

## 論文の内容の要旨

氏名：中村 茂人

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Ribosomal stress couples with the hypoxia response in Dec1-dependent orthodontic tooth movement

(歯列矯正における低酸素応答性 Dec1 およびリボソームタンパクの意義)

歯周靭帯由来線維芽細胞 (Periodontal ligament fibroblasts: PDLF) は、新しいコラーゲン様タンパクを分泌することにより、種々の細胞に分化し、自然免疫能を調節する重要な細胞であることが示されている。PDLF は、機械的感受性が高く、機械的刺激を生物学的シグナルに変換し、歯槽骨と歯周組織のリモデリングを引き起こす。すなわち、PDLF は、歯列矯正 (Orthodontic tooth movement: OTM) や、歯槽骨の恒常性維持における機械的刺激に効果的かつ迅速に適応することが知られている。OTM によって誘導される生物学的および生体力学的応答には、歯周組織および歯槽骨のリモデリング中の転写因子の制御、細胞シグナル伝達経路、形態形成回路、および免疫系の炎症メディエーターが関与する。OTM の初期段階では、炎症誘発性サイトカイン IL-1 $\beta$  が歯槽骨のリモデリングに関与する。M1 マクロファージは、iNOS と TNF- $\alpha$  を分泌して炎症と歯槽骨吸収を促進し、結果的に OTM 効果を改善する。すなわち、炎症性マクロファージは、歯槽骨吸収を促進することにより OTM に影響を与える。

OTM における局所の微小環境は、血液供給の減少により一時的な低酸素状態になり、リモデリングを引き起こすが、低酸素微小環境は、骨再生プロセスに必要な条件である。低酸素誘導性転写因子 HIF-1 $\alpha$  は破骨細胞の活性化に関与するため、HIF-1 $\alpha$  欠失マウスでは海綿骨量が減少する。細胞増殖やアポトーシスの調節などに関与する Differentiated embryonic chondrocyte gene 1 (Dec1/bHLHE40/Stra13/Sharp2: Dec1) 発現は、低酸素状態で発現誘導されることから、OTM で生じる歯に矯正力を加えたときの圧迫側での虚血に伴う低酸素状態での Dec1 の低酸素応答の経路を解析することは有意義だと考えられる。物理的ストレスは、OTM における生体力学的な一般的なイベントである。熱ショックタンパク質 (Heat shock proteins: HSP) は、熱や低酸素刺激などの病的ストレスに応答する複数の保存された細胞保護タンパク質ファミリーを構成する。複数の HSP が OTM に関連することは既知の事実であり、その中で、歯列矯正力を与えた後のマウス PDL における HSP27 発現亢進とそのリン酸化が報告されている。

OTM 下の PDLF で特徴的に発現する遺伝子 (Differentially expressed genes; DEG) の同定は、OTM に関与する分子メカニズムと生物学的機能の理解を深めるために重要であるため、本研究では、ヒト歯牙に関連する単一細胞解析のデータセットである GSE164157 を Gene expression omnibus (GEO) データベースからダウンロードし、解析した。遺伝子機能オントロジーと KEGG 関連解析、およびその後の共発現ネットワーク分析により、PDLF の低酸素応答遺伝子を探索した。その結果、最も強く関連性が示唆された DEG がリボソーム関連タンパク質であった。リボソームは、主にリボソーム関連タンパク質で構成されており、それらの発現パターンはマウス胚性幹細胞で変化することが知られている。リボソームタンパク質は翻訳プロセスにおいて基本構造として機能しており、その異常は貧血を引き起こす可能性が示唆されている。また、RPL6 の発現低下は、胃がんの増殖抑制に、RPS7 は p53-MDM2 相互作用や MAPK および PI3K/AKT シグナル伝達において重要な役割を果たすことが知られている。環境ストレス刺激は遺伝子発現を調節し、リボソーム関連タンパク質のリボソームとの結合を促進するため、リボソーム生合成の機能障害の直接的な結果としてリボソームストレスが発生する。

