

## 論文の内容の要旨

氏名：木 船 崇

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Exposure of human periodontal ligament fibroblasts to hypoxia upregulates the expression of angiogenin and VEGF *in vitro*

(培養ヒト歯根膜線維芽細胞に対する低酸素曝露はアンギオゲニンと VEGF の発現を増加させる)

細胞への低酸素曝露によって Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)が活性化する。HIF-1 はサイトカインと血管新生因子の生成を促進し、傷害を受けた組織の修復に貢献する。歯根膜線維芽細胞は血管内皮成長因子(VEGF)を産生することが知られており、VEGF は血管形成を促進することで、歯根膜の微小血管系の恒常性に貢献すると考えられている。一方、膵臓のリボヌクレアーゼスーパーファミリーの一つであるアンギオゲニン(ANG)は、血管内皮細胞の増殖と管状構造の形成を促すことが知られている。現在のところ、歯根膜線維芽細胞が ANG 産生能力を持つのか、また低酸素が歯根膜の ANG 産生にどのように影響するのかは知られていない。本研究では、低酸素環境が歯根膜線維芽細胞による血管新生因子産生に及ぼす影響、ならびに HIF-1 $\alpha$  を介した血管新生因子産生の調節メカニズムを明らかにすることを目的として、不死化したヒト歯根膜線維芽細胞を用いて検討した。

ヒト乳歯由来の歯根膜線維芽細胞(hPDLFs)と、ヒト胚由来の不死化した線維芽細胞(hEMBFs)を用いて実験を行った。hPDLFsおよびhEMBFsを、それぞれ10%ウシ胎児血清を含む $\alpha$ -MEMあるいはDMEMにて、37°C、5%CO<sub>2</sub>/95%空気(通常環境)の条件下で培養した。アネロパック・ケンキ5%を含む気密ジャーに細胞培養ディッシュを入れ、37°Cのインキュベーターに設置することで、酸素濃度が0.1%以下、CO<sub>2</sub>濃度約5%の低酸素環境を作り、hPDLFsおよびhEMBFsを24時間培養した。同時にhPDLFsおよびhEMBFsを通常環境で培養してコントロールとした。

低酸素曝露したhPDLFsおよびhEMBFsについて、RNeasy mini kitを用いてRNAを抽出し、逆転写してcDNAを作成し、ANG、VEGF、stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)、HIF-1 $\alpha$ の遺伝子発現をRT-qPCR法にて検討した。低酸素曝露したhPDLFsではANGおよびVEGFのmRNAが有意に増加したが、hEMBFsでは有意な増加はみられなかった。hPDLFsおよびhEMBFsのいずれについてもHIF-1 $\alpha$  mRNA発現は低酸素曝露の影響を受けず、低酸素曝露したhEMBFsにおいてのみSDF-1 mRNA発現が有意に増加した。

続いて低酸素曝露したhPDLFsおよびhEMBFsについて、HIF-1 $\alpha$ タンパク発現をウエスタンブロット法にて調べた。通常環境または低酸素環境で24時間培養したhPDLFsおよびhEMBFsの細胞溶解液を準備し、10%SDSポリアクリルアミドで電気泳動を行いPVDFメンブレンにトランスファーし、1時間ブロッキングした。メンブレンはウサギ抗HIF-1 $\alpha$ 抗体またはウサギ抗GAPDH抗体とインキュベートした後、2次抗体のヤギ抗ウサギIgG抗体と反応させた。低酸素曝露したhPDLFsおよびhEMBFsではHIF-1 $\alpha$ タンパク発現が増加していた。さらに低酸素曝露したhPDLFsの培養上清中の血管新生因子の発現量をヒトサイトカインアレイキットで測定し、サイトカインの発現レベルをイメージ分析ソフトウェアで解析したところ、低酸素曝露したhPDLFsの培養液中のANGおよびVEGFタンパク量はコントロールに比べ有意に高かった。一方、培養液中のSDF-1 $\alpha$ タンパク量は低酸素曝露の影響を受けなかった。

