

論文の内容の要旨

氏名：伊藤 寿典

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Hypoxia increases CCAAT/enhancer-binding protein β and receptor activator of NF- κ B ligand expressions in cultured periodontal ligament cells
(低酸素曝露後の培養歯根膜細胞にみられた C/EBP β および RANKL の発現上昇)

外傷などにより歯根膜組織が損傷すると、炎症性サイトカインの産生により破骨細胞が誘導され、損傷を受けた歯の予後に大きな影響を及ぼす。歯根膜細胞は、微小循環障害などによって生じた低酸素環境下において、いくつかの炎症性サイトカインを産生することが知られているが、そのメカニズムについては現在までに十分な知見が得られていない。そこで本研究では、不死化ヒト歯根膜細胞において低酸素誘導因子である Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)が、転写調節因子の CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β 、および破骨細胞の分化を促進する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)発現にどのような影響を与えるかについて調べるため、細胞を低酸素曝露してそのメカニズムを検討した。

本研究ではヒト乳歯から作製した不死化歯根膜細胞 SH9 を使用した。SH9 細胞の培養には 10%FBS を含む α -MEM を培地として用い、CO₂濃度を 5%、37°C の条件で培養し実験に供した。この培養条件をコントロール群とし、また SH9 細胞を低酸素環境に曝露するためアネロパック-ケンキ 5%と専用ジャーを用いて O₂濃度を 0.1%以下、CO₂濃度を 5%に設定し、37°C で 24 時間培養したものを実験群とした。

最初に、両条件において SH9 細胞を 24 時間培養し、各サンプルから全 RNA を抽出して RT-qPCR を行った。炎症性サイトカインのうち歯根吸収に影響を及ぼすことが知られている RANKL, IL-6, MIF, TNF- α , OPG、および転写因子である HIF-1 α , C/EBP β について mRNA 発現量を測定した。IL-6, MIF, TNF- α , OPG, HIF-1 α の発現には培養条件による差は認められなかったが、RANKL と C/EBP β は低酸素曝露により発現レベルの有意な上昇が認められた。続いて両条件で SH9 細胞を 24 時間培養後、培養上清中に産生された炎症性サイトカインタンパク量をサイトカインアレイにより測定し、ImageQuant により定量化した。その結果、IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, M-CSF, MIF, MCP-1, TNF- α の発現に、培養条件による差は認められなかった。

次に SH9 細胞を両条件で 24 時間培養後、各サンプルの細胞溶解液を調整して Western blot 法にて RANKL と HIF-1 α のタンパク発現量を測定した。ImageQuant により画像解析を行ったところ、RANKL, HIF-1 α ともに低酸素曝露によりタンパク発現レベルの有意な上昇が確認された。さらにタンパクの局在を確認するために免疫蛍光組織染色を行い ImagePro による画像解析を行った。各細胞について細胞質および核での輝度変化、ならびに細胞質に対する核の輝度の比を算出したところ、低酸素曝露群では RANKL, HIF-1 α ともに蛍光強度に有意な上昇が認められ、細胞質に対する核の輝度の増加がみられた。

C/EBP β mRNA 発現に対する HIF-1 α タンパクの影響を検討するために、prolylhydroxylase (PHD)の阻害剤である dimethylloxaloylglycine (DMOG)を培養液に加えて 24 時間通常培養し、C/EBP β および RANKL 発現についてコントロールと比較した。HIF-1 α は通常の酸素濃度では PHD により速やかに分解されるが、DMOG 投与で PHD の活性が阻害されると分解を免れ増加する。まず Western blot 法にて DMOG 投与群での HIF-1 α タンパクの有意な上昇を確認した後、同条件にて培養した SH9 細胞での C/EBP β および RANKL mRNA 発現を検討したところ、いずれも DMOG 投与群で有意な上昇を認めた。

さらに C/EBP β と RANKL 発現の関連を検討するため、SH9 細胞に C/EBP β siRNA と Negative-control siRNA をそれぞれトランスフェクションし、まず C/EBP β の mRNA 発現を有意に抑制できる C/EBP β siRNA の濃度を決定した。その後、各 siRNA をトランスフェクションした SH9 細胞を 24 時間低酸素曝露させた後、RANKL mRNA 発現量を測定した。その結果、C/EBP β siRNA 群では RANKL mRNA 発現の有意な減少が認められた。

以上の結果を踏まえ、SH9 細胞に対する低酸素曝露によって誘導された C/EBP β ならびに RANKL

mRNA 発現の上昇について、各遺伝子のプロモーター領域のメチル化が関与しているかどうかを、ビーズアレイを用いて検討することとした。SH9 細胞を通常環境あるいは低酸素環境で 24 時間培養後に各サンプルのゲノム DNA を抽出して、ビーズアレイにより CpG サイトの網羅的メチル化解析を行った。その結果、低酸素曝露により C/EBP β 遺伝子プロモーターでの脱メチル化の亢進が認められた。

本研究では、転写調節因子でありロイシンジッパータンパクファミリーの一つである C/EBP β がヒト歯根膜細胞における低酸素誘導性 RANKL 発現に関与していることを実証した。SH9 細胞を低酸素曝露すると C/EBP β および RANKL mRNA 発現が有意に上昇したが、C/EBP β siRNA トランスフェクションは RANKL mRNA 発現を有意に減少させた。また SH9 細胞に DMOG を加えて通常酸素濃度下で培養した場合に、C/EBP β および RANKL の mRNA 発現が上昇したことが確認された。これらの結果から、ヒト歯根膜細胞では低酸素曝露による HIF-1 α タンパクの安定化が C/EBP β mRNA 発現を上昇させ、さらに RANKL の発現上昇を誘導するという経路が存在することが示唆された。またビーズアレイによるメチル化解析で、C/EBP β プロモーター領域の脱メチル化亢進が確認されたことから、ヒト歯根膜細胞に対する低酸素曝露が、遺伝子プロモーター領域の脱メチル化によって RANKL をはじめとするサイトカインの発現に長期的な影響を及ぼす可能性が示唆された。今後は C/EBP β の活性化による RANKL 発現上昇のメカニズムをより詳細に検討する必要があると考えられる。