

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462891

研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた歯髄保存療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of dental pulp preservation therapy using histone deacetylase inhibitor

研究代表者

川上 智史 (Kawakami, Tomofumi)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：00169682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄保存療法剤として水酸化カルシウム製剤が使用されている。しかし、その高いアルカリ性のため炎症反応や被蓋象牙質の質や形成に要する期間などを考慮すると、改善点は多い。一方、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)は、悪性腫瘍に対する分子標的薬剤として用いられているが、近年、骨芽細胞の骨形成を促進し、破骨細胞の分化を著しく阻害することが報告されている。本研究では、エピジェネティクス修飾に関わるHDACiのMDPC23細胞に対する分化誘導について検証した。HDACiは、MDPC23細胞の修復組織形成に参与している遺伝子発現の上昇、石灰化能を促進させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Calcium hydroxide agents have been widely used as pulp conservative treatment. Some improvements are required for the better quality of the formed dentin and the shorter times to dentin formation. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) involved in epigenetic modifications promoted osteoblastic differentiation and inhibited osteoclast differentiation. In this study, we examined whether HDACi promoted odontoblast differentiation in vitro. The results indicate that HDACis may promote differentiation of odontoblastic cells and induce their calcification. Some of HDACis may be useful agents for pulp conservative treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エピジェネティクス 歯髄保存療法剤 修復組織形成

## 1. 研究開始当初の背景

深在性のう蝕は、抜髄せず極力歯髄を保護する目的で歯髄保存療法を行うのが望ましい。現在、歯髄保存療法剤として水酸化カルシウム製剤を使用して、露髄面に硬組織形成を促進させる直接覆髄法が広く行われている。しかし、その高いアルカリ性のため生体局所での炎症反応や形成された被蓋象牙質の質や形成に要する期間などを考慮すると、改善点は多い。

多くの疾病の発症には素因や遺伝的要因をはじめとした内因と、環境因子である外因が関わっている。環境因子により影響を受ける遺伝子の表現系に、エピジェネティックな化学修飾がある。エピジェネティクスは、DNAの塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現が変化する現象であり、その代表的なものにDNAメチル化やヒストン修飾がある。これらのエピジェネティックな遺伝子の修飾は、これまでのところ悪性腫瘍に関わる研究が大半を占めている。修復組織形成能にエピジェネティックな修飾が関与しているかについての詳細は、明らかにされていない。一方、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は、悪性腫瘍に対する分子標的薬剤として用いられているが、近年、MS-275、バルプロ酸、トリコスタチン A、および酪酸などの HDACi は、細胞周期、血管新生および分化に影響を与えるだけでなく、骨芽細胞の骨形成を促進し、破骨細胞の分化を著しく阻害することが報告されている。

## 2. 研究の目的

HDACi が象牙芽細胞前駆細胞の修復組織形成に関与しているか詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、エピジェネティックな修飾に関わる HDACi の象牙芽細胞前駆細胞に対する分化誘導について検証した。

## 3. 研究の方法

### 1) 細胞培養および試薬調整

HDACi として MS-275 (MS; 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M), バルプロ酸 (VPA; 0.01, 0.1, 1, 10 mM), トリコスタチン A (TSA; 1, 10, 100, 1000 nM) および酪酸 (NaB; 0.01, 0.1, 1, 10 mM) を用いた。象牙芽細胞前駆細胞 (MDPC23) を 10% 牛胎児血清および 2% ペニシリン - ストレプトマイシン含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で培養した。

### 2) HDACi 添加による細胞の増殖測定

MDPC23 を 96 ウェルプレートに培養後 DMEM に HDACi を添加し、WST-1 試薬を用い、マルチプレートリーダーで吸光度を測定した。また、位相差顕微鏡により MDPC23 の細胞形態を観察した。

### 3) 遺伝子発現

各試薬を添加し培養した MDPC23 から Total RNA を抽出し、逆転写後 cDNA の合成、PCR 法および Real time PCR 法 (SYBR Green) を用いて mRNA の発現を確認した。ターゲット遺伝子は、修復組織形成に関与していると考えられる遺伝子 (Bmp2, Bmp4, Bmp6, Runx2, Alpl, Bglap, Spp1, Dspp, Dmp1) について解析した。

### 4) アルカリフォスファターゼ活性・石灰化の観察

各試薬を添加し培養した MDPC23 を用いてアルカリフォスファターゼ活性の評価を行った。また、石灰化の評価はアリザリン染色を行った。

### 5) ChIP

HDACi (MS-275 1 nM, VPA 1 mM, TSA 100 nM, 1 mM) によって遺伝子の比較的发現があった BMP-4 および BMP-6 遺伝子に対して ChIP (クロマチン沈降) 法を行った。Acetyl-Histone H3 抗体および Acetyl-Histone H4 抗体を用いた。ChIP で得られたサンプルを Real-time PCR を用い BMP-4 および BMP-6 の -200, -100,

