

## 論文審査の結果の要旨

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ジオゲニンと VEGF の発現を増加させる)

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

細胞を低酸素に曝露すると Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)が活性化する。歯根膜線維芽細胞についても、低酸素暴露により HIF-1 が活性化し、血管内皮細胞成長因子(VEGF)の産生を促進することが知られている。一方、アンジオゲニン(ANG)も血管内皮細胞の増殖を促すことが知られているが、現在のところ低酸素環境が歯根膜での ANG 産生にどのように影響するのかは不明である。そこで本研究は、低酸素環境が歯根膜線維芽細胞の血管新生因子産生に及ぼす影響、さらに血管新生因子の産生に対して HIF-1 $\alpha$  がいかなるメカニズムで関与しているかを明らかにすることを目的とした。

本研究では、ヒト乳歯由来の不死化歯根膜線維芽細胞(hPDLFs)とヒト胚由来の不死化線維芽細胞(hEMBFs)を用いた。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。低酸素曝露については、アネロパック・ケンキ 5%を用いて酸素濃度 0.1% 以下、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の低酸素環境を作り、37°Cで 24 時間培養した。

低酸素曝露した細胞について ANG, VEGF, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), および HIF-1 $\alpha$  の遺伝子発現を RT-qPCR 法にて検討した。続いて HIF-1 $\alpha$  タンパク発現をウエスタンブロット法にて調べるとともに、hPDLFs の培養上清中の血管新生因子量をヒトサイトカインアレイキットで測定した。また、低酸素曝露した hPDLFs について二重免疫蛍光染色を行い、HIF-1 $\alpha$ , ANG および VEGF の発現と局在を調べた。さらに、HIF-1 $\alpha$  siRNA を含む培地で hPDLFs を 5 時間培養し、そののち 24 時間低酸素曝露して ANG および VEGF の mRNA 発現を RT-qPCR で測定した。また、hPDLFs を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サリルグリシンを含む培地にて通常環境下で 24 時間培養後、ANG および VEGF の mRNA 発現を調べた。さらに、低酸素曝露した hPDLFs からゲノム DNA を抽出し、ビーズアレイを用いて DNA メチル化解析を行った。

上記の研究により、以下の新知見を得た。

1. 低酸素環境で、hPDLFs における ANG および VEGF の mRNA 発現の増加、ならびにタンパクの増加がみられた。また HIF-1 $\alpha$  mRNA 量には変化がみられなかったが HIF-1 $\alpha$  タンパクが増加した。
2. 低酸素環境における hPDLFs での ANG および VEGF の発現上昇には HIF-1 $\alpha$  タンパクの安定化が重要であり、低酸素によるプロリルヒドロキシラーゼの不活性化が HIF-1 $\alpha$  タンパクの安定化に大きく影響していることが示唆された。
3. 低酸素曝露により hPDLFs の ANG および VEGF の各プロモーター領域において脱メチル化の亢進が認められたことから、DNA の脱メチル化が ANG および VEGF の発現上昇に関与していることが示唆された。

以上のように、本研究は低酸素環境における歯根膜線維芽細胞の血管新生因子産生とその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する歯科臨床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