

研究者：宮寄 彩（所属：徳島大学病院 小児歯科）

## 研究題目：機械的ストレスによって誘導される低酸素誘導因子 HIF1a が象牙芽細胞の分化に与える影響とそのメカニズムの解明

### 目的：

私たちの身体は、常に外界からの様々な刺激を受けており、その刺激を認識・応答することにより恒常性を維持する。機械的ストレスに応答する組織や細胞は運動骨格系に限らず生体内のすべての細胞が有しており、もちろん歯も例外ではない。歯の場合、代表されるのは象牙細管の内圧の変化により象牙質の追加的な添加形成が起きることである。しかしながら、このような機械的ストレスに応答し、細胞動態が変化するその詳細な分子機転については不明な点が多い。

機械的刺激は様々な種類が存在するが、細胞や組織は細胞外液に囲まれていることから、申請者はその分子機転には細胞が感知するごく初期の微弱な圧の変動によって発生する静水圧が重要ではないかと考えた。これまでの研究で、機械的ストレスによって圧受容体である PIEZO1 が働き、象牙芽細胞の分化を促進していることを明らかにした（Miyazaki et al. 2019）。しかし、PIEZO1 の下流での細胞内分子機構については、いまだに詳細は分かっていない。今回申請者は、キーファクターとして HIF1a に注目し、さらなるその影響とメカニズム解析について検討を行うこととした。

低酸素誘導因子 HIF1a は、機械的ストレスに対し、骨格の発達における骨の恒常性と骨形成において、重要な役割を果たすことが最近になり報告されるようになったが、いまだに象牙質形成への関与については報告は乏しい。

本研究では再生医療のソースとしても期待されている脱落乳歯歯髄幹細胞 SHED を用いて、静水圧下で誘導される象牙質形成の分子メカニズム解明を行うことを目的とした。

### 対象および方法：

静水圧は、100ml ビーカーの底に 35mm ディッシュを置き、培養液の高さを 5cm と設定して、約 3.7mmHg（約 0.5kPa）の圧を負荷して細胞を培養する（図 1）。

使用する細胞は、通常の診療において交換期の乳歯の抜歯が必要な本人およびその保護者に研究に関する説明を行い、同意を得た患児から抜去歯の提供を受け、抜去歯の歯冠部歯髄より間葉系幹細胞である脱落乳歯歯髄幹細胞（Stem cells from human Exfoliated Deciduous teeth: SHED）を分離し使用する（徳島大学病院医学系研究倫理委員会の承認を得て実施）。SHED は、多分化能をもつ間葉系幹細胞であり、象牙芽細胞に分化するモデルである。

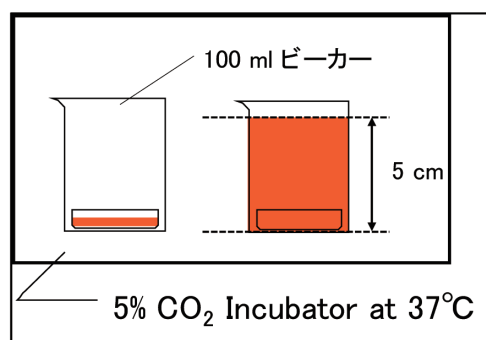


図 1

## 1. 静水圧下における HIF1a の発現解析

機械的ストレスの1つである静水圧を加えた状態で、HIF1a が影響を受けるかを評価するために、qPCR を使用し mRNA を分析する。また、HIF1a は核に移行することで活性化するため、免疫組織学的染色法を使用することでタンパク質の分布を評価する。

## 2. PIEZO1 刺激下における HIF1a の発現解析

圧受容体である PIEZO1 の下流において、HIF1a が影響を受けるかを評価するために、上記と同様に qPCR を使用し mRNA の発現、さらに免疫組織学的染色法を使用しタンパク質の発現を分析する。

### 結果および考察：

#### 1. 静水圧下での HIF1a の発現解析

24 時間静水圧負荷下において、mRNA level で *HIF1a* の発現が有意に増加した (図 2)。また、免疫組織学的染色法を用いてタンパク質の発現を確認すると、Control に比べ、静水圧負荷下で HIF1a が核に移行する傾向があることがわかった (図 3)。このことより、静水圧下における細胞分化に HIF1a が関係していることが示唆された。

