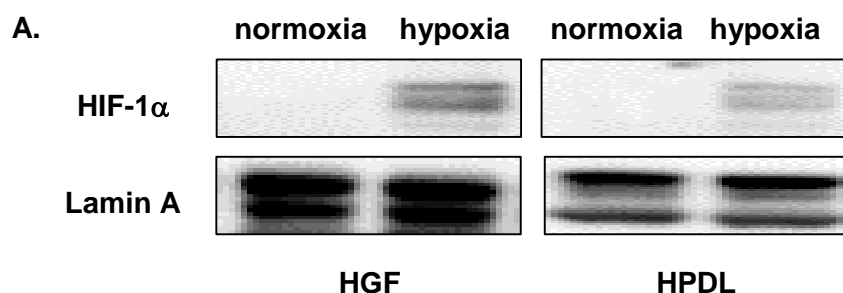
実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析 (ANOVA) を行った後に post-hoc と Tukey 検定を用いて行い、有意水準を 5% に設定し、 p 値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

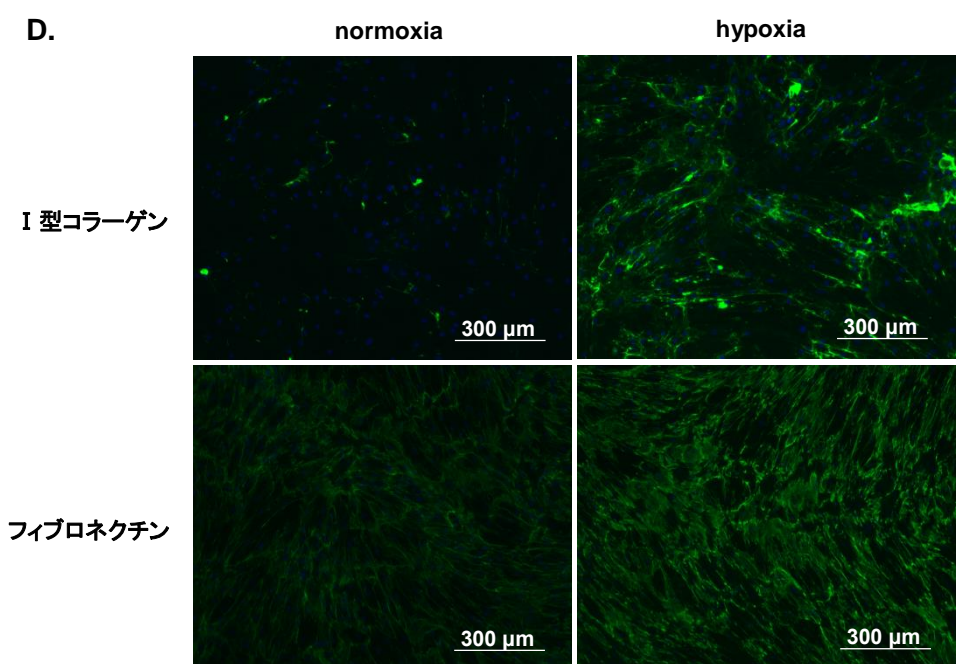
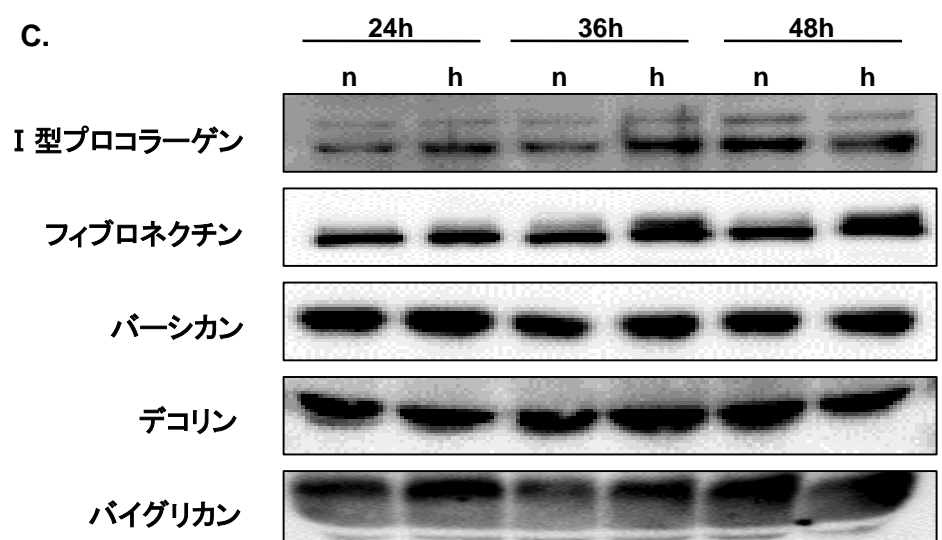
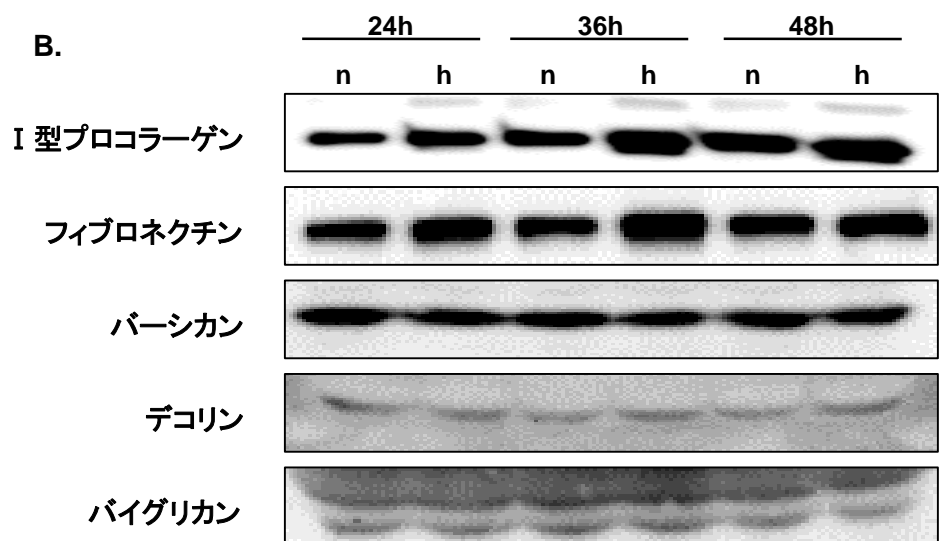
結果

1. HGF、HPDL における低酸素下での細胞外基質の発現に関する検討

まず、HGF、HPDL の低酸素応答性を確認するために、HGF、HPDL 両細胞を低酸素環境下で培養し、HIF-1 α の発現について検討した。その結果、HGF および HPDL において 20%酸素濃度 (以下、通常酸素環境) 下での培養と比較し、低酸素環境下での培養において HIF-1 α の発現上昇を確認した (図 1A)。なお、この条件下において、48 時間培養した際にも細胞死などの細胞毒性を疑うような細胞形態の変化は認めなかった (結果には示さず)。

次に、低酸素状態が HGF、HPDL の培養上清に含まれる細胞外基質の産生に及ぼす影響を検討するために、HGF、HPDL 両細胞をそれぞれ低酸素環境下で培養した際の培養上清に含まれる I 型コラーゲン、フィブロネクチン、バーシカン、バイグリカン、デコリンの各分子を、各々に対する特異抗体を用いて Western blot 法にて検討した。その結果、HGF および HPDL において低酸素環境の培養で培養上清中に含まれる I 型プロコラーゲンおよびフィブロネクチンの発現が 24 時間、36 時間、48 時間いずれにおいても上昇することが明らかとなった (図 1B、C)。そこで、次に I 型コラーゲンおよびフィブロネクチン両分子の細胞周囲における発現が低酸素環境下での培養で影響を受けるか否か確認するために、HGF、HPDL を低酸素環境下で 48 時間培養した際の細胞周囲における I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの発現を、免疫蛍光細胞染色法を用いて検討した。その結果、細胞周囲における I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの発現に関しても、低酸素環境下での培養にて上昇することが明らかとなった (図 1D、E)。





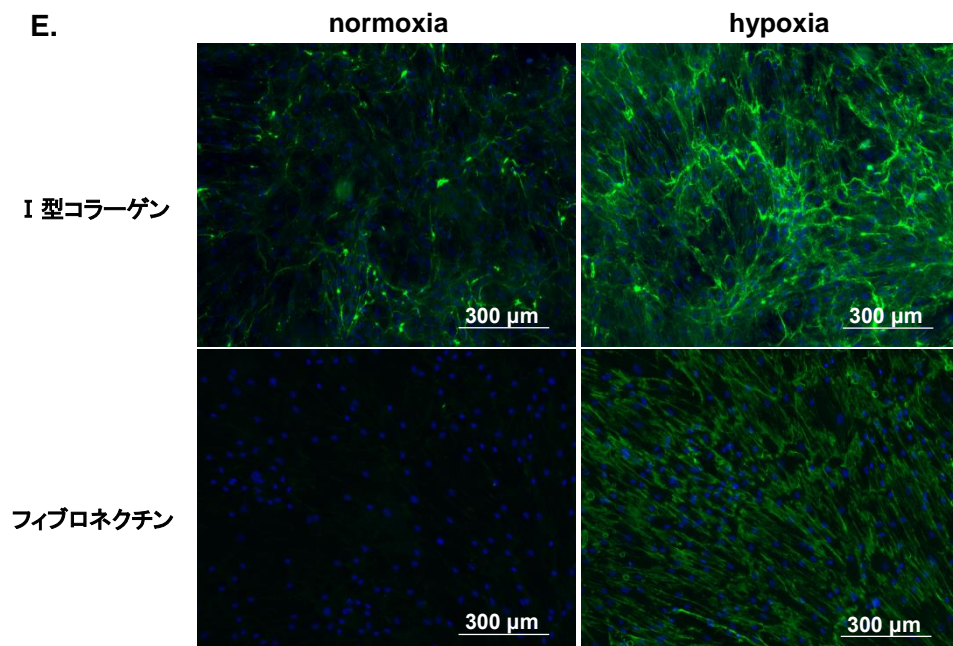


図 1. HGF および HPDL における低酸素環境下での I 型コラーゲン、フィブロネクチンの発現上昇

A. HGF および HPDL を通常酸素環境（normoxia）あるいは低酸素環境（hypoxia）で 3 時間培養した際の核タンパク中の HIF-1 α および Lamin A の発現を示す。

B. HGF を通常酸素環境（n）あるいは低酸素環境（h）で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲン、フィブロネクチン、バーシカン、デコリン、バイグリーカンの発現を示す。

C. HPDL を通常酸素環境（n）あるいは低酸素環境（h）で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲン、フィブロネクチン、バーシカン、デコリン、バイグリーカンの発現を示す。

D. HGF を通常酸素環境（normoxia）あるいは低酸素環境（hypoxia）で 48 時間培養した際の細胞周囲における I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの発現を示す。I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンを Alexa Fluor 488 標識抗体にて検出し、DAPI にて核染色を行った。

E. HPDL を通常酸素環境（normoxia）あるいは低酸素環境（hypoxia）で 48 時間培養した際の細胞周囲における I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの発現を示す。I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンを Alexa Fluor 488 標識抗体にて検出し、DAPI にて核染色を行った。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

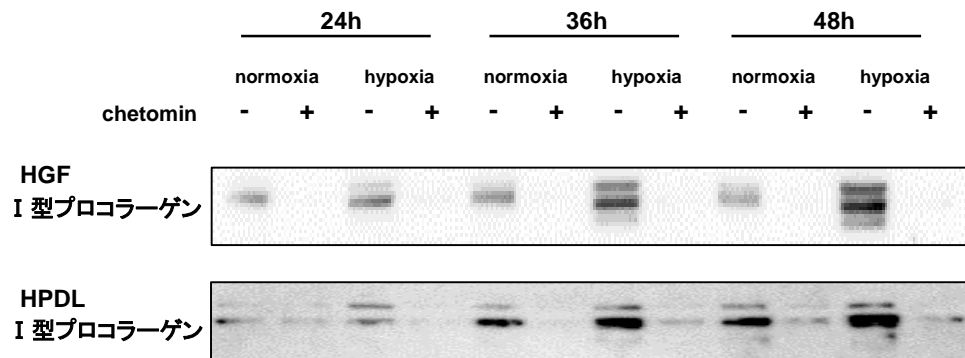
2. HGF および HPDL の低酸素誘導性コラーゲン産生における HIF-1 α の役割に関する検討

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、HGF および HPDL を 300 nM の chetomin 存在あるいは非存在下で培養し、低酸素によって誘導される I 型コラーゲンの発現に及ぼす影響について検討した。その結果、低酸素環境下で培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現上昇は chetomin 存在下で抑制された (図 2A)。