+100, +200 の領域についてそれぞれ PCR プライマーを作成し、ヒストンのアセチル化の解析を行った。Cq 値より得られた Input% を比較した結果、Acethyl-Histone H3 抗体で ChIP を行った。

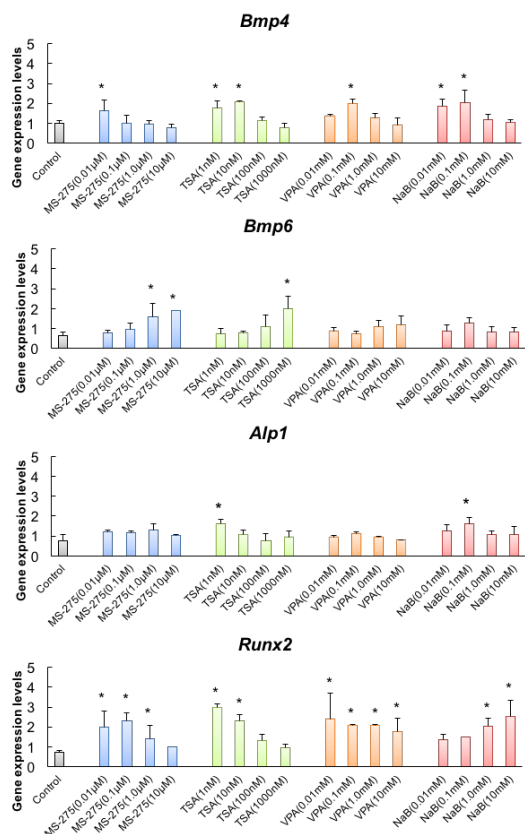
#### 4. 研究成果

##### 1) HDACi 添加による細胞の増殖測定

TSA を 1000 nM 添加した MDPC23 細胞はコントロールと比較して吸光度の差に有意差が認められ、減少していた。コントロールと他の MS-275, VPA および NaB の各濃度との吸光度の差に統計学的な有意差はみとめられなかった。

##### 2) 遺伝子発現

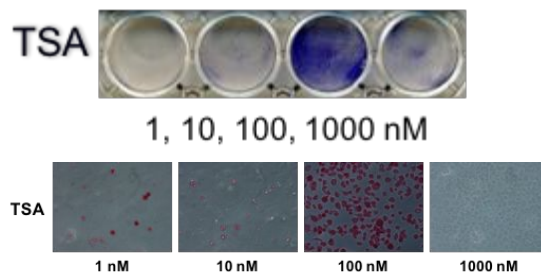
HDACi 添加によりコントロールと比較して Runx2, Alp1, Bmp4 および Bmp6 の遺伝子発現に増加が認められた。HDACi は、MDPC23 の修復組織形成に参与している遺伝子発現の上



昇させることが示唆された。

##### 3) アルカリフォスファターゼ活性・石灰化

の観察



HDACi は、MDPC23 のアルカリフォスファターゼ活性および石灰化を促進させることが示唆された。

##### 4) ChIP

TSA 群の BMP-4 遺伝子の -100 領域にコントロールと比較して Input% の差に統計学的な有意差を認めた。以上の結果から、TSA 100 nM にて BMP-4 遺伝子の発現上昇が認められたことおよびアリザリン染色でも染色されていたことから、とくに歯髄の再石灰への関与が推察された。

#### 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 2 件)

1) Osamu Uehara, Shamima Sultana, Koki Yoshida, Rie Takai, Fumiya Harada, Masato Saitoh, Tomofumi Kawakami, Takashi Saito, Yoshihiro Abiko, Itsuo Chiba: Histone Deacetylase Inhibitors Induce Differentiation in Preodontoblasts Cell Line, IADR 93th General Session and Exhibition, 2015.

2) シャミマスルタナ, 植原 治, 吉田光希, 川上智史, 安彦善裕, 斎藤隆史: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による象牙芽細胞前駆細胞株の分化誘導, 日本歯科保存学会秋期学術大会, 2014.

〔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

川上 智史 (KAWAKAMI, Tomofumi)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：00169682

##### (2) 研究分担者

植原 治 (UEHARA, Osamu)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：00709248

斎藤 隆史 (SAITO, Takashi)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：40265070

安彦 善裕 (ABIKO, Yoshihiro)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：90260819

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )