



Title	胎児期において低酸素誘導因子Hypoxia inducible factor 1 α が顎下腺の発育に及ぼす影響
Author(s)	木村, 友昌
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91840
rights	
Note	

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 （ 木村 友昌 ）	
論文題名	胎児期において低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor 1 α が顎下腺の発育に及ぼす影響
論文内容の要旨 【目的】 低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) は低酸素環境下でエリスロポエチン遺伝子の発現を上昇させる因子として発見された。HIF-1α は、組織が低酸素状態に陥った際に誘導されるタンパクであり、腫瘍の増殖、肺や心臓などの器官の発達に重要な役割を担っている。通常酸素濃度では、HIF-1α の特定のプロリン残基がプロリン水酸化ドメインタンパク (PHD) により水酸化される。HIF-1α の水酸化された残基が von Hippel Lindau tumor suppressor (pVHL) を含む E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化にされることにより、HIF-1α はプロテアソーム分解を受ける。一方、低酸素条件下では PHD の活性が抑制されるため、HIF-1α は水酸化されずプロテアソーム分解を回避することができる。その結果、安定化した HIF-1α は核内に移行して HIF-1β と二量体を形成し、低酸素応答が活性化される。 唾液腺から分泌される唾液は、消化作用、抗菌作用、粘膜保護作用、および食塊形成作用などを有することから、口腔内はもとより全身の環境および機能の維持に重要な役割を果たしている。唾液腺の発育の時期である胎児期の酸素環境は低酸素状態であるが、これまでに唾液腺の発達における HIF-1α の関連は明らかでない。今回唾液腺の器官培養法を使用し HIF-1α の唾液腺発達への関与、及び HIF-1α シグナル経路を解析した。 【方法】 ① 20%、5%酸素濃度における唾液腺の形態評価およびタンパク発現解析 胎生 13.5 日目の ICR マウスから胎仔顎下腺 (SMG) を顕微鏡下で単離した後、通常酸素濃度である 20%(20% O₂) と胎盤内酸素濃度である 5%(5% O₂) で 4、8、12、24、30 時間 DMEM/F12 培地で培養を行なった。培養後の SMG を回収し、Western blot 法により HIF-1α、HIF-1α の下流因子であり糖取り込みを担う GLUT1、および血管新生を担う VEGF の発現を解析した。 ② HIF-1α 阻害剤 BAY 87-2243 を添加した SMG 発育の検証 単離した SMG を HIF-1α 阻害剤である BAY 87-2243 を 50、100 μM 含む DMEM/F12 培地で 5% O₂ の条件で 4 時間または 30 時間培養した。培養後の SMG を回収し、腺房形態と腺房数の評価、HIF-1α、GLUT1、VEGF の発現を Western blot 法により解析した。 ③ ERK1/2 阻害剤 U0126 を添加した HIF-1α シグナル経路の検証 HIF-1α のシグナル経路を解析するため、単離した SMG を ERK1/2 阻害剤である U0126 を 10、20、40 μM 含む DMEM/F12 培地で 5% O₂ の条件で 4 時間または 30 時間培養した。培養後の SMG を回収し、腺房形態と腺房数の評価、リン酸化 ERK1/2 (P-ERK1/2)、HIF-1α、GLUT1、VEGF の発現を Western blot 法により解析した。 ④ 極度の低酸素状態における SMG 発育の検証 SMG を通常酸素状態である 20% O₂、低酸素状態である 5% O₂、さらに、妊娠中に異常が生じたと仮定した極度の低酸素状態のモデルとして 1% O₂ で培養を行い、腺房形態と腺房数の評価、HIF-1α、GLUT1、VEGF、細胞増殖能 (PCNA)、細胞周期 (Cyclin D1)、細胞死 (Caspase3、LC3B1/2) の発現を Western blot 法により解析した。	