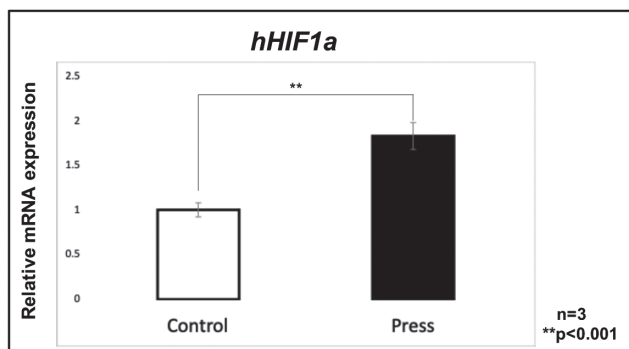


図 2

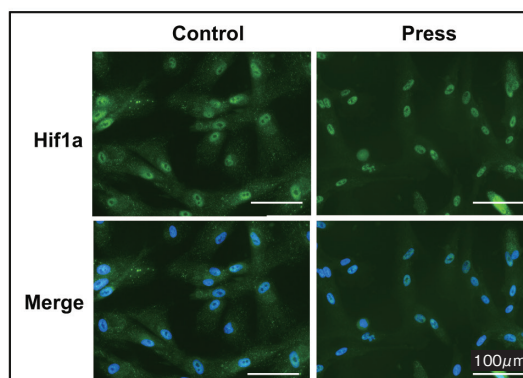


図 3

#### 2. PIEZO1 刺激下での HIF1a の発現解析

RNA サイレンシングを用い、PIEZO1 を阻害すると、24 時間静水圧を負荷しても mRNA level で *HIF1a* の発現が抑制された (図 4)。加えて、PIEZO1 の活性化剤である YODA1 を用いて 24 時間刺激すると、mRNA level で *HIF1a* の発現が有意に増加した (図 5)。さらに、免疫組織学的染色法を用いてタンパク質の発現を確認すると、Control に比べ、YODA1 添加によって HIF1a が核に移行する傾向があることがわかった (図 6)。このことより、PIEZO1 が、HIF1a の発現や活性に影響を与えていることが示唆された。

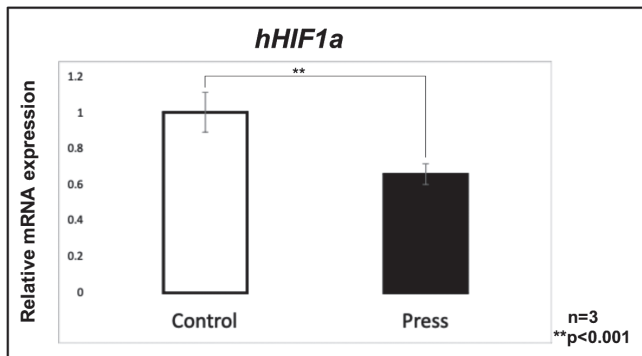


図 4

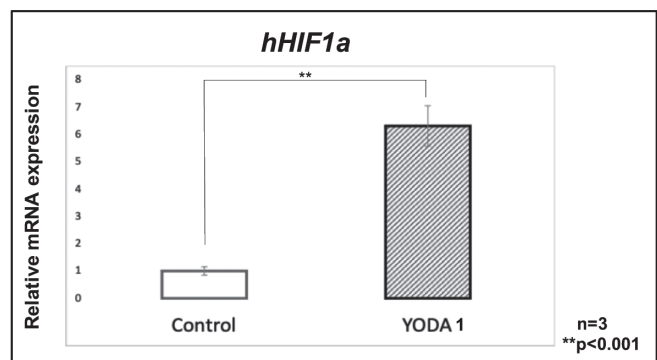


図 5

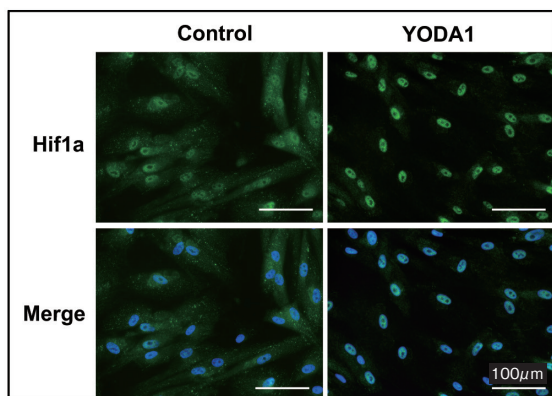


図 6

以上の結果より、圧受容体である PIEZO1 の下流で HIF1a が影響を受け、象牙芽細胞の分化に関わっていることが示唆された。これまでの研究で、機械的ストレスによって圧受容体である PIEZO1 が働き、その下流で機械的ストレスに対するアンテナと示唆される Primary cilia の発現誘導、そして細胞分化に重要な転写因子である RUNX2 の核移行促進と骨の分化にも関係が深い WNT16 の発現を誘導し、象牙芽細胞の分化を促進していることを明らかにした (Miyazaki et al.

2019)。HIF1a は、骨形成や象牙質形成に重要な  $\beta$ -actin との関わりについて多く報告されている。そういったことから、HIF1a が上記の流れにおいてどこに位置付けされるのかについて、さらに解析を行っていく。

今後は、低酸素環境を作り出すことが可能な培養機器を利用し、細胞を配置し実験を行う。加えて、カルシウムイオンチャネルである PIEZO1 との関係を検討するために、培地によってカルシウムイオンの有無を操作し、分化マーカーの発現や活性を qPCR 法、ウェスタンブロット法を用いて、さらにその分子メカニズムを精査する予定である。

**成果発表：** (予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

日本小児歯科学会で発表予定