

学位論文

歯周組織構成細胞から産生される液性因子による
ヒストン脱アセチル化酵素の発現および活性への影響

学位申請者 高橋 慶太

広島大学大学院 医歯薬保健学研究所
応用生命科学部門 歯周病態学研究室

(主指導教授：栗原 英見)

2015 年度

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御高閲を賜りました本学応用生命科学部門 栗原 英見 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究遂行ならびに本論文作成において、御教示、御高閲を賜りました本学細胞分子薬理学講座 兼松 隆教授、本学歯科矯正学講座 谷本 幸太郎教授、本学口腔外科学講座 武智 正晃准教授に深厚なる謝意を表します。さらに、本研究の遂行、および本論文の作成にあたり終始御指導、御助言を頂きました本学歯周病態学部門 岩田 倫幸 助教に感謝いたします。

また、本研究を進めるに際し多大なる御支持を頂きました本学歯周病態学研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた両親に心から感謝いたします。

2016 1 月
広島大学大学院 医歯薬保健学研究科
応用生命科学部門 歯周病態学研究室
高橋慶太

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 57 回 秋季日本歯周病学会学術大会(2014 年 9 月 神戸)

第 53 回 広島県歯科医学会 併催 第 98 回広島大学歯学会(2014 年 11 月 広島)

第 142 回 日本歯科保存学会(2015 年 6 月 北九州)

目次

第一章 緒言	6
第二章 骨分化共培養時における MSC の細胞ごとの比較	
第一節 概要	9
第二節 材料及び方法	9
1 MSC の分離・培養	
2 HPL cells の分離・培養	
3 HGF の分離・培養	
4 骨分化誘導培地を用いた共培養法	
5 real-time PCR 法	
6 アリザリンレッド染色法	
第三節 結果	11
第四節 考察	11
第三章 骨分化共培養と未分化共培養での MSC における HDACs 発現の比較	
第一節 概要	16
第二節 材料及び方法	16
1 骨分化共誘導培地を用いた共培養法	
2 未分化共培養法	
3 real-time PCR 法	
4 Western blotting 法	
第三節 結果	17
第四節 考察	18
第四章 HDAC 阻害による HDACs 及び Histone に対する影響	
第一節 概要	23
第二節 材料及び方法	23
1 Western blotting 法	
第三節 結果	23
第四節 考察	23

第五章 MSC 骨分化培養時の TSA の影響	
第一節 概 要	25
第二節 材料及び方法	25
1 骨分化共誘導培地を用いた TSA の比較	
2 real-time PCR 法	
3 Western blotting 法	
4 染 色	
第三節 結 果	26
第四節 考 察	26
第六章 総 括	32
第七章 参考文献	33

歯周炎は細菌感染とそれに対する宿主の応答の結果、歯周組織の破壊が起こる病変である (1)。歯周組織の破壊は、歯の支持組織の破壊を起し、歯列不正、咀嚼能力の低下、審美障害など様々な問題を引き起こす。歯周治療の最終目標は失われた歯周組織の再生である。近年、医学・生物学の急速な進歩によって医療の様々な分野で再生医療が注目を集めている (2-3)。そのことから、高度に破壊された歯周組織に対する治療法として、歯周組織再生療法に対する期待が高まっている。歯周組織再生の3つの要素として細胞、足場、成長因子があり、それらに環境因子と(時間)が加わることで再生が起こるとされている(4-5)。

歯周組織再生療法の一つとして間葉系幹細胞(MSC)を用いた細胞移植の応用が検討されている (6-9)。MSC は自己再生能、多分化能、持続的な成長能などの特徴を持っており (10-12)、近年 MSC を用いた再生療法が確立されつつある。これまでの *in vivo* の研究において、ビーグル犬臼歯部に作製したⅢ級根分岐部欠損モデルにアテロコラーゲンゲルを担体としてMSC を移植したところ、歯槽骨、セメント質、歯周靭帯が再生されたことが示された (6-7)。しかし、どのようなメカニズムで移植された MSC が移植局所の環境において歯周組織再生を促進するのか不明な点が多く、そのメカニズムを明らかにすることは重要である。

移植された MSC は、移植局所において直接的、または間接的な様々な刺激を受けて増殖し、骨芽細胞へと分化する (13-14)。MSC と歯周靭帯細胞(HPL cells)を骨分化誘導培地で細胞非接触下にて共培養することで MSC は骨分化の抑制を受けることが分かっている (19)。これは MSC が歯周組織構成細胞からの液性因子による影響を受けるものと考えられる (20-26)。TWIST1 (15)、DEC1, DEC2 などの抑制系転写因子、bHLH 転写因子、miR-29、miR-204、miR-335(16-18)などいくつかの miRNA が MSC の骨分化の制御因子として同定されていることから、歯周組織構成細胞由来のこれらの因子により、移植局所において MSC の分化は影響を受けると考えられる。

MSC の骨分化は、骨関連転写因子の DNA 結合領域が活性化することで骨分化の制御を受けることが知られている(27)が、DNA 転写活性の制御はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)及びヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)が関与していることが明らかになっている (28)。HDAC はヒストンの N 末端領域のアセチル化されたリジン残基の脱アセチルを触媒する酵素であり (29)、アセチル化された部位を加水分解によって除去し、元のアミノ基に戻すことによってヒストンへの DNA の巻きつきを強めて転写を抑制する。逆に HAT はヒストン中の特定のリジン残基のアミノ基をアミドに変換することによって電荷を

中和するため、ヒストンに対する DNA の巻きつきを弱め転写を促進する (30)。ヒストンを形成するヒストン H2A は N 末端領域の 4 個のリジン (Lys) 残基がアセチル化され、ヒストン H2B、H3、H4 ではそれぞれ 5 個の Lys 残基がアセチル化される (31)。ヒストンのアセチル化は HAT によって行われる。HAT には複数のタイプが存在し、それらの多くは PCAF や CBP/p300 などの転写コアクチベーターがリクルートされ HAT 活性が生じる (32)。

近年 HDAC がクローニングされ、転写調節に関与していることが報告されている (33)。ヒトでは 18 種類の HDAC が同定され、HDAC は配列の相同性により、クラス I (HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8)、クラス II (HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9、HDAC10)、クラス III (SirT1、SirT2、SirT3、SirT4、SirT5、SirT6、SirT7) とクラス IV (HDAC11) に分類される。MSC ではクラス I、クラス IV の HDACs はほとんど核内に局在し、クラス II、クラス III の HDAC は細胞質と核に存在していることが確認されている。HDAC の複合体が骨分化経路の BMP 経路を抑制していることから (34)、HDAC1、HDAC2 は骨分化に対して重要な役割を果たすと考えられる。

クラス I HDAC は DNA に直接結合せず、Twist1 などの bHLH 転写因子などと複合体を介して作用するコリプレッサーであると考えられており (35)。HDAC1 や HDAC2 は共にクラス I に含まれ、82% の相同性がある (36) が、骨分化時における機能的な差異はまだ解明されていない。実際そのヒストンの活性制御因子としてトリコスタチン A (TSA) やバルプロ酸、ラルゴゾール、アピシジンなどが存在し (37-39)、HDAC 阻害剤は HAT に影響を与えずに HDAC のみを阻害することから、初めて細胞内のヒストンアセチル化レベルを人為的に制御することが可能になった (40)。上記の HDAC 阻害剤のうち TSA は広い HDAC 阻害活性を持ち、抗真菌抗生物質として働く有機化合物の一つである。TSA は幅広いエピジェネティック活性スペクトルを有し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で HDAC 自身の活性中心に作用することにより活性を抑制する。作用機序は、基質アセチルリジンとして酵素ポケットに入り、ヒドロキサム酸を通じて活性中心亜鉛イオンをキレートすることから、クラス I、クラス II の HDACs のみに選択的に効果を示すことが知られている。HDAC1、2、3、4、6、10などを抑制する。さらにその作用機序の一つとして、TSA がアポトーシス関連遺伝子の発現を促進していることから TSA は抗がん剤としての潜在能力を有していると考えられている。

これらのことから HDACs は、細胞内で転写活性を制御することによって MSC の細胞機能に影響を及ぼし、液性因子が HDAC 発現および活性化を介して MSC を制御している可能性が考えられる。

