

論文審査の結果の要旨

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）

審査委員：（主査） 教授 岩田 幸一

（副査） 教授 白川 哲夫 教授 浅野 正岳

教授 清水 典佳

外傷などにより歯根膜組織が損傷されると、微小循環が障害され歯根膜組織は低酸素状態にさらされる。歯根膜細胞は低酸素環境下に置かれると種々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を低酸素曝露することにより、低酸素誘導因子である Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) が転写調節因子である 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) の発現にどのような影響を与えるかについて検討を加えた。

実験にはヒト乳歯から作製した不死化歯根膜細胞 SH9 を使用し、10%FBS を含む α -MEM を培地として用い、CO₂濃度 5%、37°C の条件で培養（通常培養）した。低酸素曝露にはアネロパックケンキ 5% と専用ジャーを用い、O₂濃度を 0.1%以下、CO₂濃度を 5%に設定して 37°C で 24 時間培養し実験群とした。コントロール群は SH9 細胞を通常培養したものとした。

SH9 細胞を 24 時間培養後、各サンプルから全 RNA を抽出して RANKL, IL-6, MIF, TNF- α , OPG, HIF-1 α および C/EBP β の mRNA 量を RT-qPCR により測定した。また、培養上清中の炎症性サイトカイン量をサイトカインアレイにより測定した。次に SH9 細胞を 24 時間培養後、Western blot 法にて RANKL と HIF-1 α タンパク量を測定するとともに免疫蛍光組織染色にて局在を確認した。また 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、HIF-1 α タンパクの増加を確認し、C/EBP β と RANKL 発現量を測定した。さらに C/EBP β と RANKL 発現の関係を検討するため、SH9 細胞に C/EBP β siRNA をトランスフェクションし、24 時間低酸素曝露したのち RANKL mRNA 量を測定した。また、低酸素曝露による C/EBP β および RANKL の発現上昇と各遺伝子プロモーターのメチル化との関係を検討するため、ビーズアレイにて各遺伝子のメチル化解析を行った。

上記の実験により、以下に示す知見が得られた。

1. 低酸素曝露後に SH9 細胞で C/EBP β および RANKL の mRNA 発現が上昇したこと、また C/EBP β siRNA トランスフェクションによって RANKL mRNA 発現が抑制されたことから、低酸素曝露による RANKL 発現の上昇に C/EBP β が関与している可能性が示された。
2. 通常培養下の SH9 細胞に対する DMOG 投与で HIF-1 α タンパクが増加したことから、低酸素条件下での HIF-1 α タンパクの増加に PHD 活性の低下が関与している可能性が示された。
3. SH9 細胞に対する低酸素曝露により C/EBP β プロモーター領域の脱メチル化亢進が認められたことから、低酸素環境での RANKL 発現の上昇には C/EBP β の脱メチル化が関与している可能性が示された。

以上のように、本研究はヒト歯根膜細胞における低酸素誘導性 RANKL 発現に対する C/EBP β の関与と、HIF-1 α による発現調節メカニズムの一端を明らかにしたものであり、小児歯科学ならびに関連歯科医学分野に寄与するものと考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められた。

以 上

平成 30 年 3 月 7 日