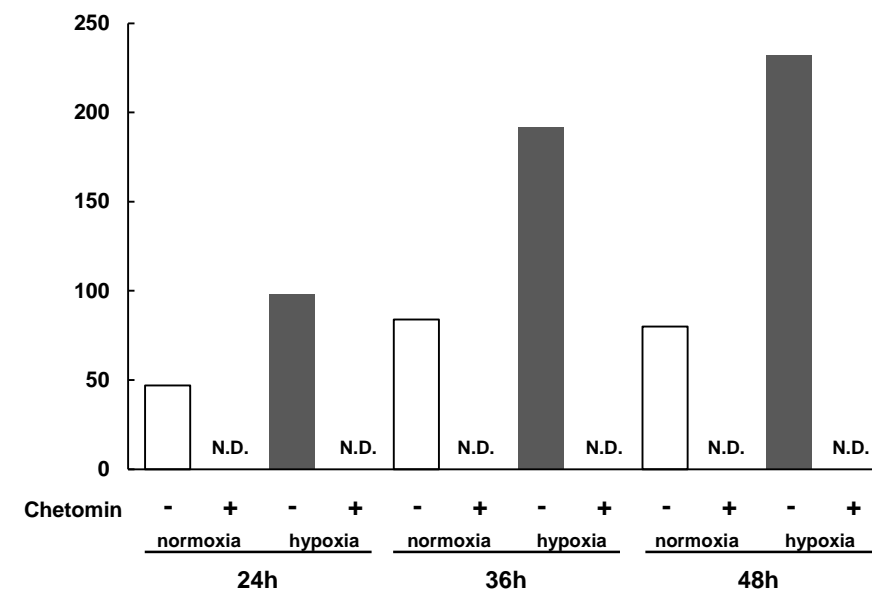
PIP は I 型プロコラーゲンから I 型コラーゲンに生成する際にエンドペプチダーゼによって切断される。そこで培養上清中の PIP 濃度を I 型コラーゲン産生の指標として ELISA 法にて定量的に解析した。その結果、HGF および HPDL を低酸素環境下で培養した際の培養上清中の PIP 濃度は 24 時間、36 時間、48 時間いずれにおいても通常酸素環境下での培養に比べ有意に上昇し、その上昇は chetomin 存在下にて有意に抑制された (図 2B、C)。さらに免疫蛍光細胞染色法による解析から、chetomin 存在下では低酸素にて誘導される HGF の細胞周囲における I 型コラーゲンの発現上昇が抑制された (図 2D)。

次に 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 DFO 存在下で、HGF を培養した際のコラーゲンの産生について解析を加えた。まず、DFO 存在下で 3 時間 HGF を培養した際の HIF-1 α の発現を検討したところ、図 2E に示すように、DFO 添加による HIF-1 α の発現上昇が確認された。そこで DFO 存在、非存在下で HGF を培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現を検討した。Western blot 法にて解析した結果から、DFO 添加 48 時間後に培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現が上昇することが明らかとなった (図 2F)。また、ELISA 法による PIP 濃度の解析結果から、DFO 添加 48 時間後に培養上清中の PIP 濃度がコントロールに比べ有意に上昇することが明らかとなった (図 2G)。さらに同条件で 48 時間培養した際の細胞周囲における I 型コラーゲンの発現を免疫蛍光細胞染色法にて解析した結果、DFO 添加により細胞周囲におけるコラーゲンの発現が上昇することが明らかとなった (図 2H)。以上の結果より、HGF および HPDL において、低酸素環境下で HIF-1 α 依存的にコラーゲン産生が亢進することが明らかとなった。

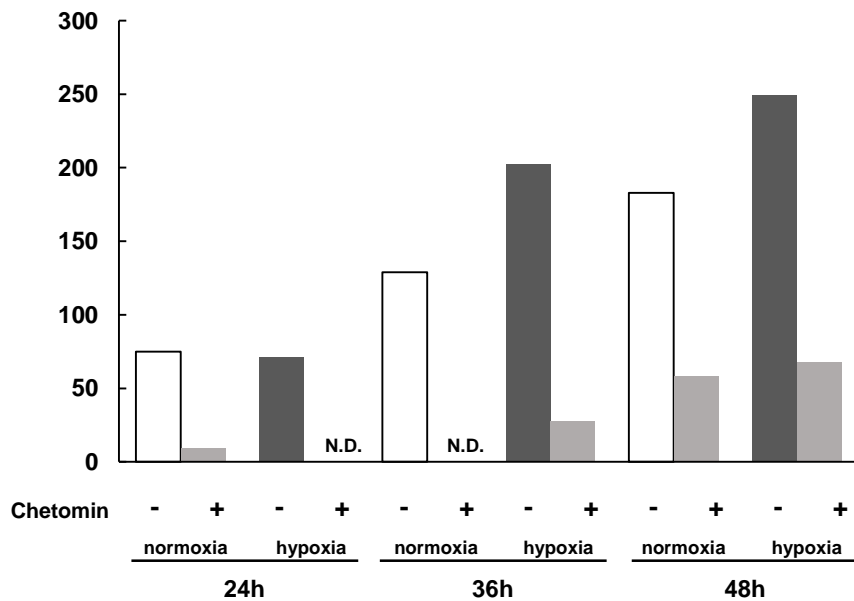
A.

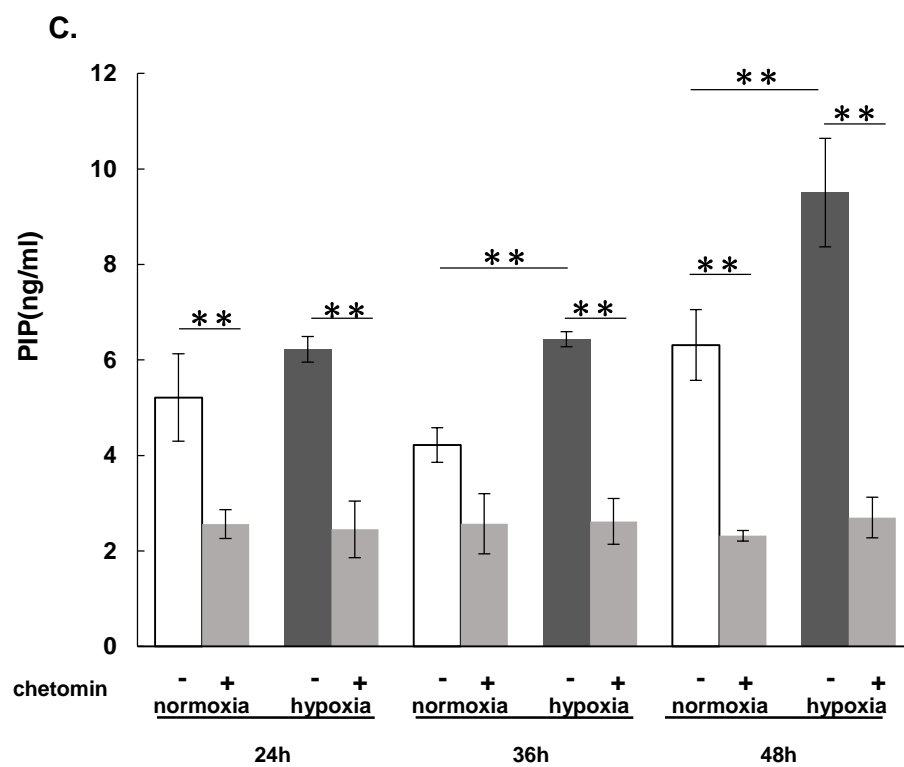
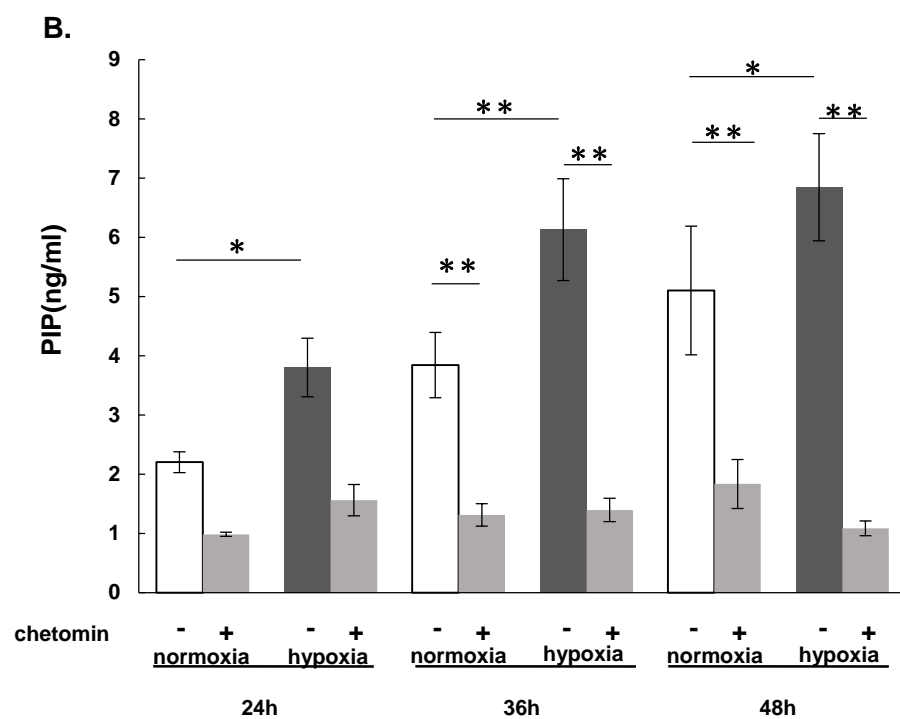


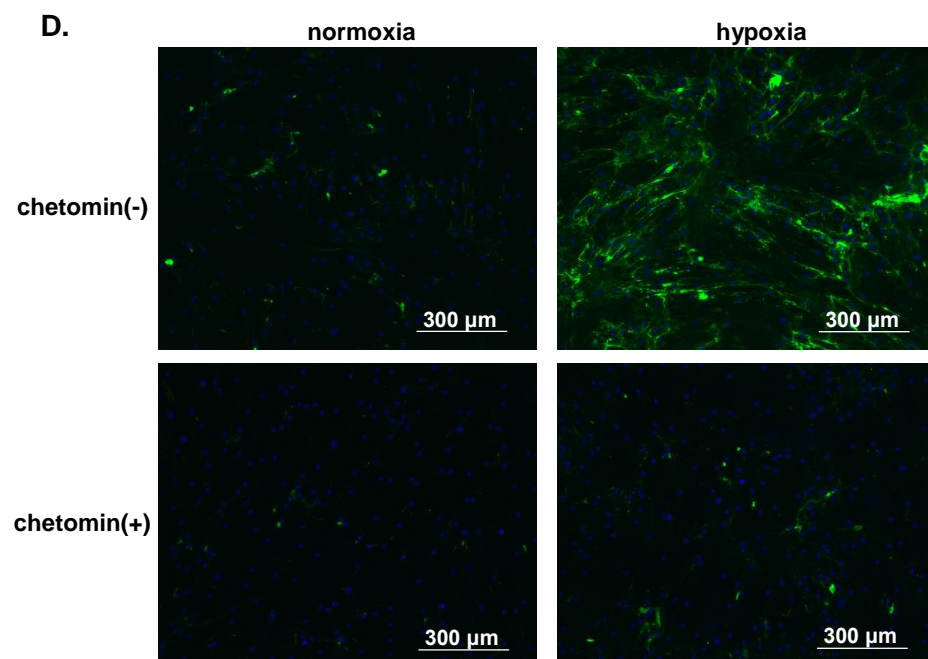
HGF



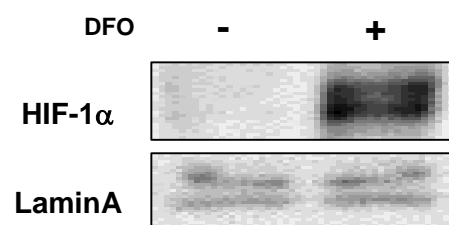
HPDL



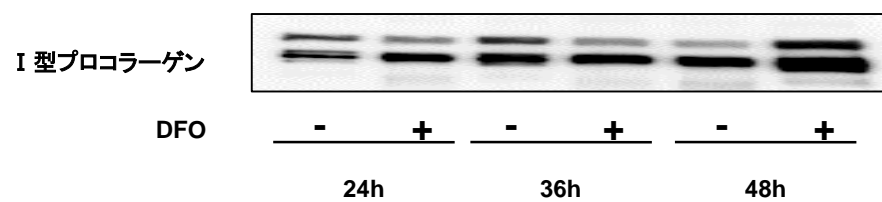




E.



