様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 １７ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2012～2013
課題番号：２４８９０１２２
研究課題名（和文）オッセオインテグレーションを制御するエピジェネティック機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of epigenetic regulation for osseointegration

研究代表者
高島　利加子（Takashima, Rikako）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：００６３２１１８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,300,000円、（間接経費）　690,000円

研究成果の概要（和文）：オッセオインテグレーションを制御するエピジェネティック機構の解明を試みた。骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞を用いBMP2過剰発現下でのチタン上での骨芽細胞分化の検討を行ったところ、Ｉ型コラーゲン、オステオカルシン、アルカリフォスファターゼの発現量はチタン単独、BMP2単独に比較して増加した。またオッセオインテグレーションに与える喫煙の影響を検討するためにニコチンを同様の実験系に添加したところ、それぞれの発現量は減少した。ヒストン修飾の検討では、BMP2単独に比較してBMP2過剰発現下でチタンを培養した場合、Ｉ型コラーゲンのヒストン３のリジン４の３重メチル化が促進していることが示された。

研究成果の概要（英文）：I tried to clarify the epigenetic regulation of osseointegration.Iexamined the osteoblast differentiation of osteoblast-like cell with titanium under the overexpression of BMP2.The result was that titanium with overexpression of BMP2 produced more increase of type I collagen,osteocalcin and alkaline phosphatase expression compared to titanium or BMP2 independently.Next,I investigated the impact of smoking on osseointegration.I did the same experiment by adding nicotine.Then,the expression level of type I collagen,osteocalcin and alkaline phosphatase were decreased.Furthermore I made a study of histone modification by Chip assay.I observed H3K9 of type I collagen promoter was more methylated in MC3T3-E1 cell with titanium and BMP2 than BMP2 independently.

研究分野： 歯科補綴学

科研費の分科・細目： 補綴系歯学

キーワード： エピジェネティック　オッセオインテグレーション

１．研究開始当初の背景

近年、歯牙欠損及び機能回復の一手段としてのインプラント治療は、その高い成功率から治療の確実性に疑う余地はなくその適応も増えている。しかしながら、臨床の現場においては術式に問題がないにも関わらずオッセオインテグレーション獲得までの期間に差が生じたり、最悪の場合にはオッセオインテグレーションを獲得できない患者がいるのもまた事実である。その原因として体質、力の関係など様々なものが考えられるが、生物学的見地からの報告は少ない。したがって、オッセオインテグレーションの分子メカニズム解明が強く望まれている。

一方、様々な生命現象における遺伝子の発現を制御する新たな機構の一つとして，エピジェネティックスの重要性が明らかになりつつある。エピジェネティックスとは DNA 配列によらない遺伝情報の発現制御であり、最も有名な例としてゲノムインプリンティングがある。これは、ゲノムそのものが活性化または不活化され、これが記憶として維持される。その結果遺伝子発現が恒常的オンまたはオフに制御され、個体差を生む原因となる。最近の知見から，このエピジェネティックスがヒトにおける様々な疾患や生命現象に深く関与することが明らかになっている。興味深いことに、従来までは環境要因と遺伝要因が複雑に関与することによって発症すると考えられてきた癌、生活習慣病さらには老化などがこのエピジェネティックスで証明できることが報告されている。例えば、胎生期～新生児期に、胎盤や母乳を介して曝された栄養環境に応じて DNA メチル化やヒストン修飾など､エピジェネティックスな変化が生じ、これが記憶として維持され、遺伝子発現パターンの個体差を生むことにより、成人期の肥満症や生活習慣病の罹患性に影響を与える可能性が注目されている。これらの概念に基づくと、オッセオインテグレーション獲得においてもエピジェネティックスが関与する可能性が高いが、そのオッセオインテグレーションとエピジェネティックスの関連性に関しては全く不明である。したがって、オッセオインテグレーションを制御するエピジェネティックスの解明は、オッセオインテグレーションの分子メカニズム解明に新展開をもたらすのみならず、患者により異なるオッセオインテグレーション獲得能の予測や新たなインプラント体の開発といった、インプラント治療の発展にも貢献すると考えられる。

２．研究の目的

インプラント治療の成否は、インプラント体と骨との強固なオッセオインテグレーションの獲得により決定されるが、その分子メカニズムは未だ不明である。近年、様々な疾患や生命現象において塩基配列に依存しない遺伝情報の発現制御、すなわちエピジェネティックスの重要性が明らかになっている。本研究の目的はオッセオインテグレーションを制御するエピジェネティックスの分子作用メカニズムを明らかにし、得られた研究結果をより有効なインプラント治療の開発への研究基盤とすることである。