そこで、本研究では HDAC、特に HDAC1 と HDAC2 の MSC の骨分化への関

与に着目し、HPL cells や HGF が産生する液性因子が MSC の細胞機能に及ぼす影響を解明することを目的とした。

第二章 骨分化共培養における MSC の細胞ごとの比較

第一節 概要

MSC を用いた歯周組織再生治療において、破壊された歯周組織が再生する際に、MSC が歯周組織構成細胞から受ける影響を *in vitro* の系で調べた。本章では Transwell® を用い非接触下で、HGF または HPL cells との共培養を行いそれぞれが分泌する液性因子が MSC の骨分化に及ぼす影響を検討した。

第二節 材料及び方法

1. MSC の分離・培養法

MSC の分離・培養は Tsutsumi らの方法 (41) に準じて行った。すなわち、十分なインフォームドコンセントを得た後に、腸骨骨髓腔へ穿刺し、骨髓液を採取した。得られた骨髓液は 200 units/ml ヘパリンナトリウムを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) と速やかに混合し、遠心分離 (150x g, 5 分間) を行った。遠心分離後、上清を除去し、得られた細胞成分を 10% の fetal bovine serum (FBS)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM に懸濁し、骨髓液が 200~500 µl/dish となるように直径 100 mm の細胞培養用シャーレに播種した。培養は 37°C、5%CO₂ 気相条件で行った。以後 4 日毎に培地交換を行った。増殖した細胞がコンフルエントに達する直前に、0.05%トリプシン、0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、100 units/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを含む phosphate buffered saline (PBS) を用いて細胞をシャーレから剥離し、分散させた。分散させた細胞は 1.0x 10⁶ cells/ml となるようにセルバンカーに懸濁し、セラムチューブに約 1 ml ずつ分注し、-80 °C で一晩冷却した後に、液体窒素中に保存した。

このように得られた hMSCs を広島大学倫理委員会で承認を得た (疫-422-1 号許可日 H23.11.27) 上で、実験に用いた。

MSC の培養は 10 cm プレートに 2.0 x 10⁶ cells/well の細胞密度で播種、サブコンフルエントで継代を行った。10% FBS を含む DMEM で通常培養を行い 3 日ごとに培地交換を行った。

さらに骨髓由来ヒト間葉系細胞を HPV E6 及び HPV E7 にて不死化した MSC (理研バイオソースセンター、茨城) の提供を受け実験に使用した。骨髓由来系ヒト間葉系細胞株で HPV E6 及び HPV E7 にて不死化。培養は 10 cm プレートに 2.0 x 10⁶ cells/well の細胞密度で播種、サブコンフルエントで継代を行った。10% FBS を含む DMEM で通常培養を行い 3 日ごとに培地交換を行った。

2. 歯肉繊維芽細胞 (HGF) の分離・培養法

ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) から購入した HGF を実験に用いた。培養は 10cm プレートに 2.0×10^6 cells/well の細胞密度で播種、コンフルエント前に継代を行った。10% FBS を含む DMEM で通常培養を行い 3 日ごとに培地交換を行った。

3. HPL cells の分離・培養法

Lonza (Basel, Switzerland) から購入した歯周靭帯細胞を用いた。培養は 10cm プレートに 2.0×10^6 cells/well の細胞密度で播種、コンフルエント前に継代を行った。10% FBS を含む DMEM で通常培養を行い 3 日ごとに培地交換を行った。

4. 骨分化誘導培地を用いた共培養法

プレートは I 型コラーゲンがコートされたプレート (住友ベークライト、東京) を用いた。hMSCs を 6-well プレート (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) (1.0×10^5 cells/well, Real-time PCR 法に使用)、または 24-well プレート (Becton, Dickinson and Company) (1.0×10^4 cells/well, アリザリンレッド染色に使用) に播種した。24 時間後に Transwell®を用いた非接触下での共培養を開始し、後述する骨分化誘導培地に培地交換した。Transwell®上に HGF または HPL cells を 6-well プレートには 1.0×10^5 cells、24-well プレートには 1.0×10^4 cells ずつ播種し、メンブレンフィルター (pore size: $0.4 \mu\text{m}$) を介した共培養を行った。

骨芽細胞への分化誘導は Jaiswal の方法 (42) に準じて行った。10% FBS を含む α -MEM (Sigma) を基礎培地とし、プレートには $0.1 \mu\text{M}$ dexamethasone (Sigma)、 $50 \mu\text{M}$ ascorbic acid 2-phosphate (Sigma)、 10 mM β -glycerophosphate (Sigma) を添加した骨分化誘導培地で培養を開始、3 日毎に培地交換を行った。

本実験では MSC と共培養した MSC を対照として、HPL cells あるいは HGF と共培養した MSC と比較を行った。

5. Real-time PCR 法

骨分化誘導培地で共培養開始 3 週目に RNAiso Plus (タカラバイオ、滋賀) を用いて MSC から total RNA を抽出し、ReverTraAce® (東洋紡、大阪) を用いて 1.0 µg の total RNA から cDNA を合成した。内在性コントロールとして β -actin を用い、Osteocalcin (OC)、Osteopontin(OPN)、Runt-related transcription factor 2 (Runx2) の mRNA 発現を Real-time PCR 法で検討した。Real-time PCR 法は TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster city, CA) を用いて行い、Assay ID と Protein の配列を表 1 に示す。

6. アリザリンレッド染色法

石灰化の評価は Nørgaard らの方法 (43) に準じてアリザリンレッド染色を行った。細胞を PBS で洗浄し、35% HCHO で 24 時間固定後に蒸留水で洗浄し、1% アリザリンレッド S 溶液 (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) で 20 分間染色後、再度蒸留水で洗浄し、乾燥後肉眼で観察した。

第三節 結果

MSC は骨分化誘導条件下において HPL cells との共培養では OPN の mRNA 発現は約 30% に ($p < 0.01$) に、RUNX2 の mRNA 発現は約 50% ($p < 0.05$) に、OC の mRNA は約 50% ($p < 0.01$) 抑制した (図 1)。HGF との共培養では RUNX2 の mRNA 発現は 3 倍 ($p < 0.01$) に上昇し、有意な上昇があった。OPN は mRNA 発現抑制が見られた。OC の mRNA 発現は約 20% ($p < 0.01$) の上昇傾向だった (図 2)。さらにコントロールと比較して HPL cells との共培養 HGF との共培養の両者にアリザリンレッド染色の弱い抑制が認められた (図 3)。

第四節 考察

HPL cells との非接触下での共培養によって、MSC の骨分化及び石灰化が抑制された。これまでに、HPL cells の conditioned medium が MSC の石灰化を阻害することは報告されているが (44)、非接触下での共培養においても同様な結果を得られた。HGF との骨分化誘導時共培養で非接触下での共培養の結果から、HGF が分泌する液性因子も HPL cells と同様に MSC の石灰化を抑制する傾向を示した。このことから HPL cells や HGF の分泌する液性因子は MSC の石灰化を抑制していることが示唆される。

歯周組織構成細胞である HPL cells あるいは HGF は非接触下において MSC

の骨分化能を抑制することが示唆されたが、これらの液性因子は MSC を歯周組織へ移植した時に、移植局所においてアンキローシスを防いでいる可能性が示唆された。つまりこれらの骨分化抑制能は MSC の移植の際にマイナスに働くだけのものではないと考えられる。

HPL cells が特徴的に高発現を示している遺伝子として、TWIST1 (45)、Periostin (46) などが報告されているが、Twist1 や Periostin などは骨分化の抑制への関与が報告されている (45, 47)。HGF が分泌する液性因子も HPL cells と同様に MSC の石灰化を抑制する傾向を示した。HGF は歯周組織の創傷治癒において歯肉線維芽細胞の増殖に伴う結合組織増殖によって歯周靭帯および骨・セメント質の再生が阻害されるという現象 (6-8) から歯周組織の再生を阻害していることが知られているが、液性因子によって MSC の骨分化に対しても影響していることが示された。HGF の液性因子は MSC での RUNX2 および OC が上昇したにも関わらず石灰化が抑制されたが、OPN の発現が抑制されたことから MSC の骨分化能の低下及び BMP2 (48) や VitD3 (49) など他の骨関連遺伝子発現が有意に影響していると考えられる。アリザリンレッドの染色性などを見ると HGF から出る液性因子は MSC の石灰化能を抑制することが示唆される (50)。

HPLcells または HGF から分泌される液性因子中の骨分化に関わる因子の特定に関しては今回の実験では検討していないが、bHLH 転写因子の Twist1 (45) や炎症性サイトカインの TNF- α (51)、IFN- γ (52)、次の章で使用する TSA と深く関係のある TGF β (55)、タンパク質以外の ATP (53) などの関与が疑われる。