F.



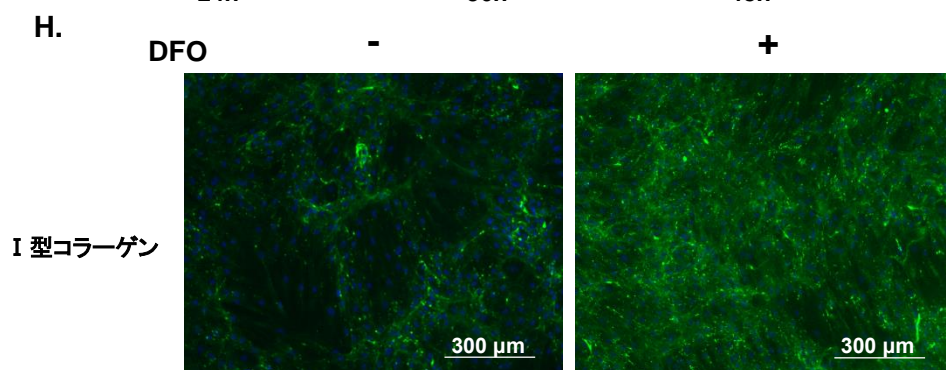
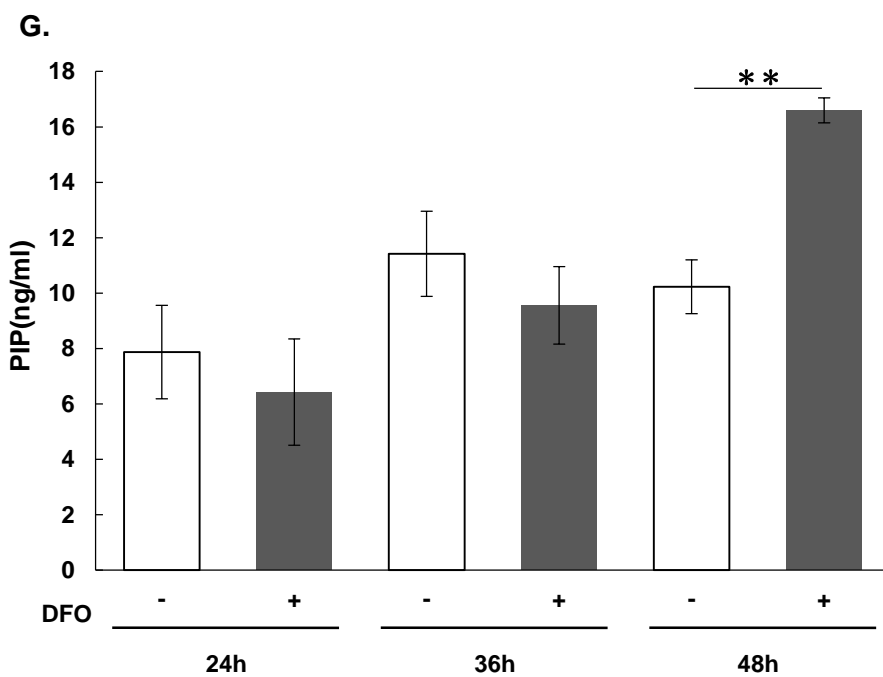
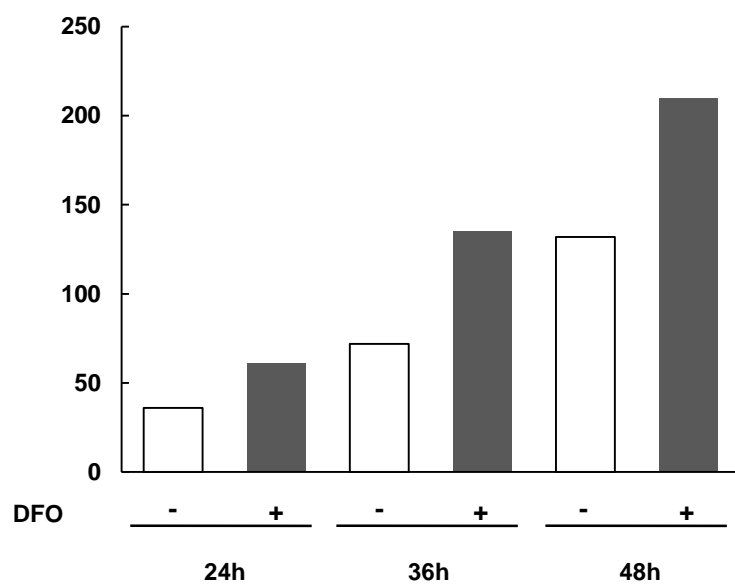


図 2. HGF および HPDL における低酸素誘導性コラーゲン産生亢進に対する HIF-1 α の関与

A. HGF および HPDL を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現を示す。下のグラフは、I 型プロコラーゲンのバンドの密度の値を数値化して比較したものを示す。

B. HGF を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の PIP の発現を示す。

C. HPDL を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の PIP 濃度を示す。

D. HGF を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 48 時間培養した際の細胞周囲における I 型コラーゲンの発現を示す。I 型コラーゲンを Alexa Fluor 488 標識抗体にて検出し DAPI にて核染色を行った。

E. HGF を 100 μ M DFO 存在あるいは非存在下で、3 時間培養した際の核タンパク中の HIF-1 α の発現を示す。

F. HGF を 100 μ M DFO 存在あるいは非存在下で、24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現を示す。右上のグラフは、I 型プロコラーゲンのバンドの密度の値を数値化して比較したものを示す。

G. HGF を 100 μ M DFO 存在あるいは非存在下で、24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の PIP の発現を示す。

H. HGF を 100 μ M DFO 存在あるいは非存在下で、48 時間培養した際の細胞周囲における I 型コラーゲンの発現を示す。I 型コラーゲンを Alexa Fluor 488 標識抗体にて検出し DAPI にて核染色を行った。

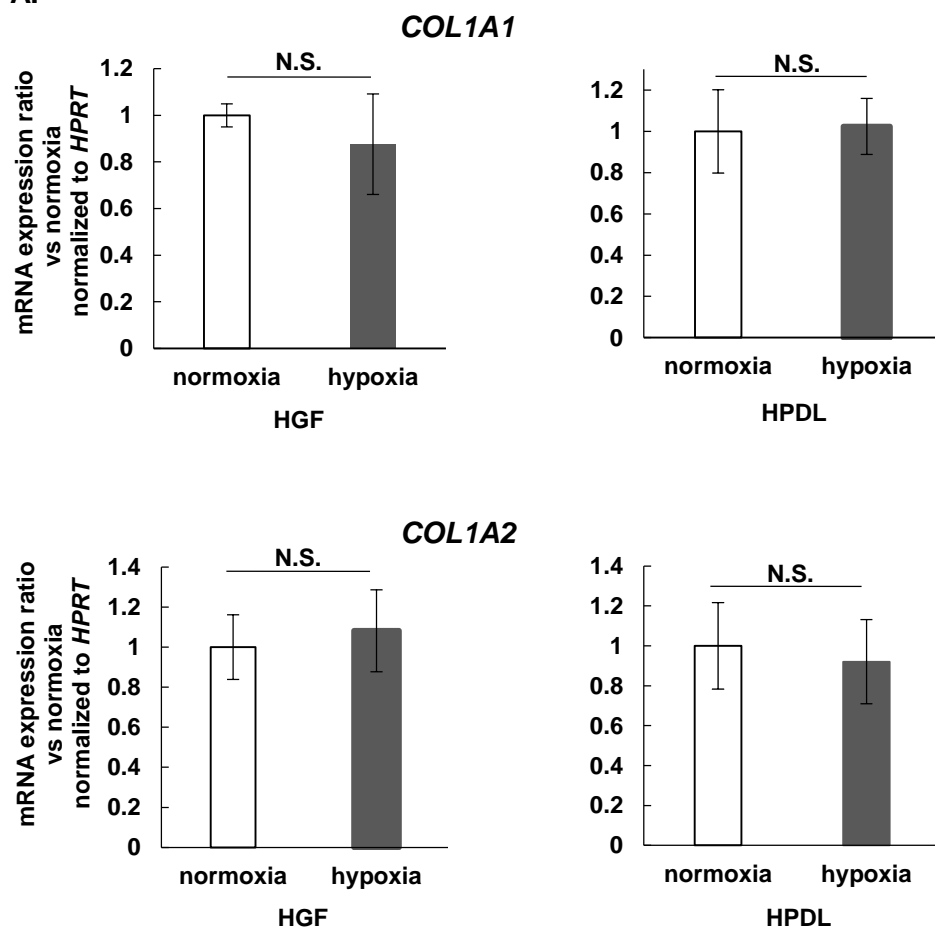
B、C、G : * p < 0.05、** p < 0.01。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

3. 低酸素環境での培養もしくは DFO 刺激が HGF および HPDL の I 型コラーゲン遺伝子発現に及ぼす影響に関する検討

HGF および HPDL を低酸素環境下で培養し、I 型コラーゲンの遺伝子 (*COL1A1*、*COL1A2*) の発現を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、HGF および HPDL において *COL1A1*、*COL1A2* の発現上昇は低酸素環境下での培養 12 時間において認められなかった。(図 3A)。また、HGF および HPDL を DFO 存在下で 12 時間培養し、I 型コラーゲンの遺伝子 (*COL1A1*、*COL1A2*) の発現を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、HGF および HPDL において DFO 添加による *COL1A1*、*COL1A2* の発現上昇は認められなかった(図 3B)。

A.