hPDLFsでのANG、VEGF、HIF-1 $\alpha$ の局在を調べるために免疫蛍光染色を行った。チャンバースライドでhPDLFsを通常環境または低酸素環境で24時間培養後、一次抗体としてウサギ抗HIF-1 $\alpha$ 抗体とマウス抗ANG抗体またはマウス抗VEGF抗体を、蛍光二次抗体としてAlexa Fluor 546ロバ抗マウスIgGとAlexa Fluor 488ロバ抗ウサギIgGを用いて二重免疫蛍光染色を行い、Image-Pro 6.3Jで輝度を測定した。ANG、VEGF、HIF-1 $\alpha$ はhPDLFsの核、細胞質ともに局在が認められ、ANGおよびVEGFは核よりも細胞質に強い発現がみられた。低酸素曝露によってANGおよびVEGFの輝度は核と細胞

質ともに有意に増加した。HIF-1 $\alpha$  は通常環境では核と細胞質にほぼ同レベルの発現がみられたが、低酸素環境では核でより強い発現がみられた。

HIF-1 $\alpha$  mRNA 発現の抑制が ANG および VEGF mRNA の発現に及ぼす影響を調べるために、hPDLFs に HIF-1 $\alpha$  siRNA をトランスフェクトして検討した。hPDLFs を 2  $\mu$ M の HIF-1 $\alpha$  siRNA または 2  $\mu$ M の siRNA ネガティブコントロールを含む Opti-MEM-I Reduced Serum Medium で 5 時間培養した。培地を  $\alpha$ -MEM に置き換えて低酸素環境で 24 時間培養し、ANG および VEGF mRNA 発現を RT-qPCR で測定した。HIF-1 $\alpha$  siRNA をトランスフェクトした hPDLFs では VEGF mRNA が有意に減少したが、ANG mRNA は HIF-1 $\alpha$  siRNA の影響を受けなかった。

HIF-1 $\alpha$  の安定化が ANG および VEGF の mRNA 発現に及ぼす影響について調べるために、プロリルヒドロキシラーゼの競合的阻害剤であるジメチルオキシロイルグリシン(DMOG)を用いた。hPDLFs を 1 mM の DMOG を含む  $\alpha$ -MEM で通常環境で 24 時間培養した後、ANG および VEGF の mRNA 発現を RT-qPCR で調べた。その結果、DMOG を加えた hPDLFs の ANG および VEGF mRNA 発現は有意に増加した。

低酸素曝露した hPDLFs について、プロモーター領域のメチル化レベルの変化が血管新生因子の転写調節に及ぼす影響を調べる目的で hPDLFs からゲノム DNA を抽出し、ビーズアレイを用いて網羅的 DNA メチル化解析を行った。その結果、低酸素曝露した hPDLFs の ANG および VEGF の各プロモーター領域に位置する CpG サイトで脱メチル化の亢進が認められた。

本研究において、低酸素環境で hPDLFs における ANG および VEGF の mRNA 発現の増加、ならびにこれらのタンパクの増加がみられたが、hEMBFs では変化がみられなかった。また hPDLFs の低酸素曝露で HIF-1 $\alpha$  mRNA レベルは変化しなかったが HIF-1 $\alpha$  タンパク発現が増加した。これらの結果は、低酸素環境での HIF-1 $\alpha$  タンパクの安定化が下流遺伝子の転写活性の上昇に重要であることを示している。DMOG によるプロリルヒドロキシラーゼ不活性化後にみられた HIF-1 タンパクの蓄積によってもこの機序が説明できる。さらに、サイトカインアレイならびに蛍光免疫染色によっても、低酸素環境が hPDLFs での ANG および VEGF タンパク発現を増加させることが確認された。また低酸素環境による ANG および VEGF プロモーター領域の CpG サイトでの脱メチル化の亢進は、各プロモーター領域への転写因子の結合を促進している可能性がある。このような HIF-1 シグナル伝達の活性化に依存した ANG および VEGF 産生の上昇は、外傷などによって損傷した組織の回復に有利に働いていると考えられる。