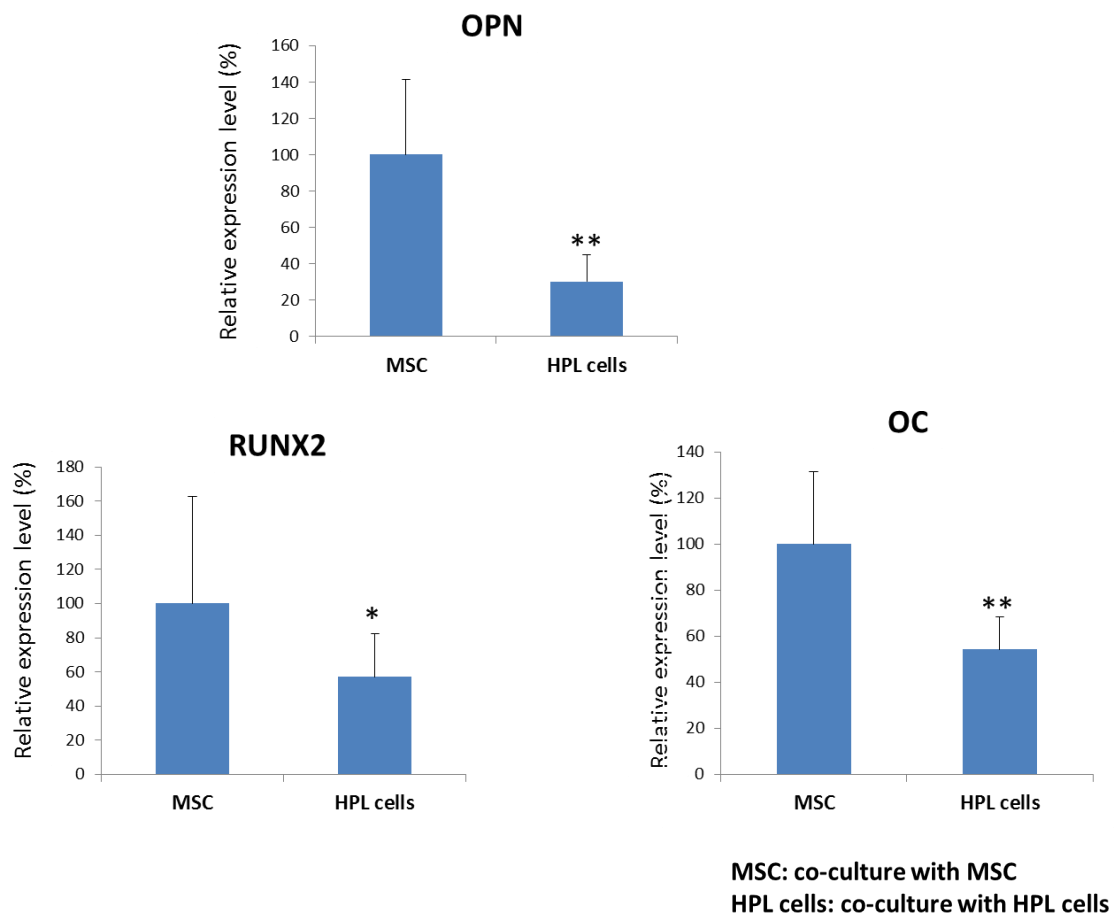


図1. HPL cells との非接触共培養による MSC の骨分化に関与する因子の mRNA 発現の比較

MSC と HPL cells を非接触下で骨分化誘導共培養を行い3週間後にリアルタイム PCR 法によって RUNX2, OPN, OC の mRNA 発現をそれぞれ解析し比較した。グラフの表記は Transwell® で共培養した細胞を表記している。

(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

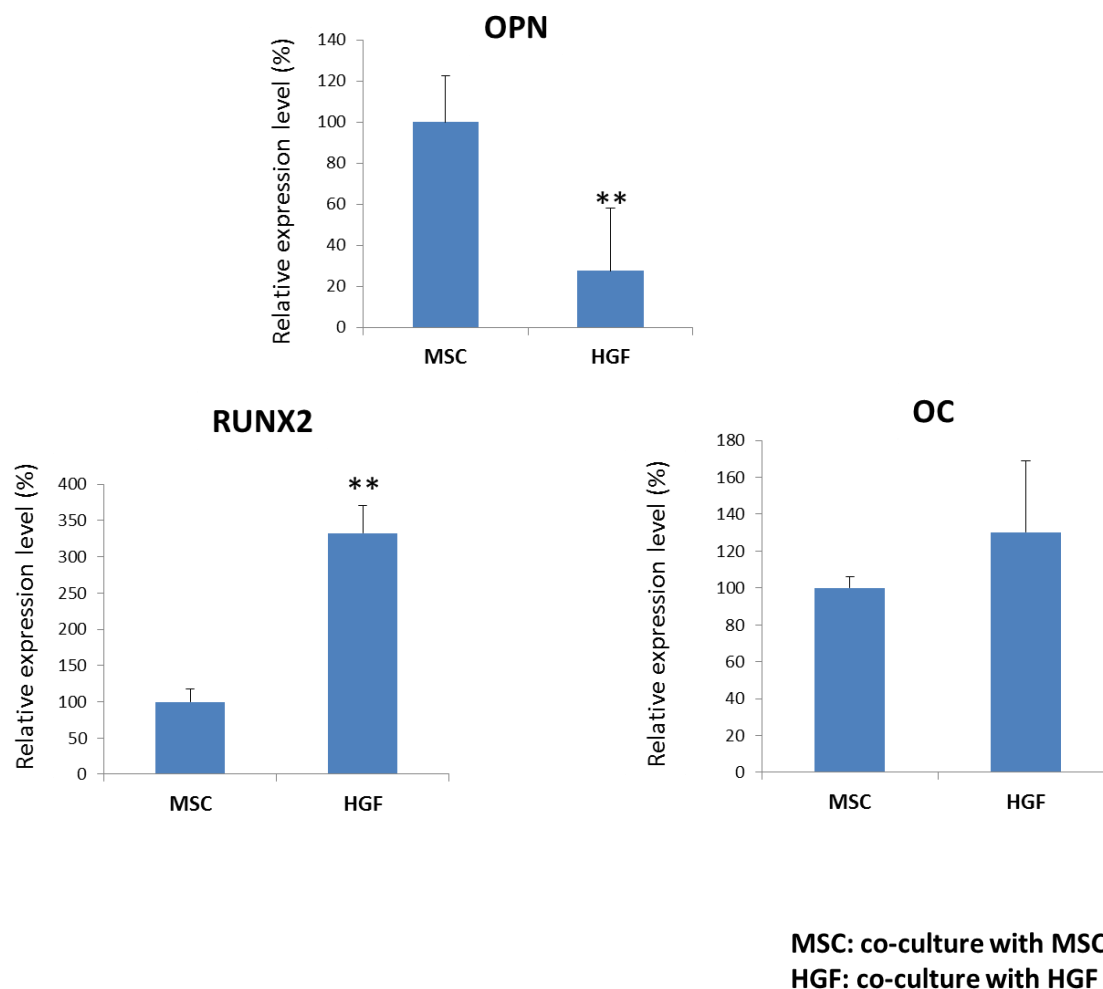
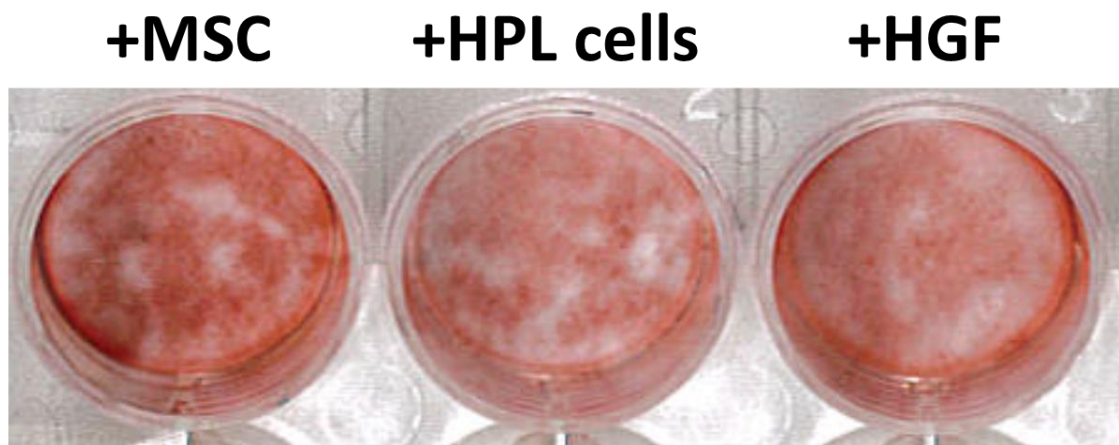