【結果】

① 20%、5%酸素濃度における唾液腺の形態評価およびタンパク発現解析

経時的に HIF-1 α の発現を解析したところ 20% O₂ では HIF-1 α の発現を認めなかった。5% O₂ で培養を開始後、4 時間後に HIF-1 α の発現が最も強く見られ、8 時間後、12 時間後と経過に伴い発現が減少した。20% O₂ と 5% O₂ の両者において形態と腺房数の差はなかった。GLUT1 と VEGF の発現は 20% O₂ と比較し 5% O₂ で発現が増加した。HIF-1 α の発現、またそれに伴い誘導された GLUT1 と VEGF の発現により低酸素状態であっても通常酸素状態と同様の SMG の発育を維持した可能性が示唆された。

② HIF-1 α 阻害剤 BAY 87-2243 を添加した SMG 発育の検証

BAY87-2243 の濃度依存的に HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現が減少した。BAY87-2243 により HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現が抑制された結果、SMG の腺房の大きさおよび腺房数が減少した。HIF-1 α および GLUT1、VEGF の存在が SMG の発育に重要であることが明らかになった。

③ ERK1/2 阻害剤 U0126 を添加した HIF-1 α シグナル経路の検証

U0126 の濃度依存的に HIF-1 α 、P-ERK1/2、GLUT1、VEGF が減少した。U0126 により P-ERK1/2 の発現が抑制された結果、SMG の発育が抑制された。これらの結果から、ERK1/2 のリン酸化は低酸素条件下で HIF-1 α を介して GLUT1 と VEGF の発現を調整しており、ERK1/2 が HIF-1 α の上流に位置し低酸素条件下での唾液腺発達に関与していることが示唆された。

④ 極度の低酸素状態における SMG 発育の検証

1% O₂ では、HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現が 20% O₂ と 5% O₂ と比較して増加したが、SMG の発育は不良であった。PCNA、Cyclin D1 の発現は 5% O₂ でピークをむかえ、1% O₂ で減少した。Caspase3、LC3B1/2 の発現は、各酸素条件で差がなかった。極度の低酸素環境では、HIF-1 α の発現は増加するが、細胞増殖能、細胞周期の進行が抑制されることにより SMG の発育が抑制されることが明らかになった。

【考察】

低酸素状態で HIF-1 α の発現は増加し、下流の GLUT1、VEGF の発現を誘導することで SMG の発達に関与することが示唆された。また、阻害剤を用いた実験から ERK1/2 が HIF-1 α の上流にあることが明らかになり、さらに ERK1/2 のリン酸化が HIF-1 α の発現を調整している可能性が示唆された。酸素濃度の低下に伴い HIF-1 α の発現は増加するが、1% O₂ では HIF-1 α の強い発現にも関わらず SMG の発育が抑制されていた。細胞増殖能と細胞周期が 1% O₂ では低下していたが、細胞死関連因子の酸素濃度による差がないことから、1% O₂ では細胞増殖能と細胞周期の進行が抑制されることで発育が不良になることが示唆された。さらなるメカニズムの解析により唾液腺形成における HIF-1 α の役割の理解が深まり、唾液腺と同様の腺房形成を経た発育様式を示す臓器の発育に関する理解にも繋が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 (木 村 友 昌)			
	(職) 氏 名		
論文審査担当者	主 査	教授	阪井 丘芳
	副 査	教授	山城 隆
	副 査	准教授	前田 隆史
	副 査	講師	村上 智彦
論文審査の結果の要旨 本研究は、<i>ex vivo</i> 唾液腺の器官培養法を用いて唾液腺発育過程における低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) の役割を検討したものである。 その結果、HIF-1α が唾液腺の発育促進に影響を与えていること、また HIF-1α が ERK1/2 経路を介してその下流にある GLUT1 や VEGF の発現を増加させることが明らかとなった。 以上の研究結果は、唾液腺の形態形成における HIF-1α の役割について重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。			