

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：13101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22791873  
 研究課題名（和文）エピジェネティクス制御を用いた細胞工学的手法による新規骨造成法の開発  
 研究課題名（英文）Development and Evaluation of Novel Bone Augmentation Strategy through Cellular Engineering Using Epigenetic Regulation  
 研究代表者  
 秋葉 陽介（AKIBA YOSUKE）  
 新潟大学・医歯学系・助教  
 研究者番号：70547512

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱アセチル化阻害剤（HDACI）はクロマチン代謝を介して転写活性を上昇させる。本研究の目的は HDACI を用いた骨形成性細胞への分化極性付与による効率的な骨造成法の検索、その機序の解明、および HDACI の腹腔内投与による全身の骨代謝への影響の検索である。HDACI 処理細胞群は対照群と比較して優位な石灰化像を示し、HDACI の全身投与群では対照群に比較して良好な骨形成が見られた。

研究成果の概要（英文）：Histone deacetylase inhibitor (HDACI) increases transcriptional activity through chromatin remodeling regulation. In this study, we investigated the possibility and mechanism of bone augmentation mediated by osteogenic cells treated with HDACI and systematic administration effect of HDACI on bone metabolism.

HDACI treated cells showed higher mineralization ability than control. HDACI administration induced faster bone formation and bone defect healing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系

キーワード：エピジェネティクス・骨造成・HDACI・骨再生医療

1. 研究開始当初の背景

補綴主導のインプラント治療という概念が広く浸透し、その成功率は非常に高い。しかし、植立部位の骨量が少ない

場合、オッセオインテグレーションに問題がなくとも長期的にはインプラント周囲の骨が破壊される可能性がある。骨量が不足すると思われる部位に植立し

たインプラントの生存率は88.2%と低く、垂直性の骨吸収を伴うインプラント周囲炎は一度惹起されると食い止めることは非常に困難で、失敗原因のひとつとして知られる。骨造成材料のうち自家骨には採取量や患者への外科的侵襲が問題となり、他家骨、同種骨、異種骨、合成骨、代用骨は骨形成能を有していない。骨形成能を賦活化した細胞を応用した骨造成法の開発はインプラント治療の予知性をさらに高め、長期的かつ良好な生存率に大きく寄与するものと考えられる。一方、HDACIは、クロマチンを活性化状態に保ち遺伝子発現を上昇させることが知られている。代表者は神経幹細胞培養系、脳切片培養系にHDACIを加え、神経幹細胞、未分化神経細胞のチロシン脱水酵素 (TH) を誘導、ドーパミン産生細胞への分化極性を付与し成熟を促進することに成功している。骨代謝関連シグナル伝達系においてHDACIはSmurf1抑制、P300を介したRunx2の活性化を経て骨芽細胞の分化・成熟を促進および骨形成を促進し、RANKL誘導性のNFATc1核内移行のブロック、TNF- $\alpha$ 、NF $\kappa$ - $\beta$ 活性の抑制により破骨細胞の生成・分化を抑制し、p21<sup>WAF</sup>による破骨細胞のアポトーシスを促進することが知られている。HDACI処理された間葉系未分化細胞培養系は骨芽細胞への分化極性を付与されることで骨形成系細胞率、骨形性能、骨形成速度が有意に高いことが予想される。骨誘導因子などの成長因子は骨造成に重要な生理活性物質であるがその感受性は物質ごとに異なり、エピジェネティクス制御の可能性が考えられる。近年HDACIマウス腹腔内投与による長期記憶の増強も観察されており、

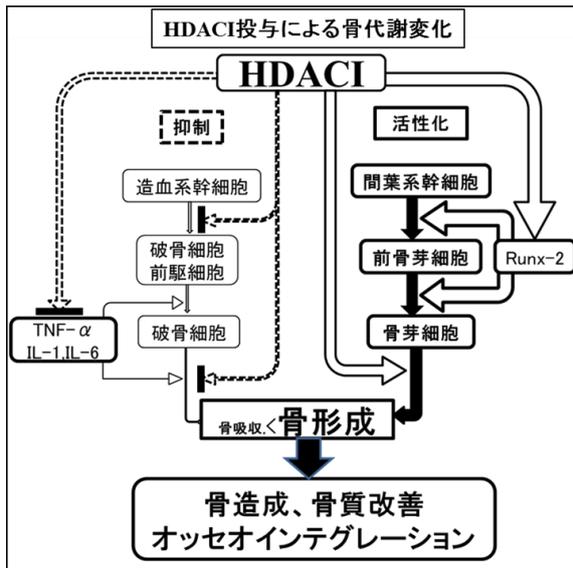
HDACI全身投与による各種骨形成シグナル、生理活性物質に対する感受性増強の効果も期待できる。HDACIは悪性腫瘍に対する低侵襲治療への応用研究が進んでおり、すでに抗てんかん薬として臨床応用されている薬剤でもある。これらのことが、本研究の着想に至った経緯である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDACI) を用いたエピジェネティクス制御により、骨形成系細胞の分化を誘導し新たな骨造成法を確立することである。HDACIはクロマチンリモデリングにおいて、クロマチンを活性化状態に保ち転写活性を促進し遺伝子発現を上昇させる。HDACIを用いた細胞分化極性の制御は、従来の遺伝子導入や成長因子添加よりも上位にあり、細胞世代を超えて継承されうる塩基配列の変化を伴わない制御機構で、操作が非常に簡便であるばかりではなく、反応速度が非常に速く、また安全性が期待できることから、臨床応用での優位性は非常に高いと考えられる。

