

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792160

研究課題名（和文）ヒストンアセチル化調節食品成分による歯周炎骨破壊予防法の開発

研究課題名（英文）Development of methods to prevent alveolar bone absorption during periodontitis using epigenetic regulation

研究代表者 津田 啓方 (TSUDA HIROMASA)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60325470

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱アセチル化酵素および、ヒストンメチル化酵素の阻害剤をマウスマクロファージ様RAW264.7細胞に作用させる事により、RANKL誘導破骨細胞分化が抑制されることが判った。また、RANKLにより細胞死が誘導され、上記阻害剤が濃度依存的に抑制したが、細胞増殖を大きく抑制しなかった。さらに、このRANKL誘導の細胞死はネクロシス様の細胞死がほとんどで、アポトーシス様の細胞死はほとんど観察出来なかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined a hypothesis that modulation of histone acetylation or methylation may also have some effect on the osteoclast differentiation. RANKL treatment induced the number of multinucleated osteoclast-like cells and the TRAP activities. Both histone deacetylase and methyltransferase inhibition decreased the number of RANKL-induced osteoclast-like cells and TRAP activities in a dose-dependent manner. During the experiments, we also observed that RANKL treatment induced Raw264.7 cell death and the histone-deacetylase or histone methyltransferase-inhibitor dose-dependently suppressed the RANKL-induced cell death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化、細胞死、破骨細胞、予防法

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本国民の約 1/3 が高度かつ不可逆的な歯槽骨吸収を伴う歯周炎罹患患者であり、この歯槽骨吸収の抑制により歯の喪失を予防する方法論が強く望まれていた。

(2) ヒストンアセチル化やメチル化等のエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が存在し、ヒストンアセチル化阻害剤等が破骨細胞分化を抑制するという知見が存在していたが、そのメカニズムは全く明らかになっ

ていなかった。

(3) エピジェネティックな遺伝子発現調節機構をコントロールする因子がある種の食品等の成分に含まれていることが判っていた。

上記(1)～(3)から、食品成分を用いたエピジェネティック制御による歯周炎骨破壊予防法を開発出来ると考えていた。

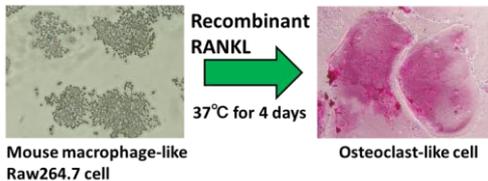
2. 研究の目的

上記、「1. 研究開始当初の背景」に記載した内容により、食品成分を用いたエピジェネティック制御による歯周炎骨破壊予防法開発の可能性があった。本研究では、そのための基礎データを取得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞に 50 ng/mL マウスリコンビナント RANKL を 37°C で 4 日間作用させると破骨細胞様の多核かつ巨大な TRAP 陽性細胞を誘導出来る。この実験系に、阻害剤等の様々な因子を作用させ破骨細胞様細胞の変化を顕微鏡にて観察した。なお、観察前には TRAP 染色を施した (図 1)。

図 1



(2) 細胞死の定量は、intact な細胞膜非透過性の SYTOX Green 色素を用いて行った。SYTOX Green 色素は、細胞死により細胞膜が破壊されると、核内の DNA にインターカレートすることにより強い緑色蛍光を発する色素である。

(3) 細胞増殖の定量は、上記(2)の SYTOX Green 色素を用いた細胞死アッセイを改良することにより行った。(1)の実験系における 0、2、4 日後の細胞を凍結することにより、細胞膜を破壊し、そこに SYTOX Green 色素を加え、蛍光を測定することにより、各時点での細胞数を定量した。

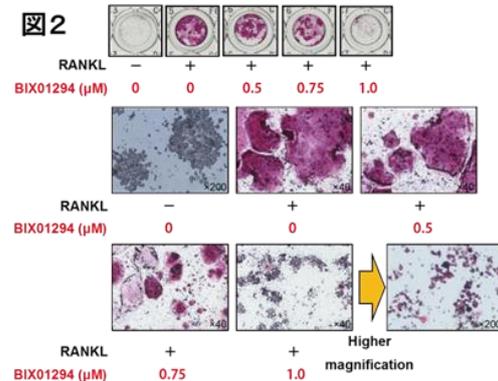
(4) アポトーシスの判定は、Annexine V-FITC (緑色蛍光) を用いて細胞膜上のフォスファチジルセリンの再配分を蛍光顕微鏡にて観察することにより行った。ネクローシス様の細胞死判定は、propidium iodide (PI) による染色を行った。PI は SYTOX Green と同様の機序で働くが、赤色蛍光を呈色する。