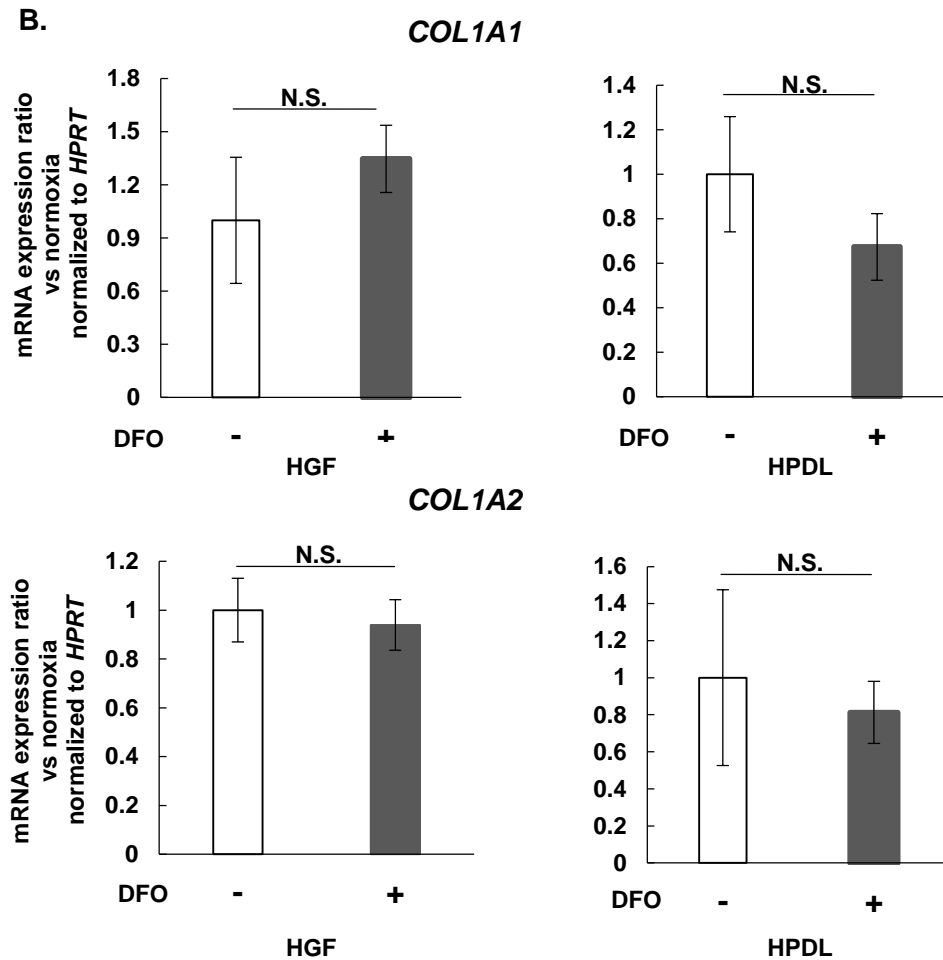


図 3. HGF および HPDL における低酸素環境での培養もしくは DFO 添加時の I 型コラーゲン遺伝子発現

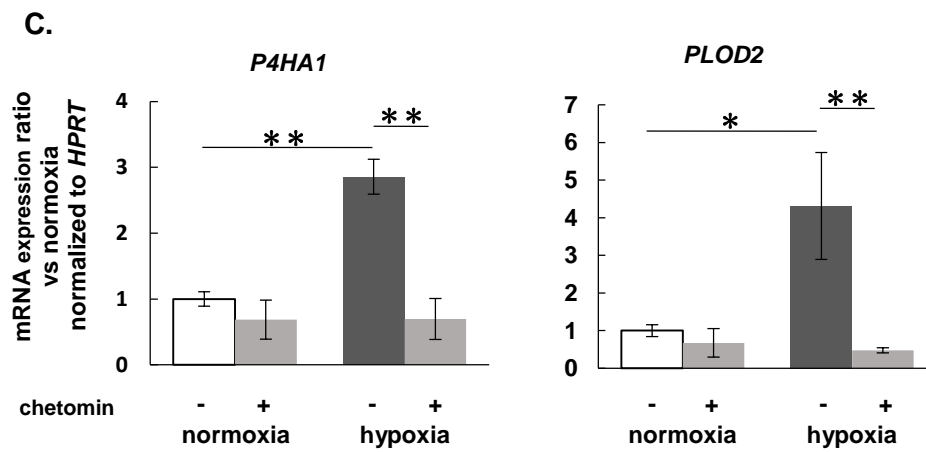
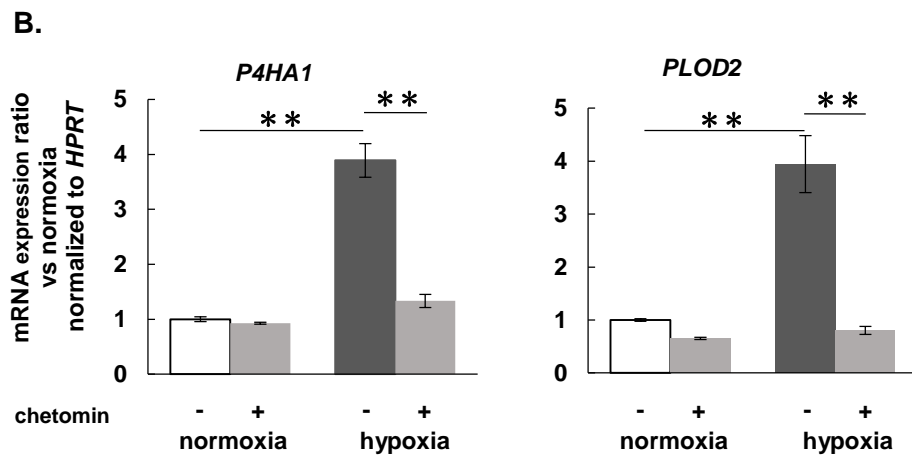
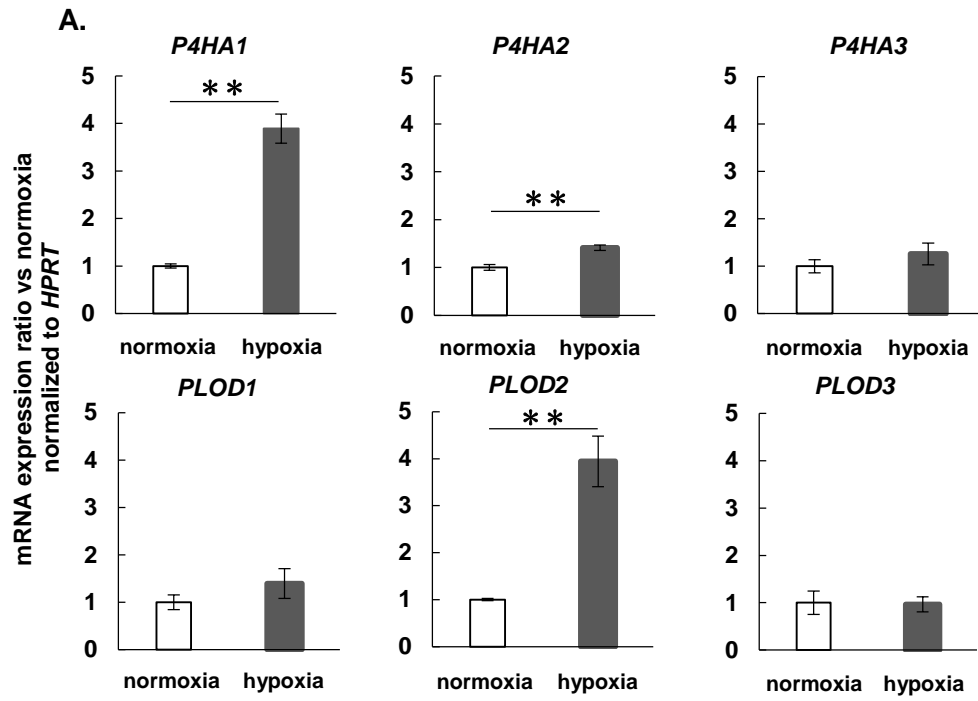
A. HGF および HPDL を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 12 時間培養した際の *COL1A1* および *COL1A2* の発現を示す。なお、低酸素環境 (hypoxia) における各遺伝子の発現量は、通常酸素環境 (normoxia) における発現量を 1 としたときの相対量として示した。N.S. : not significant.

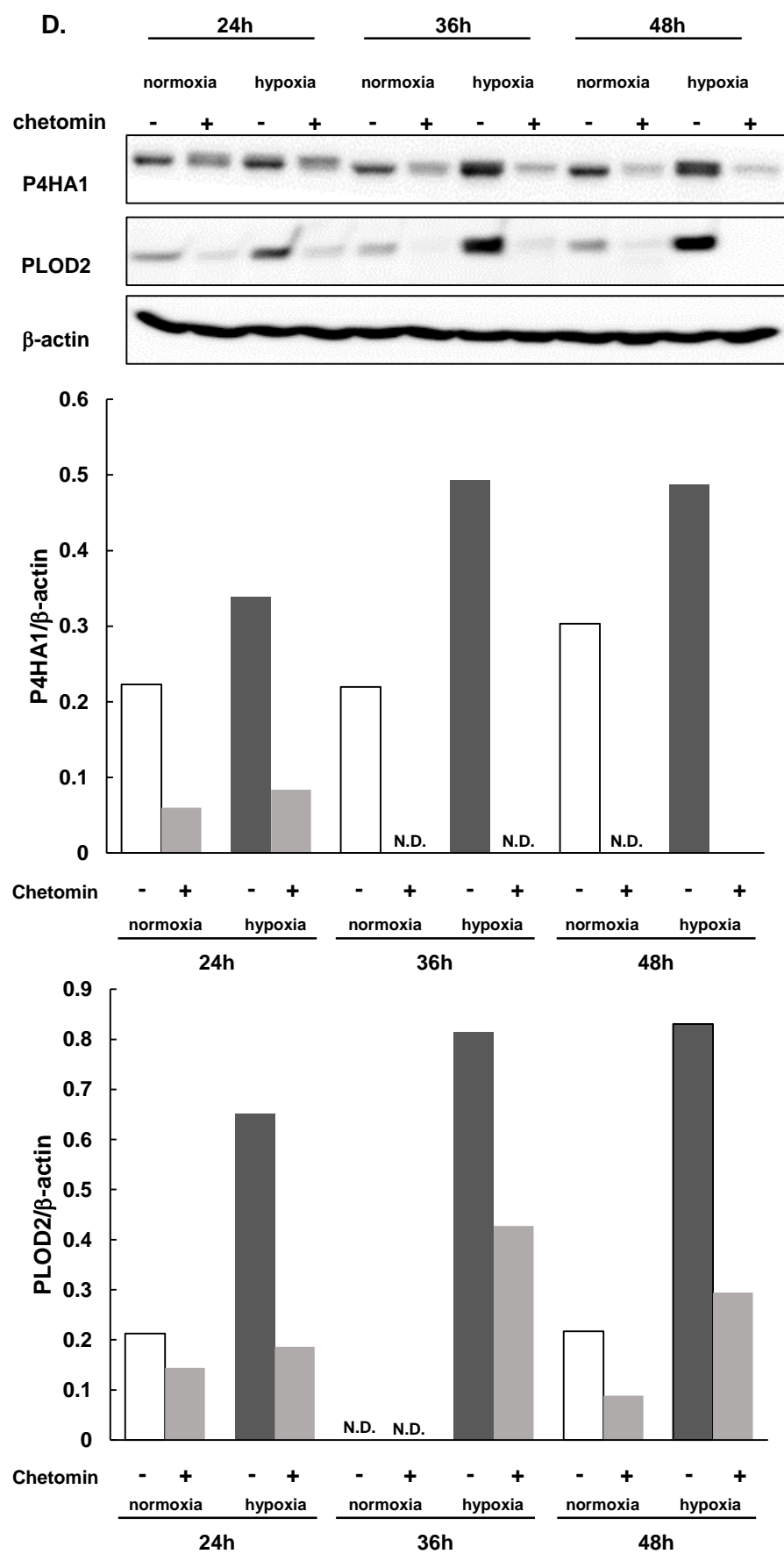
B. HGF および HPDL を 100 μ M DFO 存在あるいは非存在下で 12 時間培養した際の *COL1A1* および *COL1A2* の発現を示す。なお、DFO(+)における各遺伝子の発現量は、DFO(-)における発現量を 1 としたときの相対量として示した。N.S. : not significant.

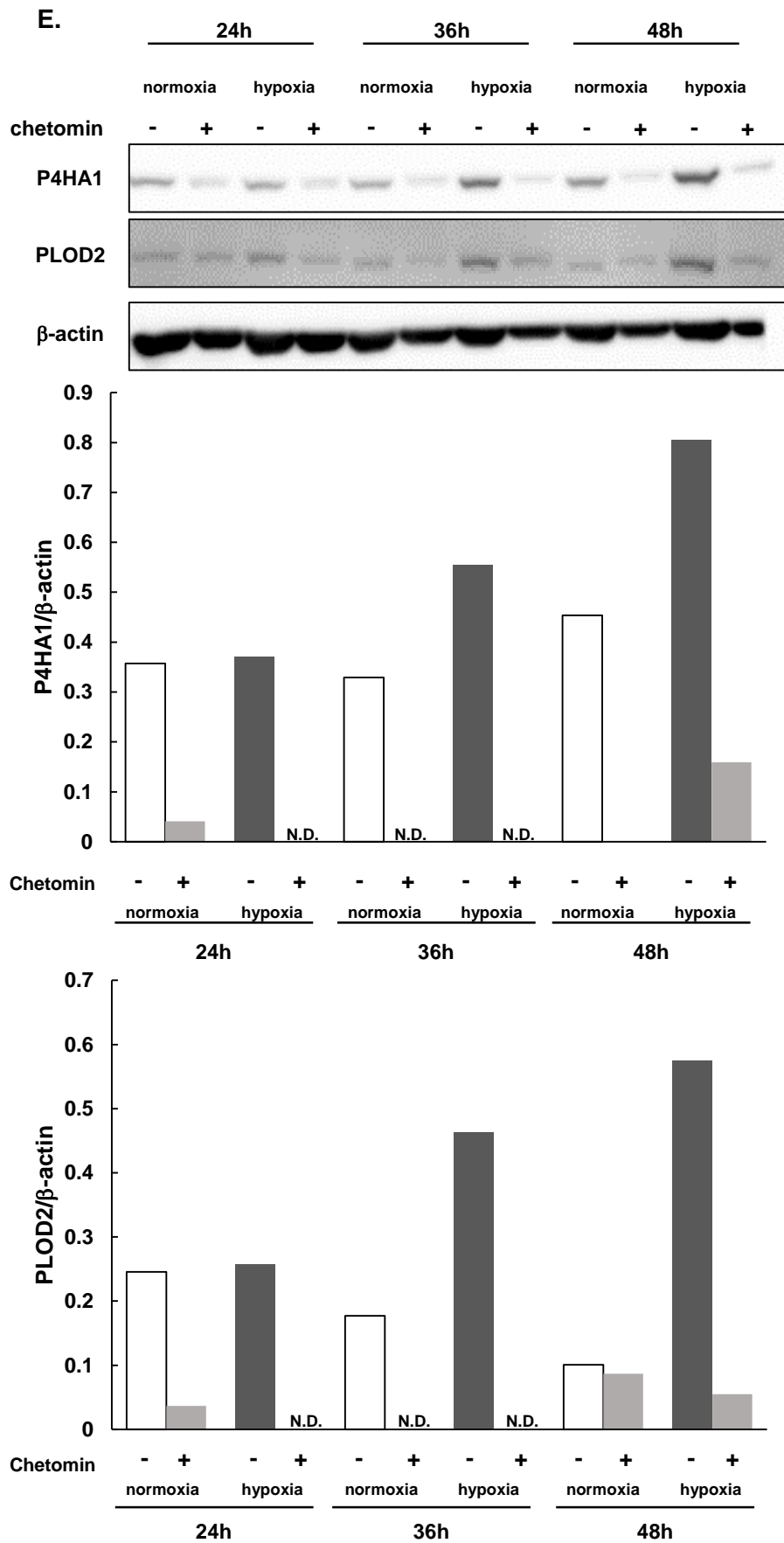
それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