図2. HGF との非接触下共培養による MSC の骨分化関連の因子の比較

MSC と HGF を非接触下で骨分化誘導共培養を行い3週間後にリアルタイムPCR法によってRUNX2,OCのmRNA発現をそれぞれ解析し比較した。グラフの表記はTranswell®で共培養した細胞を表記している。

(** p < 0.01, *p < 0.05)



MSC: co-culture with MSC
HPL cells: co-culture with HPL cells
HGF: co-culture with HGF

図 3. HPL cells と HGF との非接触下共培養による MSC の石灰化への影響

MSC と共培養した MSC と、MSC と HPL cells または HGF を非接触下で骨分化誘導共培養を行い 3 週間後にアリザリンレッド染色を行った。

第三章 骨分化共培養と未分化共培養での MSC における HDACs 発現の比較

第一節 概要

前章にて骨分化誘導培地において HPL cells や HGF から産生される液性因子は MSC の骨分化を抑制することを示した。MSC の骨分化は関連転写因子の DNA 結合領域が転写活性されることで制御を受けることが報告されているが (27)、これらの制御はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が関与していることが明らかになっている (28)。

前章の結果から HPL cells あるいは HGF から産生された液性因子によって MSC の HDAC 発現が影響を受け DNA 結合領域のアセチル化を制御することで細胞内の骨分化関連因子の発現を調節し、MSC の骨分化を制御している可能性が考えられる。

本章では、骨分化への関与が示されている HDAC 1 と HDAC2 とアセチル化ヒストン 3 に着目し未分化状態を維持する共培養と骨分化を誘導する共培養においてそれぞれの因子の発現比較をした。

第二節 材料及び方法

1. 骨分化誘導培地を用いた共培養法

前章と同様の材料・方法によって行った。

2. 未分化共培養方法

MSC を 6-well プレートに 1.0×10^5 cells/well の細胞密度で播種、24 時間後に Transwell®を用いた非接触下の共培養を開始した。Transwell®の上皿には HGF または HPL cells を 1.0×10^5 cells/well ずつ播種し、10% FBS を含む DMEM で通常培養を行い 3 日ごとに培地交換を行った。

3. Real-time PCR 法

前章と同じ方法で行い、HDAC1, HDAC2 の mRNA 発現を Real-time PCR 法で検討した。Real-time PCR 法は TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster city, CA) および SYBR® Green 法を用いて行い、Assay ID および primer 配列はそれぞれ表 1 に示す。

4. Western blotting 法

骨分化誘導培地あるいは未分化培地で共培養開始 3 週間後に MSC の Cell lysate を、250 μ l の sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファー(1% [weight/volume; w/v] sodium dodecyl sulfate, 6.2 M urea, 10% glycerol, 5 mM dithiothreitol, 1% 2-mercaptoethanol, 0.01% [w/v] bromophenol blue, 1% [volume/volume; v/v] protease inhibitor cocktail, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride)で回収、100 °Cで 5 分間加熱した後、10% polyacrylamide gel を用いて電気泳動 (100 V, 45 分間) を行い、ゲルに展開したタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレン (Bio-Rad, Hercules, CA) に転写した。転写後、PVDF メンブレンを 5% スキムミルク (和光純薬工業、大阪) 含有 Tris-buffered saline (TBS) -Tween (TBS-T) (pH8.0) で常温 1 時間ブロッキングを行った。その後、メンブレンを TBS-T で洗浄し、Anti-HDAC1 antibody mouse IgG (Millipore, Darmstadt, GER)、Anti-HDAC2 antibody rabbit IgG (abcam, Cambridge, UK) Anti-phosphoHDAC1 antibody rabbit IgG (millipore, Darmstadt, GER)、Anti-phosphoHDAC2 antibody rabbit IgG (abcam, Cambridge, UK)、Anti-histone3 antibody mouse IgG (cell signaling, US) Anti-acetyl histone3 antibody rabbit IgG (cell signaling, US) 含有 Can Get Signal® Solution 1 for primary antibody (東洋紡) (1:1,000) に浸漬、オーバーナイトで 4 °Cにて反応させた。再び TBS-T で洗浄した後、一次抗体の種類によって Goat anti-rabbit IgG (R&D Systems, Minneapolis, MN) 含有 5% スキムミルク (1:2,000) あるいは Goat anti-mouse IgG (R&D Systems, Minneapolis, MN) 含有 5% スキムミルク (1:2,000) を常温で 1 時間作用させた。コントロールとして β -actin を用い、同様に Anti-beta Actin antibody mouse IgG (sigma) (1:2,000) と Goat anti-mouse IgG (R&D Systems) (1:2,000) を反応させた。さらに、Clarity™ Western ECL Substrate (BIO RAD, California, US) で反応させた後 ChemiDoc™ XRS+ (BIO RAD, California, US) を用いて検出した。

第三節 結果

HPL cells との骨分化誘導時共培養における mRNA レベルは HDAC1、HDAC2 はコントロールの約 70% ($p < 0.01$) に減少した。一方未分化共培養では HDAC1 上昇 ($p < 0.01$)、HDAC2 では変化がなかった (図 4)。タンパク質

レベルでは HDAC1、HDAC2 ともにコントロールより減少し、リン酸化タンパクの質の発現レベルも減少した (図 5)。ヒストン 3 のアセチル化タンパク質レベルは骨分化誘導共培養時上昇したが、未分化共培養時では明確な変化はなかった (図 6)。

HGF との骨分化誘導時共培養における mRNA レベル HDAC1 は対照の MSC と比較して約 5 倍 ($p < 0.01$) に上昇し、HDAC2 の mRNA レベルは減少傾向が見られた。一方未分化共培養では HDAC1 は上昇傾向が見られた。しかし HDAC2 では共培養によって変化しなかった (図 4)。タンパク質レベルは HDAC1、HDAC2 ともにコントロールよりも減少し、リン酸化タンパク質も減少した (図 5)。アセチル化ヒストン 3 のタンパク質レベルは骨分化誘導共培養時では約 2 倍に上昇したが、未分化共培養時変化はなかった (図 6)。

第四節 考察

骨分化誘導共培養時において HPL cells と共培養した MSC は、対照の MSC と比較して HDAC1、HDAC2 ともに mRNA レベルで減少が見られた。これは未分化共培養時とは異なる結果を示し、タンパク質レベルも mRNA と相関が見られた。リン酸化 HDAC1、リン酸化 HDAC2 発現は HDAC の総量減少に比例して減少した。

骨分化誘導共培養時 HGF と共培養した MSC はコントロールと比較して mRNA レベルは HDAC1 では上昇し、HDAC2 では減少傾向であった。未分化培養と比較すると、HDAC1 は mRNA レベルの上昇が抑えられていたが、HDAC2 の mRNA レベルは変化がなかった。しかし、ウェスタンブロッティングのタンパク質レベルを検証すると、HPL cells と同じような傾向が見られた。この相違は、mRNA のタンパク質への翻訳過程における抑制が関与していると考えられる(55)。

ヒストンのアセチル化はヒストンの総量に対するアセチル化のレベルを比較すると、骨分化培養時は HPL cells との共培養、HGF との共培養ともにタンパク質レベルが上昇した。一方、未分化共培養においては変化はなかった。このことから、骨分化共培養時には液性因子が、MSC に対して作用し、HDAC1 または HDAC2 のタンパク質発現を抑制することによって、リン酸化 HDACs が減少し、それによってアセチル化ヒストン 3 の上昇に伴い骨分化抑制系の転写因子の活性が起きていることが示唆される (56)。