３．研究の方法

（１）骨芽細胞のチタンプレート培養実験系の確立

本研究を遂行するにあたり、最も効率的かつ再現性を持ってチタンプレート上で石灰化する細胞株とチタンプレート処理の検討を行う。なるべくオッセオインテグレーションを再現するために、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を第一選択として使用する。

（２）骨分化マーカーの測定

BMP2 過剰発現下で MC3T3-E1 細胞をチタンプレート上にて培養し、骨芽細胞分化をアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン

ならびにタイプⅠコラーゲンの発現により評価する。またオッセオインテグレーションに対する喫煙の影響を調べるために同様の実験にニコチンを添加して行う。添加するニコチン濃度は１０^{-3}mol/l、１０^{-6}mol/l、１０^{-8}mol/l とした。用いるチタンプレートの種類に関しては JIS２種を用いる。

（３）チタン上での骨芽細胞石灰化におけるエピジェネティックな変化の検討実験

　上記（１）により確立された培養実験系を用いて、MC3T3-E1 細胞をチタン上で培養し骨芽細胞の分化マーカーであるⅠ型コラーゲンのエピジェネティック制御について検討する。様々なエピジェネティック制御機構の中で、最も解明が進んでいるヒストンのメチル化を ChIP アッセイにて網羅的に検討する。具体的には、発現を促進するヒストン H3 の 4 番目と 36 番目リジン残基（H3K4, H3K36）のメチル化、発現を抑制するヒストン H3 の 9 番目と 27 番目リジン残基(H3K9, H3K27)のメチル化それぞれの抗体を Abcam 社より購入し用いる。いずれの抗体も ChIP アッセイに使用可能であることを確認している。

上記のヒストンメチル化を骨芽細胞が未熟な時期と石灰化が亢進している時期で比較検討し、もっとも大きな変動が見られたヒストンメチル化機構を、オッセオインテグレーションを制御するヒストン修飾機構として決定する。

４．研究成果

（１）骨芽細胞分化の検討

In Vitro 実験系において骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞がチタン上で正常に培養可能であることを確認した。そこでチタン上での骨芽細胞分化を検討したところ、培養日数が長期間になるほど骨の分化マーカーであるⅠ型コラーゲン、オステオカルシン、アルカリフォスファターゼの発現量は増加した。また、オッセオインテグレーションに対する喫煙の影響を調べるためにニコチンを細胞培養液に添加し骨芽細胞分化の検討を行ったところ、ニコチン添加群は培養日数が短期間では骨の分化マーカーの発現量は増加していたが、長期間に渡るほど発現量は減少傾向を示した。さらに、ニコチン濃度が低いほどそれぞれの発現量はより減少していた。次に様々な因子を含む生態環境に近付けるために骨誘導たんぱく質である BMP2 を過剰発現させ、チタンプレート上での BMP2 の関与を検討した。その結果チタン単独、BMP2 単独の場合よりもチタン上に BMP2 を過剰発現させた場合において骨の分化マーカーの発現量は増加した。これはチタンが BMP2 と何かしらの相乗作用を示し、骨芽細胞分化を促進したと考えられる。またそれらにニコチンを添加し同様の実験を行ったところ、骨の分化マーカーの発現量は減少した。

（２）エピジェネティック機構の解明

以上のことからチタン、BMP2、ニコチン単独、または相互作用で骨芽細胞分化においてどのようなヒストン修飾が行われているか検討するために Chip assay を行った。実験条件などによりこれら全てのデータを測定することは無理であったが、BMP2 単独に比較して Ti＋BMP2 ではヒストン３のリジン４の３重メチル化が促進されていることが示された。今後もヒストン修飾部位についての検討が必要と考える。

（３）今後の展望

続けてヒストン修飾について検討する必要がある。ヒストンメチル化について有意な差がみられない場合はヒストンアセチル化などの検討を行うなどエピジェネティック機構を多角的に解析していく。これらを通して因子が明らかになったのち、ヒト顎骨由来骨

芽細胞などを用い、より臨床応用に貢献でき

るようにしていく必要があると考える。

５.主な発表論文等
[雑誌論文]（計０件）
[学会発表]（計０件）
[図書]（計０件）
[産業財産権]（計０件）

６．研究組織
(1)研究代表者
　高島　利加子（Takashima,Rikako）
　大阪大学・歯学部附属病院・医員
　研究者番号：00632118