4. 低酸素環境が HGF および HPDL のプロコラーゲン合成水酸化酵素の発現に及ぼす影響に関する検討

コラーゲンの合成過程は α 鎖が生成されたのち、その一部のアミノ酸が水酸化され三本鎖が形成された後、プロコラーゲン分子が産生される。 α 鎖は Gly-X-Y の繰り返し構造をしており、その Y にあたる部分にはプロリン、リシンが多く存在し水酸化される。プロリンはプロリルヒドロキシダーゼである P4HA1、P4HA2、P4HA3 によって、リシンはリシルヒドロキシダーゼである PLOD1、PLOD2、PLOD3 によって水酸化される。この α 鎖の水酸化はコラーゲンの生合成や成熟に必須の役割を果たすことが知られている。そこで、これら水酸化酵素が低酸素によって影響を受けるか否かについて検討した。HGF および HPDL を低酸素環境下で 12 時間培養し、水酸化酵素の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、HGF において P4HA1、P4HA2、PLOD2 の遺伝子発現は低酸素環境で培養することにより有意に上昇した (図 4A)。その中でも著明な上昇を示した P4HA1、PLOD2 について HIF-1 α の関与について検討を行った。すなわち、HGF および HPDL を chetomin 存在あるいは非存在下で培養し、低酸素環境によって誘導される P4HA1、PLOD2 の発現に及ぼす影響について検討した。Real-time PCR 法の解析から、HGF および HPDL において低酸素環境によって上昇した P4HA1、PLOD2 の両遺伝子発現は chetomin 添加により、有意に抑制されることが示された (図 4B、C)。また Western blot 法による解析から、低酸素環境の培養によって P4HA1、PLOD2 各分子の発現は上昇し、chetomin 添加により抑制された (図 4D、E)。次に DFO 刺激時の HGF における P4HA1、PLOD2 両分子の発現を検討した。すなわち、HGF を DFO 存在下あるいは非存在下で 12 時間培養し、P4HA1、PLOD2 の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて検討した。その結果、HGF において DFO 存在下での培養により P4HA1、PLOD2 の両遺伝子の発現は有意に上昇した (図 4F)。また、HGF を DFO 存在下 24 時間、36 時間、48 時間培養し、P4HA1、PLOD2 のタンパク発現を Western blot 法にて検討した。その結果、HGF において DFO 存在下での培養により P4HA1、PLOD2 両分子の発現は 24 時間、36 時間、48 時間いずれにおいても上昇した (図 4G)。以上の結果より、HGF、HPDL の両細胞において、低酸素環境下での培養によって、HIF-1 α 依存性に水酸化酵素 P4HA1、PLOD2 の発現が亢進することが明らかとなった。







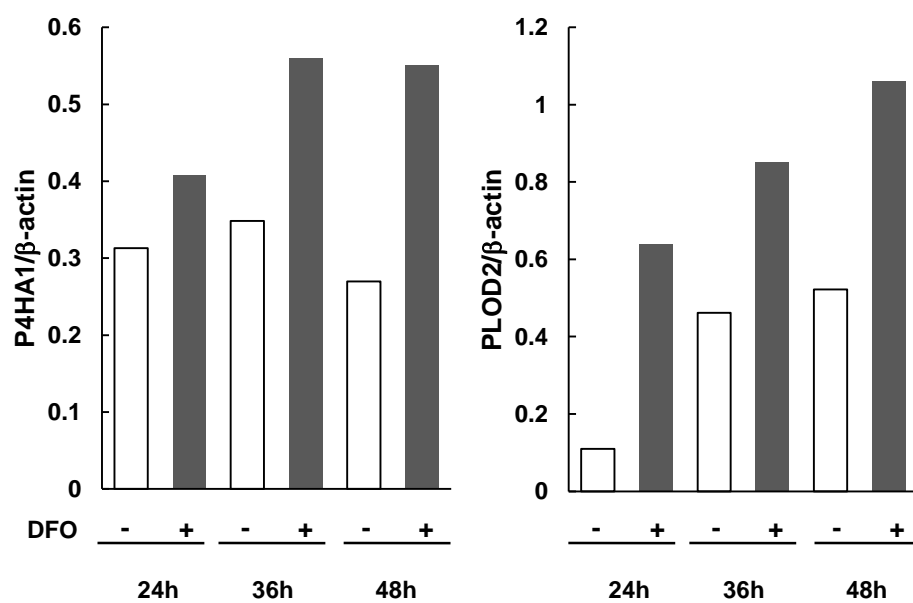
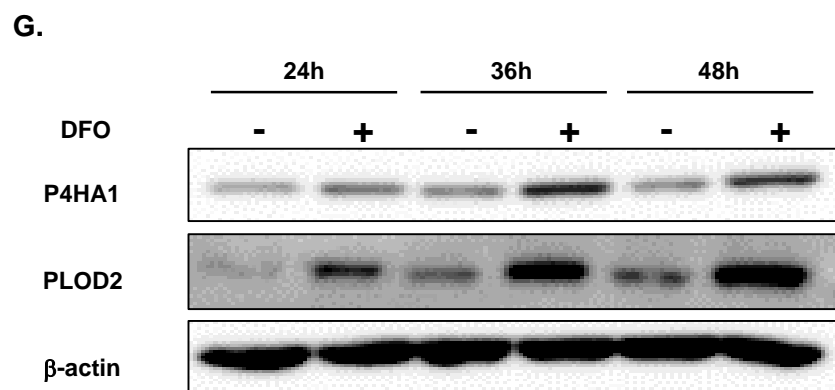
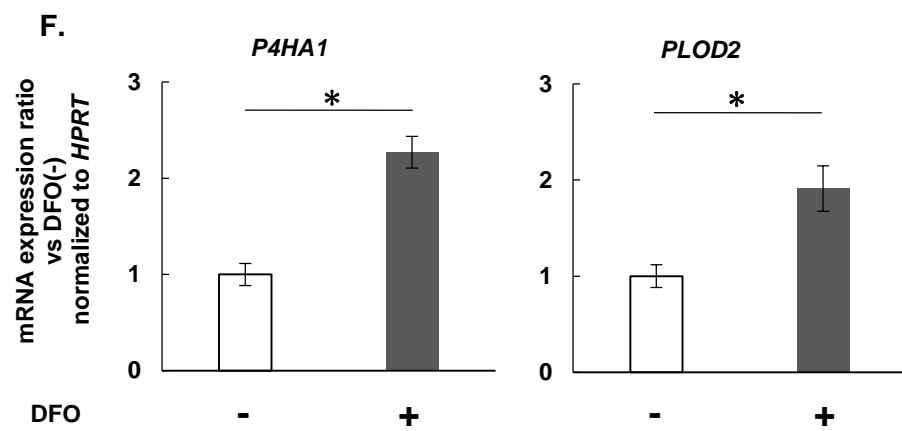


図 4. HGF および HPDL における低酸素環境下での HIF-1 α 依存性プロコラーゲン合成水酸化酵素の発現上昇

A. HGF を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 12 時間培養した際の P4HA1、2、3、PLOD1、2、3 の遺伝子発現を示す。

B. HGF を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 12 時間培養した際の P4HA1、PLOD2 の遺伝子発現を示す。

C. HPDL を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 12 時間培養した際の P4HA1、PLOD2 の遺伝子発現を示す。

D. HGF を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の P4HA1、PLOD2 の発現を示す。下のグラフは、P4HA1 あるいは PLOD2 のバンドの密度の値を、 β -actin のバンドの密度の値で除し、数値化して比較したものを示す。

E. HPDL を 300 nM chetomin 存在あるいは非存在下で、通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の P4HA1、PLOD2 の発現を示す。下のグラフは、P4HA1 あるいは PLOD2 のバンドの密度の値を、 β -actin のバンドの密度の値で除し、数値化して比較したものを示す。

F. HGF を 100 μ M DFO 存在下あるいは非存在下で、12 時間培養した際の培養上清中の P4HA1、PLOD2 の発現を示す。

G. HGF を 100 μ M DFO 存在下あるいは非存在下で、24 時間、36 時間、48 時間培養した際の P4HA1、PLOD2 の発現を示す。下のグラフは、P4HA1 あるいは PLOD2 のバンドの密度の値を、 β -actin のバンドの密度の値で除し、数値化して比較したものを示す。

A、B、C : 低酸素環境 (hypoxia) における各遺伝子の発現量は、通常酸素環境 (normoxia) における発現量を 1 としたときの相対量として示した。

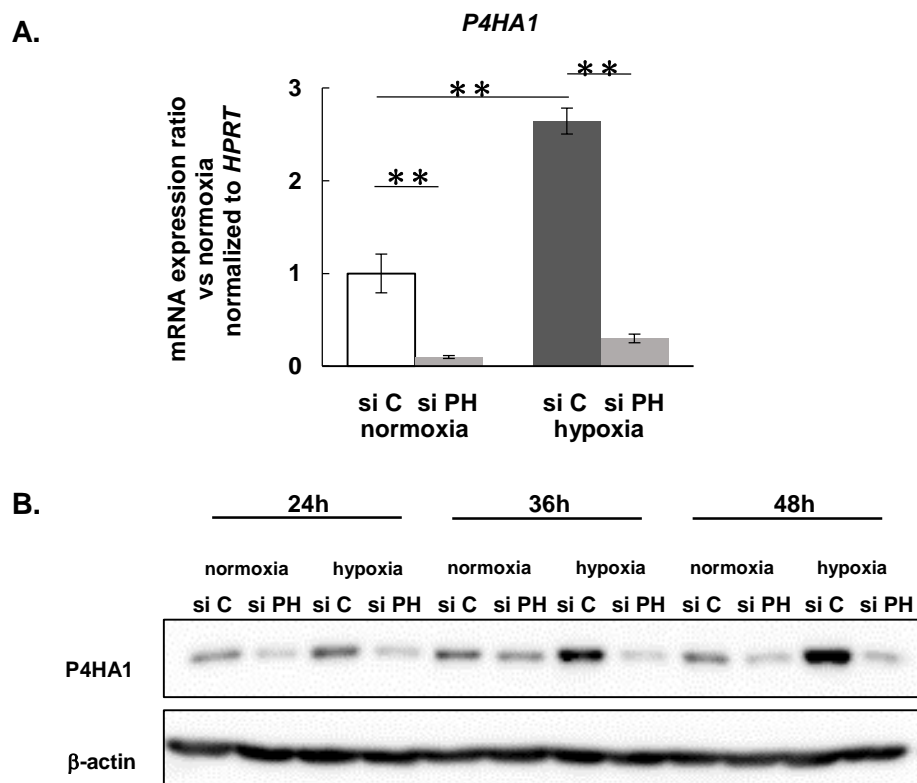
F : DFO(+)における各遺伝子の発現量は、DFO(-)における発現量を 1 としたときの相対量として示した。

A、B、C、F : * p < 0.05、** p < 0.01。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

5. HGFにおける P4HA1 の低酸素誘導性コラーゲン産生亢進に果たす役割に関する検討

P4HA1 が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 の発現を抑制した HGF を用いて機能解析した。まず、siRNA 導入により P4HA1 発現を抑制した HGF (si P4HA1) を作製した。なお、コントロールは negative control siRNA を導入した HGF (si control) とした。siRNA 導入による抑制効果を検討した結果、si P4HA1 における *P4HA1* の発現は、si control に比べ有意に抑制されており (図 5A)、Western blot 法による解析からタンパクレベルにおいても、その抑制が確認された (図 5B)。次に、si P4HA1 および si control の両細胞を低酸素環境下で 36 時間、48 時間培養し、コラーゲン産生について検討した。Western blot 法の結果より、培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現は P4HA1 抑制により si control と比較し減少した (図 5C)。また ELISA 法の結果より、培養上清中の PIP の発現も P4HA1 抑制により si control と比較し有意に減少した (図 5D)。以上の結果より、低酸素誘導性コラーゲン産生の亢進は P4HA1 の産生亢進に起因することが示唆された。