HDAC1 のサイレンシングでは骨分化能の上昇(57)、HDAC2 のサイレンシン

グでは骨分化能の減少(60)が報告されていることから、HDAC2の減少によって石灰化抑制系の転写因子の活性が強くと発現している可能性が考えられる。

本実験では骨分化共培養化において HDAC1、HDAC2 のリン酸化とヒストン3アセチル化が MSC の骨分化に関与していることが示唆された。

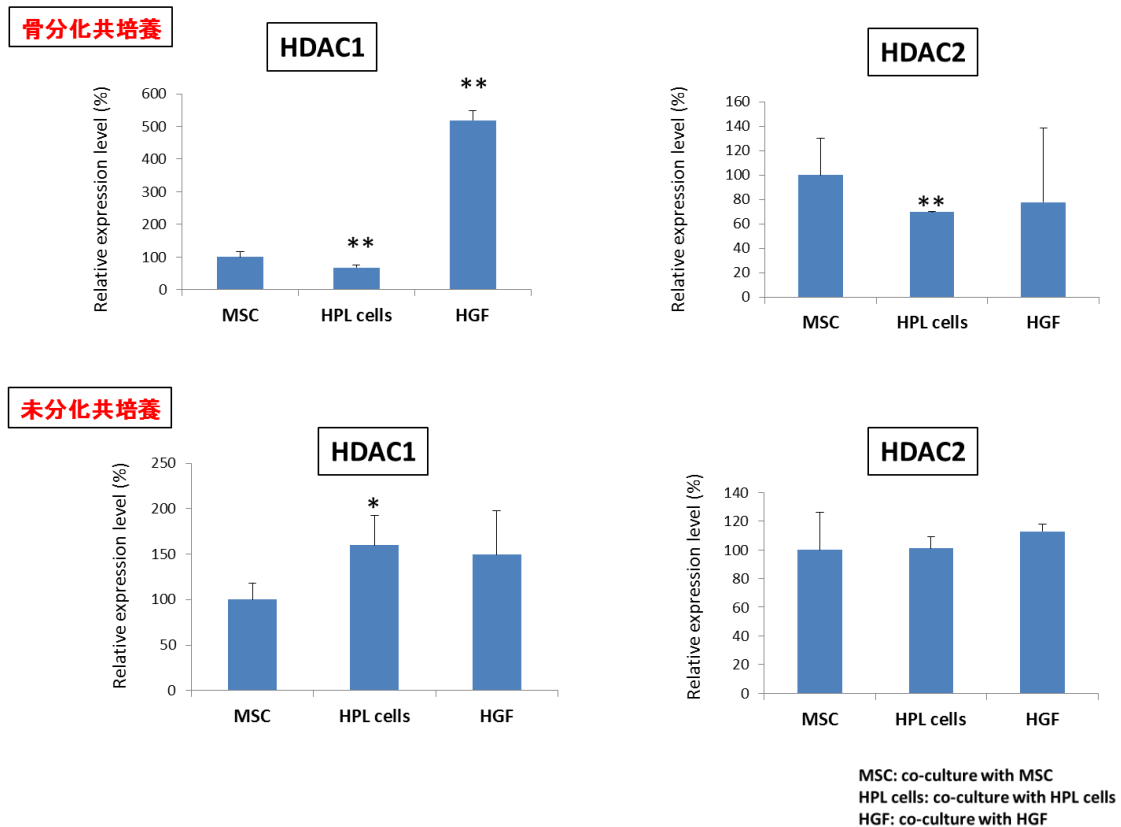
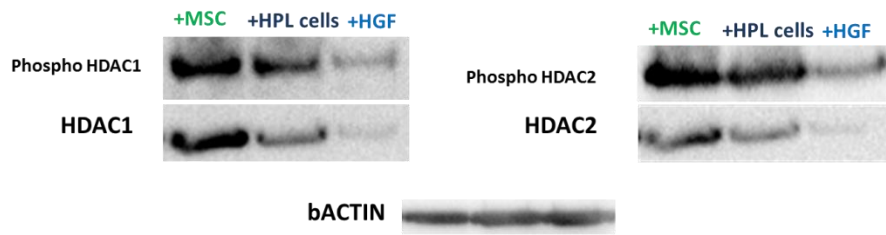


図4. HPL cells または HGF との非接触下での骨分化誘導共培養および未分化誘導共培養地における MSC の HDAC1 および HDAC2 の mRNA 発現比較

MSC と MSC、HPL cells または HGF を非接触下にて骨分化誘導共培養または未分化共培養を行った。3 週間培養後、total RNA を回収してリアルタイム PCR 法で HDAC1、HDAC2 の mRNA 解析を行った。グラフの表記は Transwell® で共培養した細胞を表記している。

(** p < 0.01, *p < 0.05)

骨分化培養時



未分化共培養時

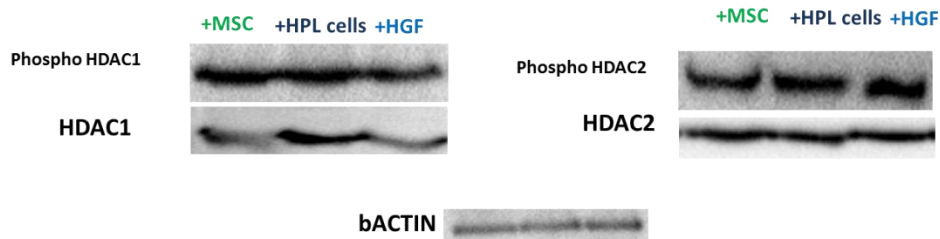
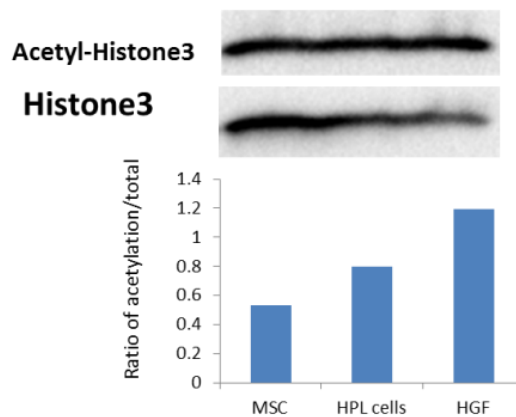


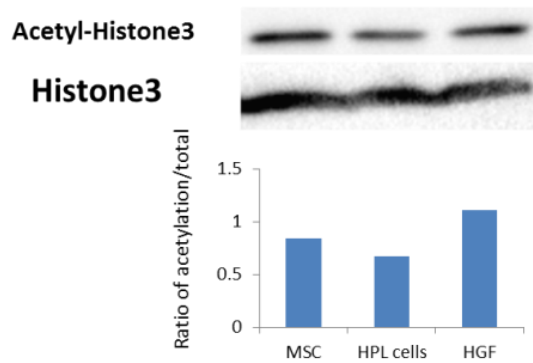
図 5. HPL cells または HGF との非接触下での骨分化誘導共培養および未分化共培養地における MSC のタンパク質レベルの比較

MSC と HPL cells または HGF を非接触下にて骨分化共培養または未分化培養を行った。HDAC 1、HDAC2、リン酸化 HDAC1、リン酸化 HDAC2 のタンパク質レベル発現を Western blotting 法で解析した。

骨分化培養時



未分化共培養時



MSC: co-culture with MSC
HPL cells: co-culture with HPL cells
HGF: co-culture with HGF

図6. HPL cells または HGF との非接触下での骨分化誘導共培養および未分化共培養地における MSC のタンパク質発現の比較

MSC と MSC, HPL cells または HGF を非接触下にて骨分化共培養または未分化培養を行った。ヒストン 3、アセチルヒストン 3 のタンパク質発現をの解析した。また、acetyl Histone3/total Histone3 の比をグラフで示す。グラフの表記は Transwell®で共培養した細胞を表記している。

第四章 HDAC 阻害による HDAC および Histone の発現に対する影響

第一節 概要

前章で骨分化誘導共培養時、HPL cells または HGF から産生される液性因子により MSC 内の HDACs の減少と、ヒストン 3 のアセチル化の上昇が確認された。本章ではまず、MSC において TSA による HDACs の阻害によるヒストン 3 の変化を調べた。

第二節 材料及び方法

1. 骨分化培養方法は第二章と同じ方法で行った。培養スケジュールは細胞播種一日後に骨分化培地へ交換し、サンプル回収 0、6、12、24、72 時間前にそれぞれ TSA (100 nM) 添加し、3 日間培養後に回収した。

2. Western blotting 法

前章と同様の方法で行った。

第三節 結果

TSA 添加 6 時間後においてリン酸化 HDAC1 とリン酸化 HDAC2 のタンパク質発現が減少した。TSA 添加 6 時間後にアセチル化ヒストン 3 のタンパク質発現は上昇していたが、さらに 6 時間後では TSA 添加前のレベルまでタンパク質発現は戻った (図 7)。

第四節 考察

TSA が MSC のリン酸化及びヒストン 3 のアセチル化に対して作用するという報告は過去にも多くされているが (59, 60)、今回は MSC に対して HDAC1 及び HDAC2 のヒストン 3 に対する影響を確認するために本実験を行った。TSA の作用は早い時間での効果が報告されており (59)、今回の実験では HDAC1、HDAC2 のリン酸化は 6 時間でタンパク質レベルの発現減少が見られ、それに伴いヒストン 3 のアセチル化の上昇が見られた。本実験において MSC に発現する HDAC1 と HDAC2 のリン酸化は TSA の影響を受け、減少した結果、ヒストン 3 のアセチル化に影響を与えることが示唆された