我々の研究結果から、HDACIは神経幹細胞、未分化神経細胞の分化成熟を促進することが分かっており、この技術を間葉系幹細胞、未分化骨芽細胞に応用することで、HDACIによって分化極性を付与された骨形成性細胞による骨造成の可能性と機序を明らかにする。更にHDACIの腹腔内投与を行い、全身における骨代謝の影響を検索する。

これらの研究から骨欠損修復、インプラントを目的とした骨造成におけるHDACIの局所的、全身的な臨床応用への可能性について明らかにする。



### 3. 研究の方法

#### [培養細胞実験]

#### 分化極性付与培養細胞系確立

ラット各部より未分化間葉細胞採取、培養し、HDACI 処理系と非処理系の HDACI 反応性、分化誘導に対する反応性について検討を行った。ラット大腿骨骨髓由来細胞 (BMC)、頭蓋骨骨膜由来細胞 (PDC)、歯根膜 (PDLC)、歯髓由来細胞 (DPC) を採取、培養、またマウス骨芽細胞用細胞株 MC3T3 を継代培養し、播種後、骨分化誘導培地+HDCAI (HDACI 処理群 VPA : valproic acid, TSA : trichostatin A)、骨分化誘導培地 (対照群 : Ctrl) にて培養し骨化誘導 3, 7, 14, 21 日後のサンプルを採取、Alizarin Red 染色を用いた染色による石灰化解析、Picrosirius Red 染色による細胞外マトリクス解析を行った。また、培養細胞より RNA を抽出し、RT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。

#### [全身投与実験]

HDACI の全身投与に対する骨代謝変化と骨欠損修復速度変化の検索

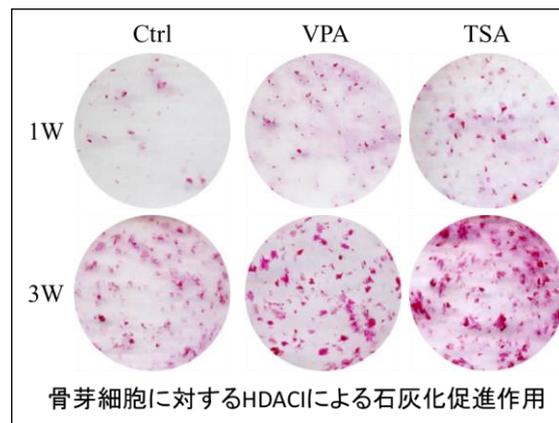
HDACI の全身投与の影響について、HDACI 投与系、非投与系ラットの血清中骨代謝

マーカーを測定、骨造成、骨吸収の動態の変化を検索。またラット上顎骨、に円筒形骨欠損 (骨欠損形成モデル) を作成し、創傷治癒過程を組織学的に観察し、骨造成の速度や様式を検索した。生後 4 週齢ラットの上顎第一大臼歯を抜歯、3 週間後より腹腔内に各種 HDACI を投与、第一大臼歯相当部に円筒形骨欠損を作成した。骨欠損形成後、上顎骨、血清を採取、上顎骨は  $\mu$ CT による画像解析を行い固定脱灰後に組織学的検索評価も行った。

### 4. 研究成果

(1). HDACI の骨形成系細胞に対する石灰化促進作用

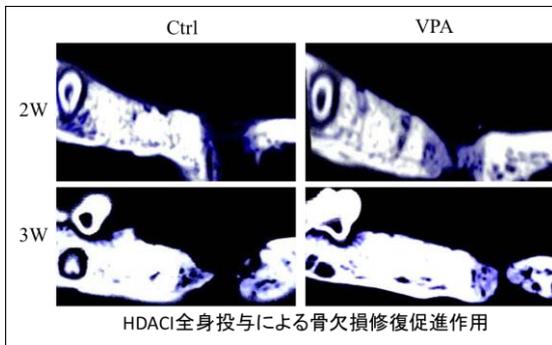
マウス由来骨芽細胞様細胞株 (MC3T3 細胞) は VPA, TSA 処理により対照群と比較して有意な石灰化の上昇を示した。さらにラットより採取した体各部の細胞培養系に対し HDACI 処理を行ったところ、大腿骨骨髓由来細胞 (BMC)、頭蓋骨骨膜由来細胞 (PDC)、歯根膜 (PDLC)、歯髓由来細胞 (DPC) のいずれにおいても対照群に比較して有意な石灰化の上昇を示した。