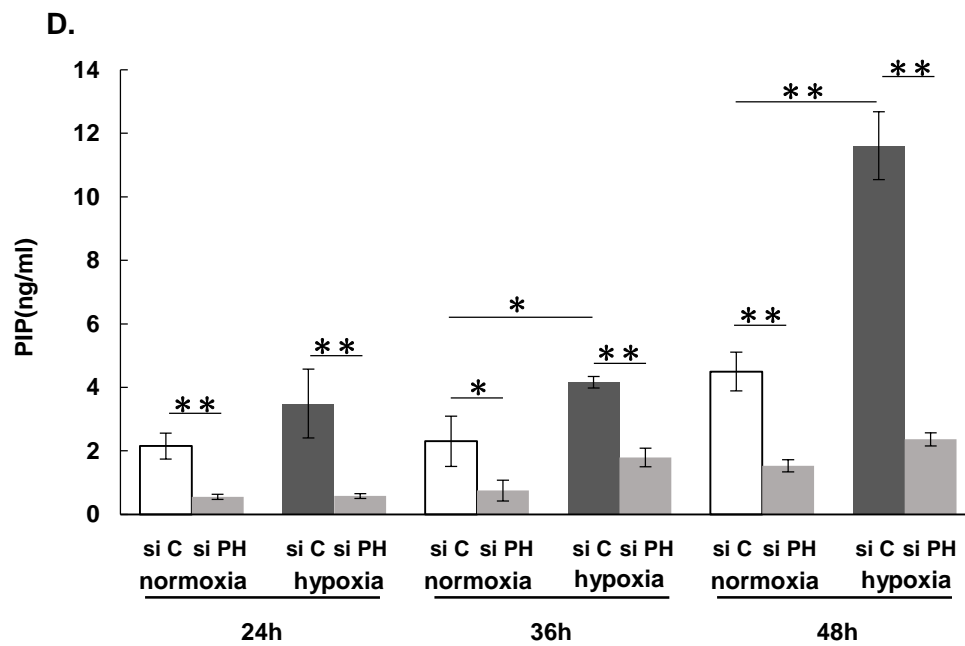
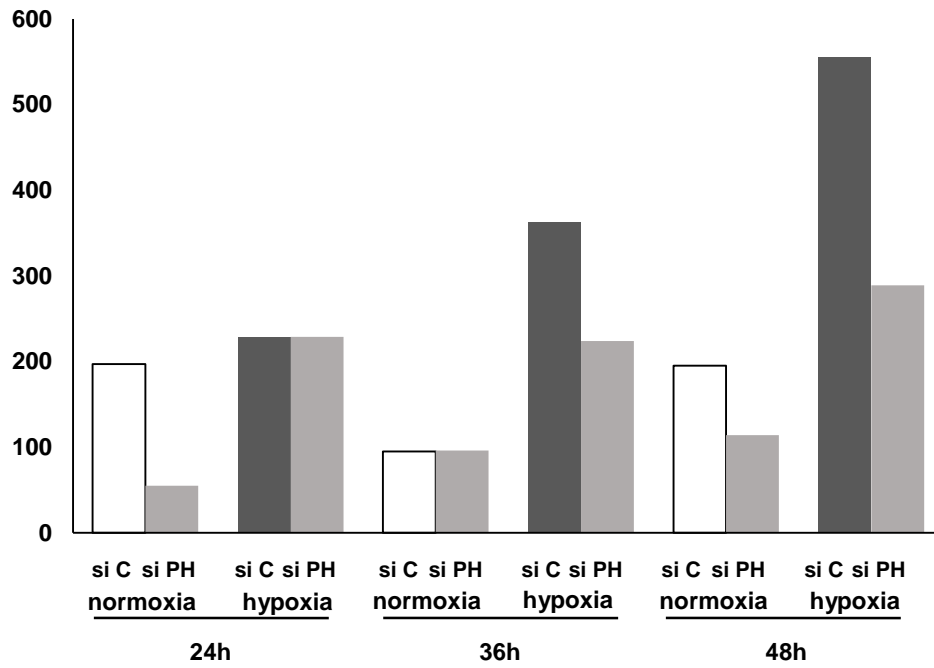
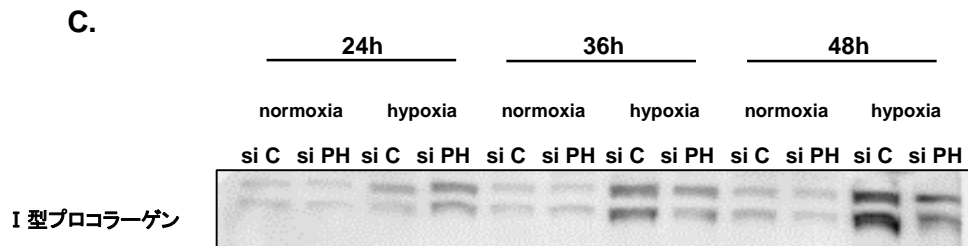


図 5. HGF において P4HA1 が低酸素誘導性コラーゲン産生亢進に果たす役割

A. si C : si control および si PH : si P4HA1 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 12 時間培養した際の P4HA1 の遺伝子発現を示す。なお、hypoxia における各遺伝子の発現量は、通常酸素環境 (normoxia) における発現量を 1 としたときの相対量として示した。

B. si control および si P4HA1 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の P4HA1 の発現を示す。

C. si control および si P4HA1 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現を示す。下のグラフは、I 型プロコラーゲンのバンドの密度の値を数値化して比較したものを示す。

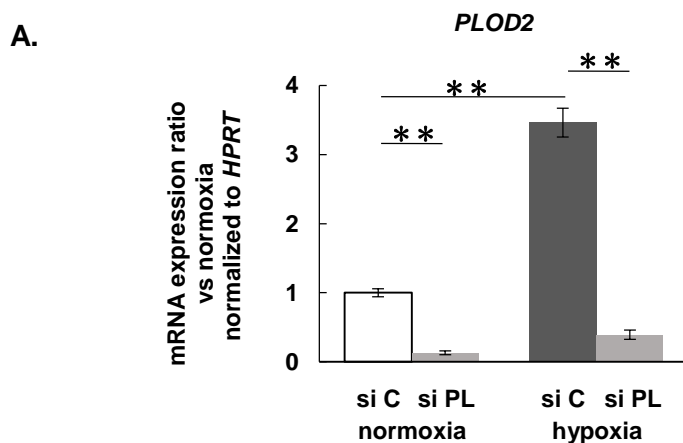
D. si control および si P4HA1 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の PIP 濃度を示す。

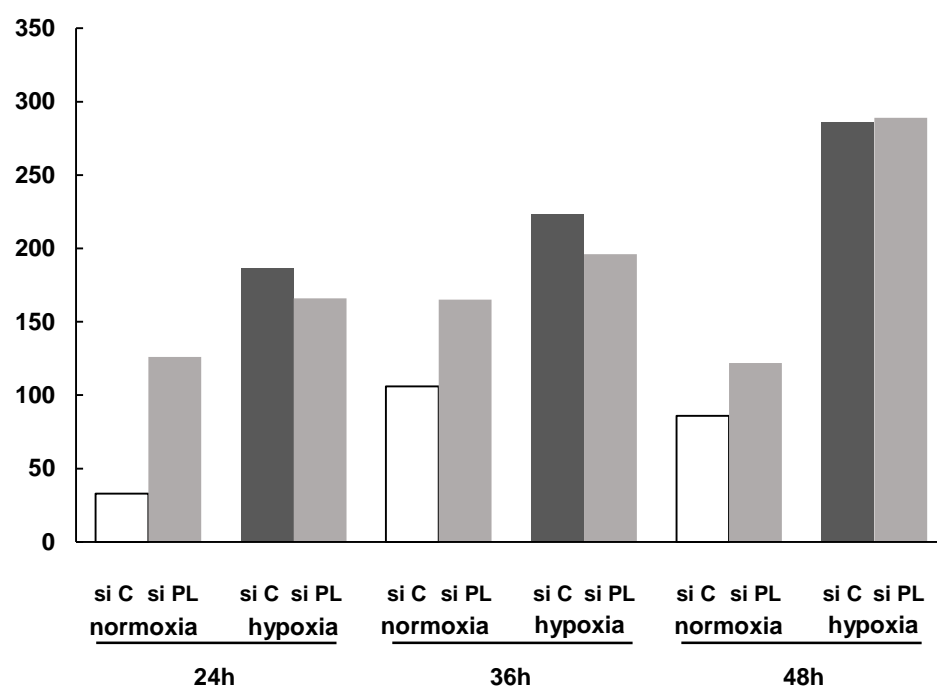
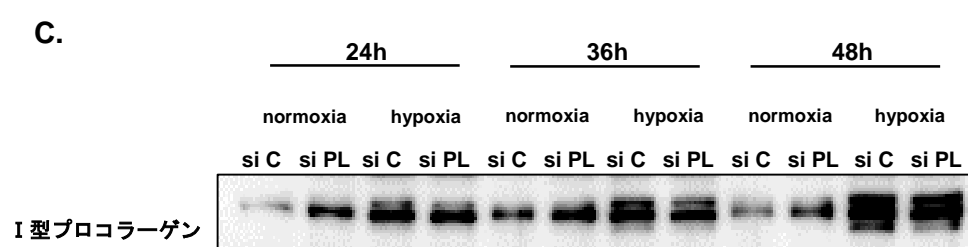
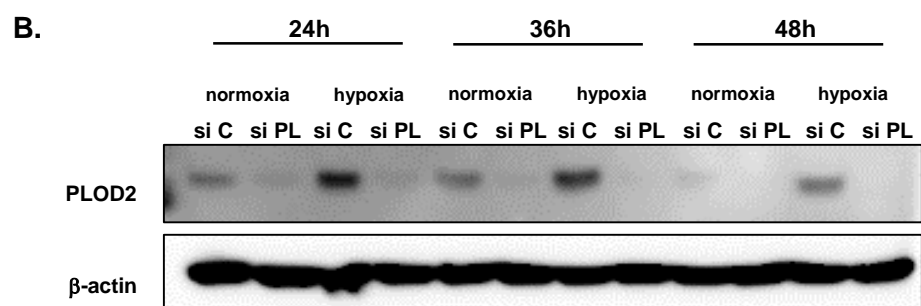
A、D : * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

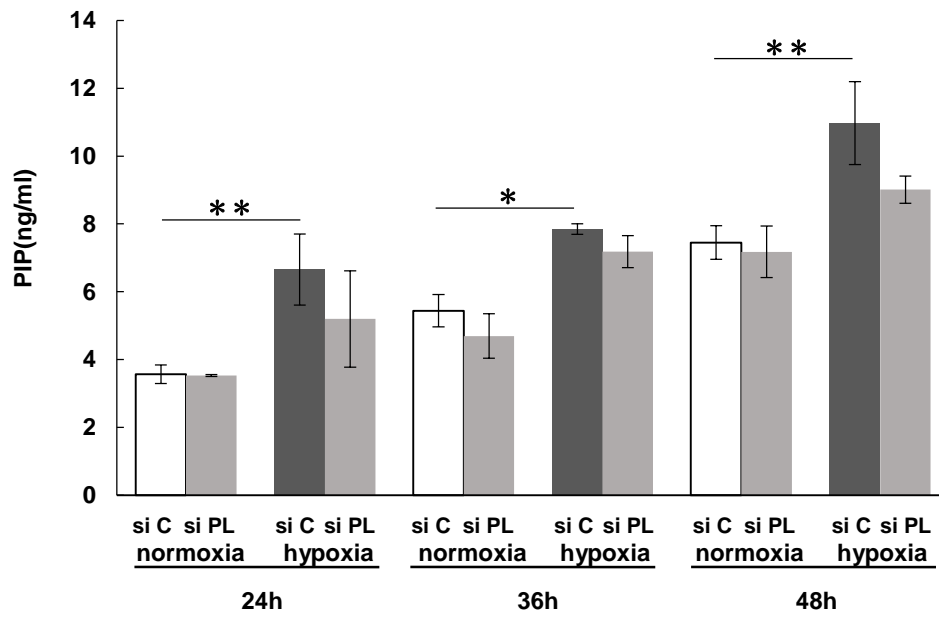
6. HGF における PLOD2 の低酸素誘導性コラーゲン産生亢進に果たす役割に関する検討

PLOD2 が低酸素誘導性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、PLOD2 を抑制した HGF を用いて機能解析した。まず、siRNA 導入により PLOD2 を抑制した HGF (si PLOD2) を作製した。なお、コントロールは negative control siRNA を導入した HGF (si control) とした。siRNA 導入による抑制効果を検討した結果、si PLOD2 における *PLOD2* の発現は、si control に比べ有意に抑制されており (図 6A)、Western blot 法による解析からタンパクレベルにおいても、その抑制が確認された (図 6B)。そこで、si PLOD2 および si control の両細胞を低酸素環境下で 24 時間、36 時間、48 時間培養し、培養上清中のコラーゲン産生について検討した。Western blot 法の結果より、培養上清中のコラーゲンの発現は PLOD2 抑制により si control と比較し変化を認めなかった (図 6C)。また ELISA 法の結果より、培養上清中の PIP の発現も PLOD2 抑制により si control と比較し著明な変化を認めなかった (図 6D)。次に si PLOD2 および si control の両細胞を低酸素環境下で 48 時間培養し、細胞周囲におけるコラーゲンの発現について免疫蛍光細胞染色法にて検討した。その結果、低酸素では PLOD2 を抑制すると低酸素環境によって誘導された細胞周囲におけるコラーゲンの発現は減少した (図 6E)。以上の結果より、低酸素環境では PLOD2 の産生亢進により培養上清中のコラーゲン産生に明らかな変化を与えることなく細胞周囲におけるコラーゲンの発現が増加していることが明らかとなった。





D.