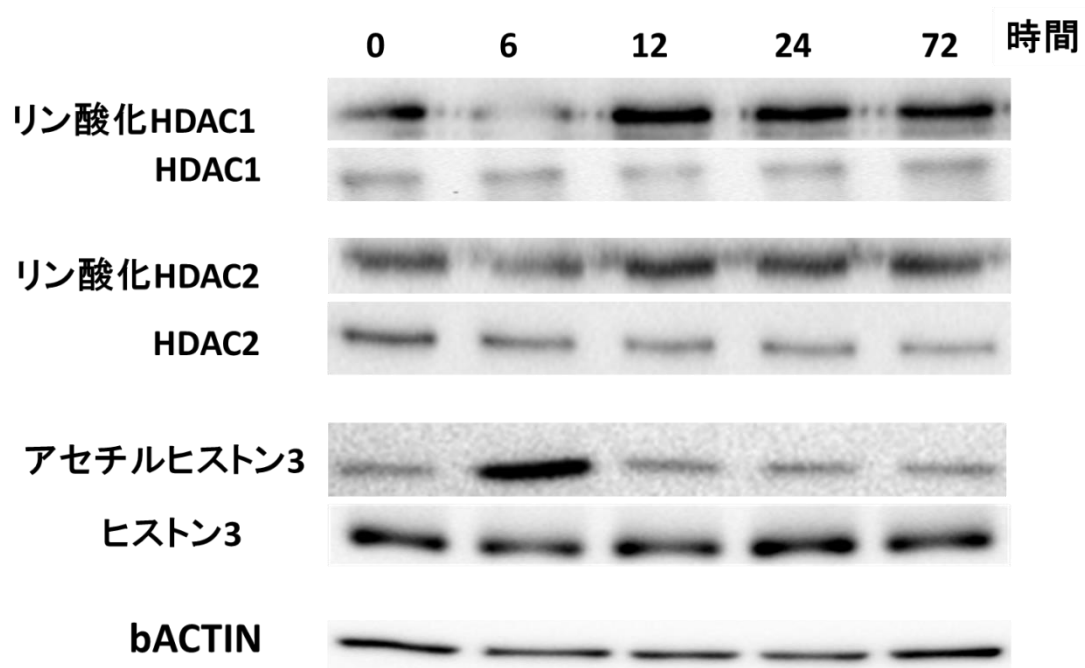


図 7. 無血清下にて TSA を作用させたときの MSC のタンパク質発現の比較

未分化培地で 6-well プレートに実験開始 24 時間前 1.0×10^5 cells/well ずつ播種し、10% FBS を含む DMEM で通常培養を行い、実験開始とともに無血清の培地に交換し、細胞回収前 0、6、12、24、72 時間に TSA100 nM 添加しそれぞれ cell lysate を回収しタンパク質レベル発現を Western blotting 法で比較した。

第五章 MSC 骨分化時の TSA の影響

第一節 概要

前章で MSC 内の HDAC1、HDAC2、ヒストン 3 に対する TSA の影響が確認できたので、本章では骨分化培養時に TSA が MSC に与える影響を調べた。

第三章において骨分化誘導共培養時、HPL cells や HGF からの産生される液性因子が MSC に発現する HDAC1 および HDAC2 を減少し、それによってリン酸化 HDAC の減少、アセチル化ヒストン 3 の増加が起こることが明らかになったが、本章では MSC の骨分化誘導時、TSA 添加と非添加時の MSC の骨分化および、リン酸化 HDAC1、リン酸化 HDAC2、アセチル化ヒストン 3 の発現変化を調べた。

第二節 材料及び方法

1. 骨分化培地

骨分化培養方法は第二章と同じで、3 日毎に骨分化培地のみ交換を行う系と更に TSA (100 nM) 添加したものの 2 系統に分けて培養 3 週間後に細胞を回収した。

2. Real-time PCR 法

第三章と同じ方法で行った

3. Western blotting 法

第三章と同じ方法で行った

4. 染色

アリザリンレッド染色、フォンコッサ染色、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

アリザリンレッド染色は第一章と同じ方法で行った。フォンコッサ染色は細胞を PBS で洗浄し、35% HCHO で 24 時間固定後、蒸留水でさらに洗浄し、5% 硝酸銀で 30 分間蛍光灯下において反応させた後、再度蒸留水で洗浄し、5% チオ硫酸ナトリウムで反応停止後、再度蒸留水で洗浄し、乾燥後肉眼で観察し

た。アルカリフォスファターゼ染色は細胞を PBS で洗浄し、35%HCHO で 24 時間固定、蒸留水で洗浄し、ALP 染色キット（武藤化学）で 24 時間染色後、再度蒸留水で洗浄し、乾燥後肉眼で観察した。

第三節 結果

骨分化誘導培地で培養した MSC に TSA 添加したものは、TSA 非添加のものと比較して、RUNX2 の mRNA 発現が約 40% ($p < 0.01$)、OPN の mRNA 発現が約 50% ($p < 0.01$)、OC の mRNA が約 15% ($p < 0.01$) に有意に減少した (図 8)。石灰化を示す染色に関してはアリザリンレッド染色、フォンコッサ染色、アルカリフォスファターゼ染色のいずれにおいても TSA 添加した MSC は TSA 非添加と比較して染色性が明らかに減弱した。(図 9)

HDAC1 の mRNA 発現は TSA 添加によって約 60% ($p < 0.01$) に減少した。一方、HDAC2 の mRNA 発現は上昇傾向を示したものの、有意な変化ではなかった (図 10)。

タンパク質レベルの発現は、HDCA1 と HDAC2 は TSA 非添加では減少傾向にあった。リン酸化 HDAC1 は TSA 添加によって減少したがリン酸化 HDAC2 に変化はなかった。アセチル化ヒストン 3 発現は TSA 添加によってタンパクレベルがやや上昇した。(図 11)

第四節 考察

骨分化誘導培地で培養した MSC は、TSA 添加することで石灰化は低下した。HDAC1 の mRNA 発現の減少が見られたのは、TSA の直接的な影響ではなく間接的に HDAC1 の発現抑制をしたものと考えられる。TSA は HDAC の活性そのものを阻害するもの(62)なので、その機構については他の HDAC 阻害による HDAC1 への影響など、さら詳細に調べる必要がある。

タンパク質発現については、TSA 添加によってリン酸化 HDAC1 の減少とアセチル化ヒストン 3 の上昇みられたが、リン酸化 HDAC2 のタンパク質レベルの減少は確認できなかった。骨分化誘導培地で培養した MSC では TSA 添加によるリン酸化 HDAC2 のタンパク質発現への影響は少ないのかもしれない。前章での結果からは、TSA がリン酸化 HDAC2 のタンパク質レベルを減少させていることは示唆される (63)。MSC に対する TSA の作用時間 (61) に今後さらに検討する必要がある。

前章では TSA 作用時間は、添加から 6 時間でリン酸化 HDAC1、リン酸化

HDAC2 の抑制が最も強く起きたことから、TSA の添加時期や細胞回収時期も変化させて詳細な検討が必要であると考えられる。HDAC1 のサイレンシングでは骨分化能の上昇 (57)、HDAC2 のサイレンシングでは骨分化能の減少 (60) が報告されていることから、HDAC2 の減少によって石灰化抑制系の転写因子の活性が強く発現している可能性が考えられることから、HDAC1、HDAC2 に加えて、他の HDAC の関与もが考えられる。

HPL cells と HGF 骨分化誘導共培養時と TSA 添加は MSC の骨分化抑制で同様の結果を示したが、リン酸化 HDAC2 のタンパクレベルや骨関連因子の RUNX2 や OC では、骨分化共培養と TSA 添加で同様の動きを見せていたわけではなかった。これは骨分化誘導共培養時と TSA 添加時では MSC 内の HDAC 発現に与える影響が異なることを示唆する。すなわち MSC が HPL cells あるいは HGF から産生される転写因子、microRNA、サイトカインなどの多様な因子を介して、増殖・分化の制御を受けていることが考えられる (44,45)。これらの因子のさらなる解明も今後の研究の課題でもある。