(2). HDACI の全身投与による骨欠損修復促進作用の検索

H-E 染色した組織像から HDACI 全身投与を行った群と対照群とを比較すると、欠

損形成 7 日後より HDACI 投与群において有意に高い、新生骨形成能を示す像が観察される。更に  $\mu$ CT 画像から、14、21 日後において円筒形骨欠損修復速度の上昇が観察された。



本研究から HDACI の持つ骨形成能賦活化能の臨床における骨増成法への応用を示唆する知見が得られた。

#### 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 1 件)

- ① Akiba Y., Tomizuka K., Kaku M., Kawasaki M., Nagasawa M., Takano R., Uoshima K.: Analysis of patients visiting Niigata Medical and Dental Hospital with chief complaints of dental metal allergy and/or dental focal infection in the previous 8 years. The Indonesian Journal of Dental Research 1(2)97-103, 2011 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① Bhuiyan A. A., Akiba Y., Kaku M., Takano R., Uoshima K.: Histone Deacetylase inhibitors have osteogenic differentiation effect on periosteum and periodontal ligament cells. 平成 23 年度新潟歯学会第 2 回例

会, 新潟, 2011 年 11 月 12 日

- ② Bhuiyan A. A., Akiba Y., Kaku M., Takano R., Uoshima K.: Histone Deacetylase inhibitors have osteogenic differentiation effect on periosteum and periodontal ligament cells. 日本口腔インプラント学会第 41 回学術大会, 名古屋, 2011 年 9 月 17 日, 日本口腔インプラント学会誌 24:165 頁, 2011
- ③ Mamunur R. M., Akiba Y., Kaku K., Nagasawa M., Uoshima K.: Effect of Histone Deacetylase Inhibitor on bone regeneration in Rat. 120th Commemorative Scientific Meeting of Japan Prosthodontic Society (International Session) 第 120 回日本補綴歯科学会, 広島, 2011 年 5 月 20 日, 日本補綴学会雑誌 120:144 頁, 2011
- ④ Kaku M., Rosales JM., Akiba Y., Nozawa M., Uoshima K.: COL12A1 Gene Silencing Enhances Osteoblastic Differentiation of Human PDL Cells. IADR/AADR 89th General Session, San Diego, USA, 2011 年 3 月 15 日, J. Dent. Res 90(A);1531, 2011
- ⑤ Akiba Y., Mamunur R. M., Nagasawa M., Uoshima K.: Development and evaluation of zirconium-dioxide dental implant drill. IADR/AADR 89th General Session, San Diego, USA, 2011 年 3 月 15 日, J. Dent. Res 90(A); 3263, 2011
- ⑥ 加来賢, 秋葉陽介, ロサレス・マルセロ, 野沢恩美, 魚島勝美: 機械的刺激はコラーゲン分子の翻訳後修飾を介して歯根膜組織の安定化に寄与する. 口腔先端応用医科学研究会, 第 3 回学術会議, 東

- 京, 2011年1月22日
- ⑦ 秋葉陽介, 加来賢, 魚島勝美: ヒト口腔内由来幹細胞にヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた新規骨造成法に関する研究. 口腔先端応用医科学研究会, 第3回学術会議, 東京, 2011年1月22日
- ⑧ 秋葉陽介, 魚島勝美, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACI) を用いたエピジェネティクス制御による新規骨造成法に関する研究, 第27回 歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い, 東京, 2011年1月8日
- ⑨ Kaku M., Rosales JM., Akiba Y., Nozawa M., Uoshima K.: Type XII Collagen Modulates Matrix Formation and Mineralization on Human PDL Cells. International Joint Symposium on Oral Science, Bali, INDONESIA, 2010年12月17日
- ⑩ Rosales J.M., Kaku M., Akiba Y., Kawasaki M. Nagasawa M., Uoshima K.: Mineralization Ability of Periosteum Derived Cells. IADR/AADR 88th General Session, Barcelona, SPAIN, 2010年7月15日, J. Dent. Res 89(B);1732, 2010
- ⑪ Akiba Y., Kaku M., Nagasawa M., Bhuiyan A.A., Uoshima K.: Effect of HDACIs on mesenchymal stem cell in osteogenic differentiation. IADR/AADR 88th General Session, Barcelona, SPAIN, 2010年7月15日, J. Dent. Res 89(B);1013, 2010
- ⑫ 加来賢, 川崎真依子, 秋葉陽介, ロサレス・マルセロ, ラシッド・マムヌル, 魚島勝美: コラーゲン修飾酵素の特異的発現が機械的刺激による歯根膜組織の安定化を制御する. 第119回日本補綴歯科学会, 東京, 2010年6月12日, 日本補綴学会雑誌 119(2):210頁, 2010
- ⑬ 秋葉陽介, アルアミン=ブイアン, 川崎真依子, 加来賢, 魚島勝美: 間葉系幹細胞の骨誘導におけるヒストン脱アセチル化阻害剤の影響について. 第119回日本補綴歯科学会, 東京, 2010年6月12日, 日本補綴学会雑誌 119(2):205頁, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋葉 陽介 (AKIBA YOUSKE)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 70547512