E.

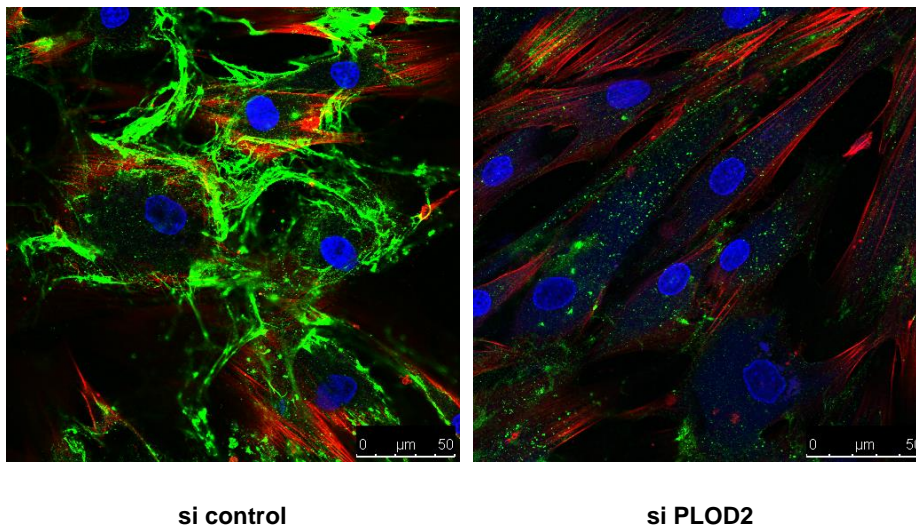


図 6. HGF において PLOD2 が低酸素誘導性コラーゲン産生亢進に果たす役割

A. si C : si control および si PL : si PLOD2 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 12 時間培養した際の PLOD2 の遺伝子発現を示す。なお、低酸素環境 (hypoxia) における各遺伝子の発現量は、通常酸素環境 (normoxia) における発現量を 1 としたときの相対量として示した。

B. si control および si PLOD2 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の PLOD2 の発現を示す。

C. si control および si PLOD2 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現を示す。下のグラフは、I 型プロコラーゲンのバンドの密度の値を数値化して比較したものを示す。

D. si control および si PLOD2 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 24 時間、36 時間、48 時間培養した際の培養上清中の PIP 濃度を示す。

E. si control および si PLOD2 を通常酸素環境 (normoxia) あるいは低酸素環境 (hypoxia) で 48 時間培養した際の細胞周囲における I 型コラーゲンの発現を示す。

A、D : * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

考察

歯周病は、歯周病原性細菌が共生、集合した細菌バイオフィーム（デンタルプラーク）が原因となって発症し⁽³¹⁾、歯周組織における炎症反応の遷延化により同組織が破壊される疾患である⁽³²⁾。一般に、炎症反応が惹起された部位においては、血流障害による酸素供給の低下、炎症細胞浸潤による細胞密度の上昇、代謝亢進による酸素消費の上昇等により低酸素環境が誘導される^(33, 34)。歯周病の病巣部においても HIF-1 α の発現が上昇している⁽²⁴⁾ という報告から、同部も低酸素環境にあることが想定される。さらに、歯周組織を構成する各種細胞を用いた *in vitro* 研究から、血管新生作用⁽¹¹⁾ や炎症反応制御⁽²⁵⁾ などの低酸素応答がこれら細胞に誘導されることが報告されてきた。本研究では、低酸素応答の一つとして HGF および HPDL の細胞外基質の産生制御に焦点をあて解析を行った。

歯周組織におけるコラーゲンのターンオーバーは、他の組織と比較して活発であり、ラットの歯根膜で 1 日、歯肉で 5 日、歯槽骨で 6 日と報告されており、皮膚の 15 日と比較してかなり早いことが知られている⁽³⁵⁾。これは、咬合力などのメカニカルストレスや飲食などによる熱刺激などの外的ストレスに常に晒されている歯周組織において、結合組織の代謝を活発に維持することが組織の恒常性維持に重要な役割を担っているためではないかと考えられている。歯周組織における細胞外基質の産生制御機構に関しては、これまでに、insulin-like growth factor や transforming growth factor（以下、TGF と略す）- β 1 が細胞外基質の産生を促進させている⁽³⁶⁾ 一方で、Interleukin-1 や tumor necrosis factor- α （以下、TNF- α と略す）などの炎症性サイトカインによって MMP の産生が促進され、TIMP の産生が抑制されることによって細胞外基質の発現が低下すると報告されている⁽³⁷⁾。このようなサイトカインによる制御に加え、最近の報告では、メカニカルストレスによって発現亢進する Wnt5a⁽³⁸⁾ や、ビタミン C⁽³⁹⁾ によるコラーゲン、フィブロネクチンの産生亢進が、歯根膜組織の恒常性維持だけでなく歯周組織の再生誘導につながるのではないかと期待されている。本研究では、これら機序に加えて、HGF および HPDL における I 型コラーゲン、フィブロネクチンの産生が低酸素環境下で活性化することを明らかにした（図 1C、E）。また歯肉、歯根膜の構成成分として I 型コラーゲンに次いで多い III 型コラーゲンも、HGF において低酸素環境下で I 型コラーゲンと同様に上昇することが予備実験の結果から示唆されている（結果には示さず）。このことから、歯周組織において低酸素環境が誘導されると、I 型コラーゲン、III 型コラーゲンならびにフィブロネクチンなどの主要な細胞外基質の産生が亢進され、組織修復の過程を活性化することにより歯周組織の恒常性維持の一端を担っているのではないかと考えている。

本研究にて明らかとなった低酸素環境下でのフィブロネクチンの産生亢進（図 1B、C、D、E に示す）のメカニズムについて検討するために、HGF および HPDL の低酸素環境下でのフィブロネクチンの遺伝子発現を解析したところ、I 型コラーゲンと同様、遺伝子発現に変化を認めなかった（結果には示さず）。これは、低酸素環境下の培養において HGF、HPDL の TGF- β の産生が亢進するという報告がある一方で、TGF- β によって PAI-1 や TIMP をはじめとする基質分解酵素阻害分子の産生が亢進する⁽⁴⁰⁾ために、低酸素環境下でのフィブロネクチン発現が上昇しているのではないかと推測している。フィブロネクチンの作用は組織の支持機能だけではなく、各種細胞の接着、伸展、形態調節、走化性に関与しており、Matrix metalloproteinase（以下、MMP と略す）の発現制御にも関与していることが知られている。このことから、低酸素環境下でのフィブロネクチンの発現上昇は、歯周組織における組織の構築と保持だけでなく、周囲の細胞間の相互作用を活性化し、創傷治癒の過程をスムーズに進めているのではないかと考えられる。

低酸素環境はコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質産生を活性化するばかりか、細胞外基質の分解にも影響を及ぼすことが知られている。実際、関節滑膜細胞⁽⁴¹⁾や軟骨細胞⁽⁴²⁾などを用いた研究から、MMP-2、9、13 の発現が低酸素環境では上昇することが報告されている。本研究では、HGF および HPDL を低酸素環境にて培養した際に培養上清中の I 型プロコラーゲン発現が上昇すること（図 2A）に加え、PIP の濃度が上昇（図 2B、C）することが明らかとなった。PIP は I 型プロコラーゲンが細胞内で合成された後、細胞外に分泌される際にエンドペプチダーゼによりその末端が切断され生じる可溶性プロペプチドでありコラーゲン合成量を反映する生化学的指標として用いることができることから、HGF、HPDL の両細胞では低酸素環境においてコラーゲンの産生が活性化されていると判断できる。一方で、コラーゲンの 3 重螺旋構造を切断する主要な酵素である MMP-1 の発現について Real-timePCR 法にて検討したところ、いずれの細胞においても低酸素環境によって MMP-1 遺伝子の発現が有意に減少することが明らかとなった（結果には示さず）。このことは、低酸素環境が HGF および HPDL のコラーゲン産生を促進するだけでなく、分解を抑制することにより同分子の代謝を制御している可能性を示唆している。今後は、MMP ファミリーのタンパクレベルでの発現解析や酵素活性、さらには MMP 阻害因子 TIMP 等について詳細に解析をすすめることにより、低酸素環境下での HGF、HPDL 両細胞のコラーゲン代謝の全貌を明らかにしたいと考えている。

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（図 3A、B）、コラーゲンの水酸化酵素 P4HA1、PLOD2 の発現を誘導する（図 4B、C、D、E）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。乳がん細胞や関節軟骨細胞を用いた研究では、低酸素環境がコラーゲン遺伝子の発現を上昇させるとともに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⁽⁴³⁾。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、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止しているのではないかと推測され、組織特異的な反応なのではないかと考えられる。

プロリンの水酸化酵素は、前述のように P4HA1-3 と三つのサブタイプが存在する。低酸素環境下で乳がん細胞では P4HA1 と同様のレベルで HIF-1 α 依存性に P4HA2 の発現が上昇し⁽⁴⁴⁾、血管平滑筋細胞では P4HA1、P4HA2 の発現はともに有意に上昇し、特に P4HA2 の発現の上昇率の方が高い⁽⁴⁵⁾のに対し、HGF および HPDL においては低酸素環境下での培養により、*P4HA1* と *P4HA2* の発現上昇が認められたが、*P4HA2* の発現上昇は著明ではなかった（図 4A に示す）。このことはプロリン水酸化酵素の発現が組織ごとに異なる制御を受けていることを示唆している。また、HGF および HPDL における DFO 添加時の *P4HA2* の発現は、著明な変化を認めず、また低酸素環境によって誘導された *P4HA2* 発現は chetomin 存在下でも変化を示さなかった（結果には示さず）。さらに、P4HA1 抑制 HGF を用いた実験における培養上清中の PIP 濃度の低下は、低酸素環境下だけでなく通常酸素環境下でも顕著であった（図 5D に示す）。このことは、歯周組織におけるコラーゲン産生において、プロリンの水酸化酵素として P4HA1 が優位に働いていることを示唆しているとともに、P4HA1 抑制 HGF が酸素濃度に依存しない I 型コラーゲン抑制細胞であると位置づけることもできる。本研究では、P4HA1 の役割について同細胞を用いた検討のみとなったが、今後、P4HA1 を過剰発現させた HGF および HPDL を用いてコラーゲン産生を検討することで、低酸素誘導性の P4HA1 産生亢進がコラーゲン産生を亢進させていることを裏付けたい。

PLOD2 は、コラーゲン線維の強度を決定するコラーゲン分子間の架橋構造の構築において重要な水酸化酵素である⁽⁴⁶⁾。また、コラーゲン分子間の架橋構造は、骨の質を決定する因子とされており、骨粗鬆症を診断する際にも用いられる⁽⁴⁷⁾。本研究にて明らかとなった PLOD2 の発現を抑制した際に培養上清中のプロコラーゲン量および PIP 濃度は変化せず、細胞周囲に発現しているコラーゲンの発現が抑制されたという（図 6C、D、E）結果は、コラーゲン線維の架橋構造が減少することによるものではないかと示唆される。一方で、過度の咬合力や外傷などのメカニカルストレスは、歯根膜に低酸素応答を誘導し、局所的に低

酸素環境となり、HIF-1 α の発現が上昇することで、HPDL の骨芽細胞やセメント芽細胞への分化に関与している可能性を示唆するのではないかと報告もなされている^(28,29)。今回、明らかとなった HPDL における低酸素誘導性 PLOD2 の産生 (図 4E) は、コラーゲン分子間の架橋構造を増加させることにより、コラーゲン線維の強度を増し、メカニカルストレスのかかった歯根膜において靱帯として強度を高めることによって外的ストレスに対して防御的に働いているのではないかと考えられる。