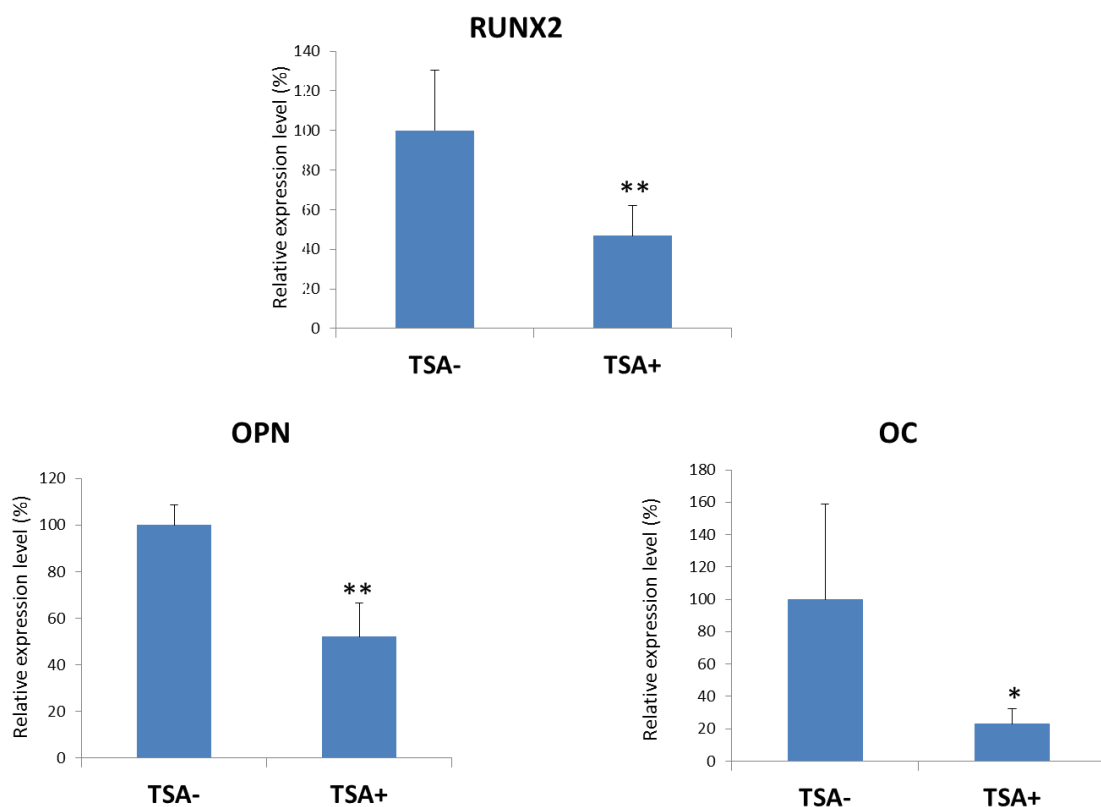


図 8. 骨分化誘導培養における TSA 添加による MSC の骨分化マーカーの比較

MSC に TSA を添加し、骨分化誘導培養を行い 3 週間後リアルタイム PCR 法で RUNX2、OPN、OC の mRNA 発現をそれぞれ解析し比較した。

(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

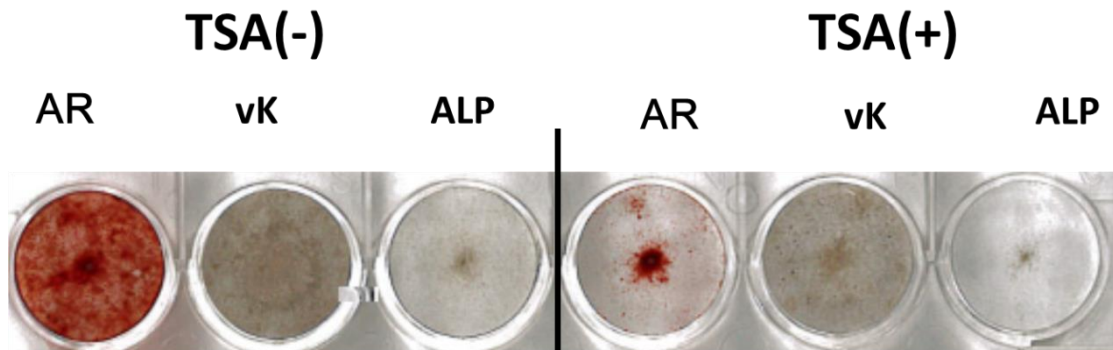


図 9. TSA 添加による MSC の石灰化および ALP 活性への影響

MSC に TSA を添加し、骨分化誘導培地で 3 週間培養した後にアリザリンレッド染色 (AR)、フォンコッサ染色 (vK)、アルカリフォスファターゼ染色 (ALP) を行った。

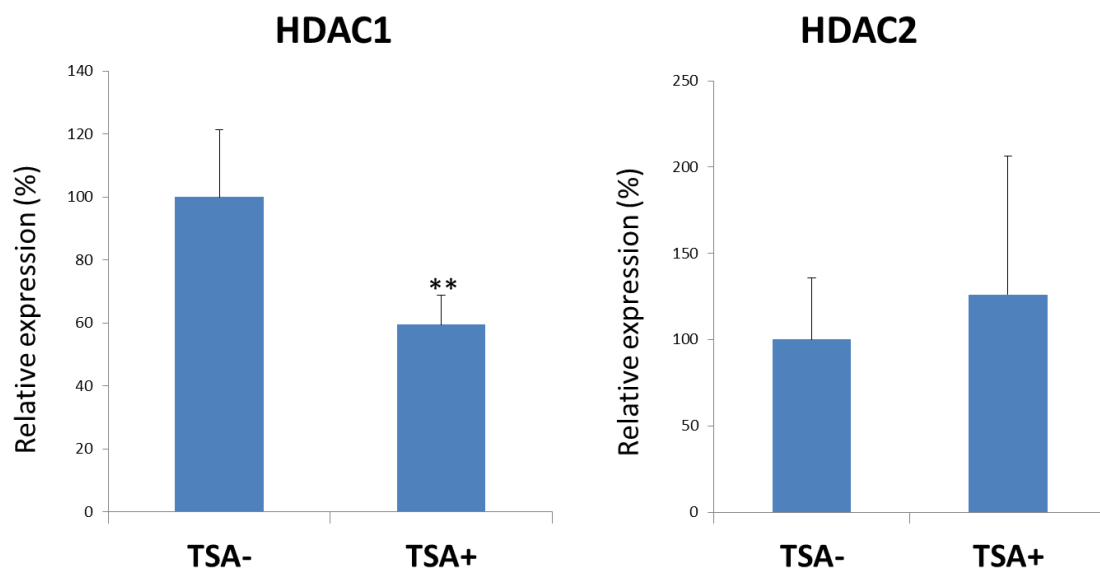


図 10. 骨分化誘導培養における TSA 添加による MSC の HDAC1 及び HDAC2 mRNA 発現

MSC に TSA を添加し、骨分化誘導培養を行い 3 週間後リアルタイム PCR 法にて HDAC1、HDAC2 の mRNA 発現をそれぞれ解析した。

(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

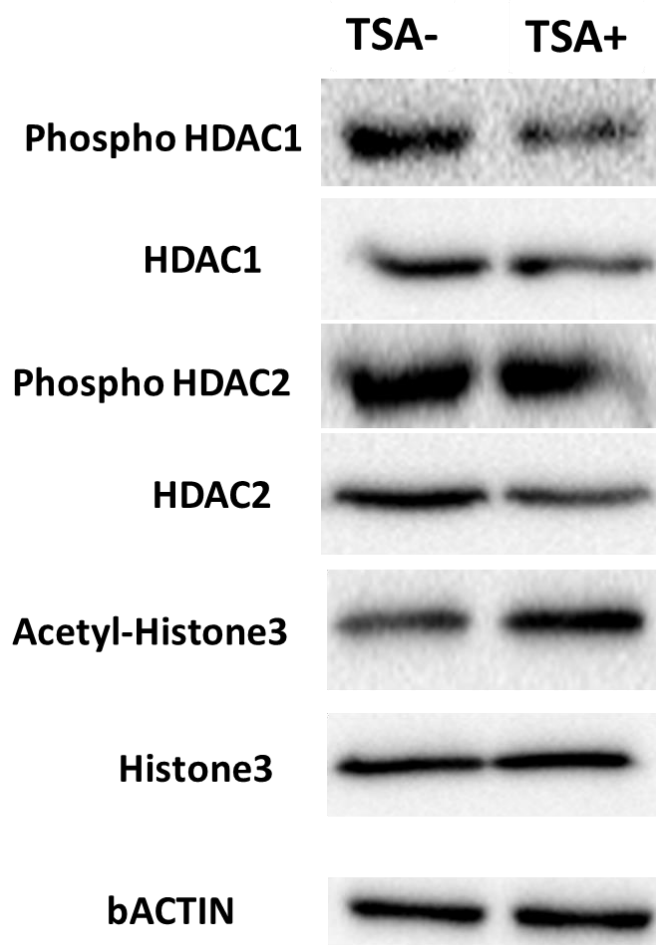


図 11. 骨分化誘導培養における TSA 添加による MSC の HDAC およびヒストンの発現

MSC に TSA 添加または非添加の条件下で、骨分化誘導培養 3 週間後、cell lysate を回収し HDAC1、HDAC2、リン酸化 HDAC1、リン酸化 HDAC2、アセチル化ヒストン 3、ヒストン 3、それぞれの発現をタンパク質レベルで比較した。