種々の機械的刺激による *in vitro* 細胞実験や、遺伝子改変マウスは OTM 研究で使用されており、特に遺伝子改変マウスモデルは、OTM の多細胞機能の理解を大幅に改善してきた。本研究は、(i) OTM に関わる低酸素環境下 PDLF における HSP 制御、(ii) 低酸素環境下 PDLF におけるリボソームタンパク質の意義、(iii) HIF-1 $\alpha$  トランスジェニックマウスにおける低酸素応答遺伝子とリボソームタンパク質発現の意義、(iv) OTM による遺伝子制御における低酸素応答遺伝子の機

能, および (v) 歯列矯正の環境下で機能する環境ストレス (低酸素, 熱ショック, 炎症, リボソームショック) 間のクロストークを解明することを目的とした。PDLF の低酸素応答解析に, HIF-1 $\alpha$  トランスジェニックマウスとコントロールマウスを使用した。また, OTM の *in vivo* モデルとして, Dec1 ノックアウト (*Dec1KO*) および野生型同腹仔 (C57BL/6)(WT) マウスを使用した。OTM 刺激されていない反対側の歯牙を, コントロールとした。マイクロコンピューター断層撮影法 (マイクロ CT), 脱灰, 免疫組織化学および免疫蛍光法にて, マウスの顎組織を調べた。In vitro では, PDLF を 2, 4, 6, 24, 48 時間圧縮力にさらした。圧縮力下でのさまざまな遺伝子発現プロファイルと, リボソームタンパク質発現に対する Dec1 ノックダウンの影響を, qRT-PCR とウェスタンブロッティングによって解析した。最初にバイオインフォマティクス分析により, PDLF の低酸素応答に関与するリボソームタンパク質を特定した。HIF-1 $\alpha$  トランスジェニックマウスにおいて, コントロールマウスと比較すると, Dec1, HSP105, および多くのリボソームタンパク質の発現レベルが上昇していた。WT OTM マウスでは, PDLF で Dec1 発現の増加が観察された。マイクロ CT 分析では, WT OTM マウスと比較して *Dec1KO* OTM マウスで移動距離が短い (移動が遅い) ことが示唆された。リボソームタンパク質の染色の程度は, *Dec1KO* OTM マウスと比較して WT OTM マウスで著しく増加していた。HSP105 および IL-1 $\beta$  の発現レベルの上昇により WT OTM マウス PDLF のストレス応答への関与が示唆された。Dec1 抑制により, 低酸素環境下 PDLF におけるリボソームタンパク質発現が有意に抑制された。

これらの結果から, OTM における低酸素環境で, 歯周組織の恒常性維持に重要な Dec1 およびリボソームタンパク質が重要な役割を果たしている可能性が初めて明らかになった。本研究では, 動物モデルを使用して, *in vivo* での Dec1 およびリボソームタンパク質の潜在的な重要性を明らかにした。また, 骨代謝へのエストロゲンの影響を排除するためにオスのマウスを使用した。さらに, 実験的な歯牙の移動が *Dec1KO* マウスで遅れていることを初めて明らかにし, 機械的ストレスを受けている PDLF における細胞保護機構を解析するための *Dec1KO* マウスモデルの有用性を示した。マイクロ CT 解析は, *Dec1KO* OTM マウスでは WT OTM マウスと比較して歯牙移動が遅いことを明らかにし, 歯牙移動における Dec1 の重要性を示した。歯牙の移動における Dec1 機能を詳細に解明するためには, OTM 中の Dec1 タンパク質または Dec1 モノクローナル抗体の局所的または系統的な適用による骨リモデリング調節への影響を検討することは興味深い。歯周炎に関するこれまでの報告では, *Dec1KO* マウスは機械的ひずみに対する感受性が低いことも示唆されており, Dec1 は歯列矯正治療に関連する歯周組織障害リスクを軽減するための新たな治療標的となる可能性があり, 今後のさらなる包括的な解析が期待された。