本研究では、DFO 存在下で細胞を培養することにより、通常酸素環境にて HIF-1 α を安定化させ、同分子がコラーゲン産生に及ぼす影響について検討した。DFO 添加 3 時間後に HIF-1 α の発現上昇が認められ (図 2E)、水酸化酵素である P4HA1、PLOD2 の遺伝子発現上昇は DFO 添加 12 時間後 (図 4F)、タンパクレベルでの上昇は DFO 添加 24 時間後 (図 4G) から認められた。しかしながら、低酸素環境の培養と異なり培養上清中の I 型プロコラーゲンの発現上昇および PIP 濃度の上昇は DFO 添加 48 時間 (図 2F、G) 後まで認められなかった。DFO は鉄のキレート剤であり、鉄イオンを活性中心に据える PHD の機能を抑制することにより HIF-1 α を安定化させるが、小胞体内でのプロ α 鎖のプロリン残基とリシン残基の水酸化反応に補因子として 2 価の鉄イオンとアスコルビン酸が必要となるため、DFO は HIF-1 α の安定化以外にコラーゲン合成に直接作用し、その合成を阻害したのではないかと考えられる。また、HIF-2 も HIF-1 と同様に PHD によって分解されることが明らかとなっている⁽⁴⁸⁾ため、今後は siRNA を用いて各分子特異的な抑制細胞を作成することにより、両分子の低酸素誘導性コラーゲン産生に果たす役割を明確にしたいと考えている。

本研究では、低酸素環境が HGF および HPDL の細胞外基質産生に及ぼす影響に関して *in vitro* における解析を行ったが、現在、*in vivo* の実験系にて解析を進めている。皮膚の創傷治癒過程において局所的に低酸素状態であると報告されているものの、歯周組織の創傷治癒過程において *in vivo* の実験系で同事象を明らかとした報告はない。そこで、まず歯周組織の創傷治癒過程における低酸素状態の有無について検討するために、マウス実験的歯周組織創傷治癒モデルを作製した。すなわち、上顎の左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮すると、結紮 7 日後には根尖に及ぶ歯槽骨吸収を伴う歯周炎が惹起される。その後絹糸を除去すると、除去 2 日後までは歯槽骨の治癒はほとんど認められないが、4 日後には歯根長の 1/3 まで、7 日後には上顎右側 (コントロール側) の歯槽骨レベルまで治癒することがマイクロ CT 解析から明らかになった (結果には示さず)。また、組織学的解析から絹糸結紮により第二後臼歯周囲の歯肉上皮が失われ潰瘍状態になるものの、絹糸除去 6 時間後には上皮化がすすみ、除去 12 時間後では完全に上皮化されることがわかった。このマウス実験的歯周組織創傷治癒モデルに、

低酸素状態にある細胞に集積することが知られている試薬 Pimonidazole を投与し、同試薬の歯周組織における発現を免疫組織学的に解析している（結果には示さず）。このモデルを用いて歯周組織の治癒過程における HIF-1 α 、P4HA1、PLOD2 の発現を検討、*in vitro* にて示した低酸素誘導性の P4HA1、PLOD2 の発現について *in vivo* にて明らかにしたい。

歯周病は、原因である歯周病原性細菌の影響に加えて、喫煙などの環境因子、全身状態、遺伝的素因などの宿主因子などに影響を受ける多因子性疾患である。本研究にて明らかとなった HIF-1 α 依存性 P4HA1 および PLOD2 の産生亢進は、内因性の組織修復に重要な役割を担っていると考えられることから、両分子の発現低下や機能不全が歯周病の重症化に関与するのではないかと考えている。今後、両分子の歯周病病態形成過程における役割が *in vivo* にて明らかになれば、歯周組織における組織修復能を診査する新たな診断方法の確立につながるのではないかと考えている。一方で、前述した *in vivo* での研究をすすめることで、HIF-1 α を活性化する薬剤もしくは P4HA1 や PLOD2 産生を誘導する薬剤を開発することができれば、新たな歯周組織再生療法の開発につながる情報が得られるのではないかと期待している。

前述したように、健康な歯周組織においても絶えずコラーゲンは産生され、代謝され続けている。一方で、歯周組織に炎症が惹起されると MMP によるコラーゲンの破壊が促進されることにより産生と代謝の均衡が崩壊し、組織破壊が進行すると考えられる。本研究にて明らかとなった低酸素誘導性のコラーゲン産生亢進は、このような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。また、低酸素環境にて産生が亢進する PLOD2 はコラーゲン線維の質を向上させることにより、機械的強度の高い歯周組織を形成するのではないかと考えられる。一方で、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、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 の発現が誘導されているとの報告がある⁽⁵⁰⁾。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⁽³⁰⁾、Kato らは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報告している⁽⁵¹⁾。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。

結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1. HGF、HPDL において、低酸素環境下では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。
2. HIF-1 α は低酸素環境下でのコラーゲンの産生亢進に関与することが明らかとなった。
3. HIF-1 α 依存性にプロコラーゲン合成水酸化酵素の産生が亢進することが明らかとなった。
4. P4HA1 は低酸素誘導性コラーゲン産生の亢進に関与することが示唆された。
5. 低酸素環境では、PLOD2 の産生亢進により、培養上清中のコラーゲンの産生に明らかな変化を与えることなく、細胞周囲におけるコラーゲンの発現が増加することが明らかとなった。

以上のことから、歯肉線維芽細胞および歯根膜細胞においては、低酸素環境下で、HIF-1 α 依存性にプロコラーゲン合成水酸化酵素の産生が誘導され、特にP4HA1 の発現亢進によりコラーゲンの産生が亢進することが明らかとなった。また、HIF-1 α 依存性 PLOD2 発現亢進により、コラーゲン線維の架橋構造が増加していることが示唆された。このことから、歯周組織における低酸素誘導性のコラーゲンは、P4HA1 によってその量が、PLOD2 によってその質が制御されていることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、竹立匡秀助教に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々なご協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

1. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, et al. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19426-31.
2. Kalucka J, Ettinger A, Franke K, Mamlouk S, Singh RP, Farhat K, et al. Loss of epithelial hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 accelerates skin wound healing in mice. *Mol Cell Biol*. 2013;33(17):3426-38.
3. Jain RK, Martin JD, and Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014;16:321-46.
4. Eltzschig HK, and Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011;364(7):656-65.
5. Bartels K, Grenz A, and Eltzschig HK. Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(46):18351-2.
6. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res*. 2001;49(5):614-7.
7. Masoud GN, and Li W. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):378-89.
8. Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of kidney fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(Suppl 1):S16.
9. Liu Y, Cox SR, Morita T, and Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*. 1995;77(3):638-43.
10. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*. 2000;157(2):411-21.
11. Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest*. 2001;108(1):39-40.
12. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3664-71.
13. Sandoel A, and Hengartner MO. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29(3):168-76.
14. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.

15. Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, and Pugh CW. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol.* 1998;201(Pt 8):1153-62.
16. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 2004;19:176-82.
17. Freedman SJ, Sun ZY, Poy F, Kung AL, Livingston DM, Wagner G, et al. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5367-72.
18. Wenger RH, Stiehl DP, and Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE.* 2005;2005(306):re12.
19. Bignon M, Pichol-Thievent C, Hardouin J, Malbouyres M, Brechot N, Nasciutti L, et al. Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood.* 2011;118(14):3979-89.
20. Manresa MC, Godson C, and Taylor CT. Hypoxia-sensitive pathways in inflammation-driven fibrosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;307(12):R1369-80.
21. Gilkes DM, Bajpai S, Wong CC, Chaturvedi P, Hubbi ME, Wirtz D, et al. Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res.* 2013;11(5):456-66.
22. Eisinger-Mathason TS, Zhang M, Qiu Q, Skuli N, Nakazawa MS, Karakasheva T, et al. Hypoxia-dependent modification of collagen networks promotes sarcoma metastasis. *Cancer Discov.* 2013;3(10):1190-205.
23. Vasconcelos RC, Costa Ade L, Freitas Rde A, Bezerra BA, Santos BR, Pinto LP, et al. Immunoexpression of HIF-1alpha and VEGF in Periodontal Disease and Healthy Gingival Tissues. *Braz Dent J.* 2016;27(2):117-22.
24. Ng KT, Li JP, Ng KM, Tipoe GL, Leung WK, and Fung ML. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human periodontal tissue. *J Periodontol.* 2011;82(1):136-41.
25. Motohira H, Hayashi J, Tatsumi J, Tajima M, Sakagami H, and Shin K. Hypoxia and reoxygenation augment bone-resorbing factor production from human periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 2007;78(9):1803-9.
26. Watanabe T, Yasue A, Fujihara S, and Tanaka E. PERIOSTIN regulates MMP-2 expression via the alphavbeta3 integrin/ERK pathway in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 2012;57(1):52-9.
27. Takedachi M, Iyama M, Sawada K, Mori K, Yamamoto S, Morimoto C, et al.

- Hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits interleukin-6 and -8 production in gingival epithelial cells during hypoxia. *J Periodontal Res.* 2016.
28. Wu Y, Han X, Guo Y, Wu H, Ren J, Li J, et al. Response of immortalized murine cementoblast cells to hypoxia in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013;58(11):1718-25.
 29. Choi H, Jin H, Kim JY, Lim KT, Choung HW, Park JY, et al. Hypoxia promotes CEMP1 expression and induces cementoblastic differentiation of human dental stem cells in an HIF-1-dependent manner. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(1-2):410-23.
 30. Tsai CH, Lee SS, Huang FM, Yu CC, Yang SF, and Chang YC. The modulation of hypoxia-inducible factor-1alpha/plasminogen activator inhibitor-1 axis in human gingival fibroblasts stimulated with cyclosporine A. *J Formos Med Assoc.* 2015;114(1):58-63.
 31. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):821-78.
 32. Kornman KS, Page RC, and Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997;14:33-53.
 33. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, and Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1098-106.
 34. Kempf VA, Lebiedziejewski M, Alitalo K, Walzlein JH, Ehehalt U, Fiebig J, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation.* 2005;111(8):1054-62.
 35. Sodek J, and Ferrier JM. Collagen remodelling in rat periodontal tissues: compensation for precursor reutilization confirms rapid turnover of collagen. *Coll Relat Res.* 1988;8(1):11-21.
 36. Cochran DL, and Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 1999;19:40-58.
 37. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, and Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res.* 1989;24(3):207-13.
 38. Hasegawa D, Wada N, Maeda H, Yoshida S, Mitarai H, Tomokiyo A, et al. Wnt5a Induces Collagen Production by Human Periodontal Ligament Cells Through TGFbeta1-Mediated Upregulation of Periostin Expression. *J Cell Physiol.* 2015;230(11):2647-60.
 39. Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, et al. Vitamin C treatment promotes

- mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol.* 2012;227(9):3216-24.
40. Arancibia R, Oyarzun A, Silva D, Tobar N, Martinez J, and Smith PC. Tumor necrosis factor- α inhibits transforming growth factor- β -stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2013;84(5):683-93.
 41. Li G, Zhang Y, Qian Y, Zhang H, Guo S, Sunagawa M, et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- κ B/HIF-1 α pathway. *Mol Immunol.* 2013;53(3):227-36.
 42. Li P, Deng J, Wei X, Jayasuriya CT, Zhou J, Chen Q, et al. Blockade of hypoxia-induced CXCR4 with AMD3100 inhibits production of OA-associated catabolic mediators IL-1 β and MMP-13. *Mol Med Rep.* 2016;14(2):1475-82.
 43. Grimmer C, Balbus N, Lang U, Aigner T, Cramer T, Muller L, et al. Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels. *Am J Pathol.* 2006;169(2):491-502.
 44. Gilkes DM, Bajpai S, Chaturvedi P, Wirtz D, and Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2013;288(15):10819-29.
 45. Hofbauer KH, Gess B, Lohaus C, Meyer HE, Katschinski D, and Kurtz A. Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *Eur J Biochem.* 2003;270(22):4515-22.
 46. Uzawa K, Grzesik WJ, Nishiura T, Kuznetsov SA, Robey PG, Brenner DA, et al. Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1999;14(8):1272-80.
 47. Shidara K, and Inaba M. [Bone metabolic marker for osteoporosis]. *Nihon Rinsho.* 2009;67(5):927-31.
 48. Patel SA, and Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2 α in development and disease. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):628-34.
 49. Brady AF, and Patton MA. Osteogenesis imperfecta with arthrogryposis multiplex congenita (Bruck syndrome)--evidence for possible autosomal recessive inheritance. *Clin Dysmorphol.* 1997;6(4):329-36.
 50. Kim YS, Shin SI, Kang KL, Chung JH, Herr Y, Bae WJ, et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the production of MMPs and prostaglandin E2 by

hypoxia-inducible factor-1alpha up-regulation in human periodontal ligament cells.
J Periodontal Res. 2012;47(6):719-28.

51. Kato T, Okahashi N, Ohno T, Inaba H, Kawai S, and Amano A. Effect of phenytoin on collagen accumulation by human gingival fibroblasts exposed to TNF-alpha in vitro. *Oral Dis.* 2006;12(2):156-62.