4. 研究成果

(1) まず、ヒストンアセチル化、メチル化の破骨細胞分化への影響を調べる為に、図 1 に示した実験系に HDAC 阻害剤である酪酸お

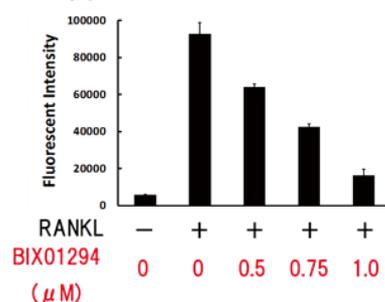
よびヒストンメチル化酵素 G9a の特異的阻害剤である BIX01294 をそれぞれ作用させたところ、どちらも濃度依存的に RAW264.7 細胞の破骨細胞分化を抑制した (図 2、以下、BIX01294 のデータのみ示す)。

図 2



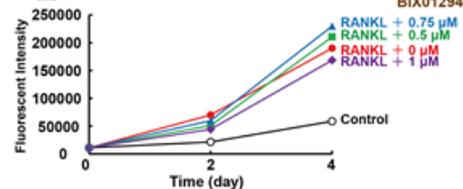
(2) 上記(1)における破骨細胞分化抑制のメカニズムとして、阻害剤による細胞死の誘導をまず疑い、細胞死アッセイを行った。ところが、予想に反して、RANKL 刺激にて細胞死が起こり、BIX01294 はその RANKL 誘導の細胞死を濃度依存的に抑制した (図 3)。

図 3



これらの阻害剤が RAW264.7 細胞の増殖を極度に抑制したために、阻害剤刺激時は細胞死の影響が小さく現れた可能性が考えられたので、細胞増殖における BIX01294 の影響を調べた。その結果、RANKL 刺激により細胞増殖は亢進し、破骨細胞分化に影響を及ぼした濃度での BIX01294 刺激では RANKL 誘導細胞増殖を抑制しなかった (図 4)。

図 4

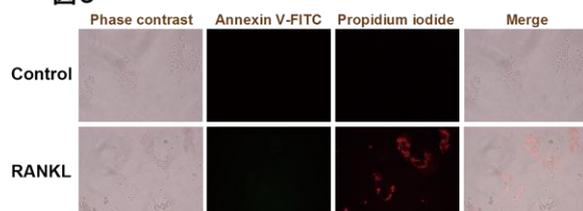


1 μM 濃度の BIX01294 では、若干 RANKL 誘導細胞増殖を抑制した結果になったが、細胞死アッセイにおけるコントロール (RANKL 未刺激) における細胞死量と同濃度 (1 μM) における細胞死量との間に差がほとんど認められないことから、BIX01294 における細胞増殖

の若干の抑制は無視出来る範囲であると考えられた (図4)。

(3) BIX01294 による破骨細胞分化抑制メカニズムを探る為に、次に RANKL 誘導の細胞死の種類を調べる事とした。RANKL 誘導では、細胞膜上のフォスファチジルセリンの再配分はほとんど観察出来なかった (図5)。また、汎カスパーゼ阻害剤である

図5



z-VAD-FMK を作用させ、アポトーシスを阻害した条件で、細胞死量を確認したところ、細胞死量は減少しなかった (データ未掲載)。さらに、PI 染色では多くの死細胞が確認された (図5)。このことから、RANKL 誘導で起こる細胞死はネクローシス様の細胞死であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

① H Tsuda, K Imai, K Ochiai, N. Suzuki
Histone methyltransferase inhibition reduces RANKL-induced death of RAW264.7 cells
89th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. Convention Center in San Diego (California, USA), 18 Mar, 2011

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 啓方 (TSUDA HIROMASA)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号 : 60325470