第六章 総括

MSC が HPL cells または HGF から分泌される液性因子から受ける影響について検討を行い以下に結果を示す。

1. HPL cells と HGF から分泌される液性因子は MSC の骨分化を抑制した（2章）。
2. HPL cells と HGF から分泌される液性因子は骨分化誘導共培養において HDAC 1、HDAC2、そして活性化の指標となるリン酸化 HDAC1、リン酸化 HDAC2 タンパク質発現の減少が起こり、アセチル化ヒストン 3 の発現が上昇した（3章）。
3. TSA は MSC のリン酸化 HDAC 1、リン酸化 HDAC2 のタンパクレベルの発現を減少させ、アセチル化ヒストン 3 の発現を増加させた（4章）。
4. MSC 骨分化培養時 TSA 添加によって、骨分化は抑制され、さらにリン酸化 HDAC1 のタンパク質レベルの減少、アセチル化ヒストン 3 のタンパクレベル発現が増加した（5章）。

共培養において他細胞から MSC 内の HDACs へ与える作用こそ異なったが、どちらもリン酸化 HDAC のタンパク質レベルが減少し、アセチル化ヒストン 3 のタンパク質レベルの増加が生じ、骨分化抑制系の転写因子が促進系の転写因子よりも優位に産生されることによって、MSC の骨分化能の低下が引き起こされると考えられる。HPL cell から分泌される液性因子は MSC の骨関連因子 RUNX2、OPN、OC の mRNA 発現の減少、HGF から分泌される液性因子は OPN の mRNA 発現の減少、RUNX2、OC の mRNA 発現の上昇などそれぞれの共培養において産生される因子が異なることから石灰化抑制系の転写因子の種類も共培養系ごとで異なることが示唆された。

本研究において HDAC の作用が MSC の骨分化に影響を与えることから、臨床の現場において移植前の MSC 内の HDAC の活性を何らかの方法で制御することによって硬組織の再生促進を図ることができると考えられる。

第七章

- 1 Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-144 (1998).
- 2 Dragoo, J. L. et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 85, 740-747 (2003).
- 3 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 4 Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* 260, 920-926 (1993).
- 5 Langer, R. Tissue engineering: a new field and its challenges. *Pharm Res* 14, 840-841 (1997)
- 6 Kawaguchi, H. et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 75, 1281-1287, doi:10.1902/jop.2004.75.9.1281 (2004).
- 7 Hasegawa, N. et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 77, 1003-1007, doi:10.1902/jop.2006.050341 (2006).
- 8 Hasegawa, M., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. & Ishikawa, I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue Eng* 11, 469-478, doi:10.1089/ten.2005.11.469 (2005).
- 9 Yamada, K. et al. Fabrication of cultured oral gingiva by tissue engineering techniques without materials of animal origin. *J Periodontol* 77, 672-677, doi:10.1902/jop.2006.050223 (2006).
- 10 Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312 (1997).
- 11 Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).
- 12 Wexler, S. A. et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 121, 368-374 (2003).
- 13 Enhancement of Periodontal Tissue Regeneration by Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells 75, No. 9, Pages 1281-1287, DOI 10.1902/jop.2004.75.9.1281
- 14 Behavior of Transplanted Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Defects 77, No. 6, Pages 1003-1007, DOI 10.1902/jop.2006.050341
- 15 Isenmann, S. et al. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem Cells* 27, 2457-2468, doi:10.1002/stem.181 (2009).

- 16 Kapinas, K., Kessler, C., Ricks, T., Gronowicz, G. & Delany, A. M. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem* 285, 25221-25231, doi:10.1074/jbc.M110.116137 (2010).
- 17 Huang, J., Zhao, L., Xing, L. & Chen, D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* 28, 357-364, doi:10.1002/stem.288 (2010).
- 18 Tomé, M. et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 18, 985-995, doi:10.1038/cdd.2010.167 (2011).
- 19 Mizuno, N. et al. Humoral factors released from human periodontal ligament cells influence calcification and proliferation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 79, 2361-2370, doi:10.1902/jop.2008.070577 (2008).
- 20 Kim, H., Lee, J. H. & Suh, H. Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med J* 44, 187-197 (2003).
- 21 Kubo, H. et al. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells* 14, 407-424, doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01281.x (2009).
- 22 Iwata, T. et al. Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Eur J Cell Biol* 85, 423-431, doi:10.1016/j.ejcb.2005.12.007 (2006).
- 23 Nakashima, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29 (2002).
- 24 Kapinas, K., Kessler, C., Ricks, T., Gronowicz, G. & Delany, A. M. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem* 285, 25221-25231, doi:10.1074/jbc.M110.116137 (2010).
- 25 Huang, J., Zhao, L., Xing, L. & Chen, D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* 28, 357-364, doi:10.1002/stem.288 (2010).
- 26 Tomé, M. et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 18, 985-995, doi:10.1038/cdd.2010.167 (2011).
- 27 Liu S, Liu D, Chen C, Hamamura K, Moshaverinia A, Yang R, Liu Y, Jin Y, Shi S. MSC Transplantation Improves Osteopenia via Epigenetic Regulation of Notch Signaling in Lupus. *Cell Metab* . 2015 Oct 6;22(4):606-18.
- 28 Robert T1, Vanoli F, Chiolo I, Shubassi G, Bernstein KA, Rothstein R, Botrugno OA, Parazzoli D, Oldani A, Minucci S, Foiani M. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature*. 2011 Mar 3;471(7336):74-9.
- 29 Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* . 1999 Sep 9;401(6749):188-93.

- 30 Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* . 2014 Nov;15(11):703-8.
- 31 Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD and Caldas C. (2007) "Cancer genetics of epigenetic genes." *Hum. Mol. Genet.* 16 SpecNo1 R28-49. PMID 17613546
- 32 Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* . 2005 Mar;25(3):552-63.
33. Taunton J1, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. 1996 Apr 19;272(5260):408-11.
- 34 Kim DW1, Lassar AB. Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2. *Mol Cell Biol*. 2003 Dec;23(23):8704-17.
- 35 Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, Harada T, Takaoka K, Kato H, Tamai K, Kaneda Y. Comparative roles of Twist-1 and Id1 in transcriptional regulation by BMP signaling. *J Cell Sci* . 2007 Apr 15;120(Pt 8):1350-7.
- 36 Downes M1, Ordentlich P, Kao HY, Alvarez JG, Evans RM. Identification of a nuclear domain with deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10330-5.
- 37 Hu X, Zhang X, Dai L, Zhu J, Jia Z, Wang W, Zhou C, Ao Y. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes the osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells by altering the epigenetic modifications on Runx2 promoter in a BMP signaling-dependent manner. *Stem Cells Dev* . 2013 Jan 15;22(2):248-55
- 38 Jeong SG, Ohn T, Kim SH, Cho GW. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of neuroprogenitors in human bone-marrow mesenchymal stromal cells. *Neurosci Lett* . 2013 Oct 25;554:22-7.
- 39 Jung ID1, Lee JS, Jeong YI, Lee CM, Chang JH, Jeong SK, Chun SH, Park WS, Han J, Shin YK, Park YM. Apicidin, the histone deacetylase inhibitor, suppresses Th1 polarization of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009 Apr-Jun;22(2):501-15.
- 40 Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* . 1995 May;17(5): 423 -30.
- 41 Tsutsumi, S. et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 413-419, doi:10.1006/bbrc.2001.5777 (2001).
- 42 Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312 (1997).
- 43 Nørgaard, R., Kassem, M. & Rattan, S. I. Heat shock-induced enhancement of osteoblastic differentiation of hTERT-immortalized mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 443-447, doi:10.1196/annals.1354.063 (2006).

- 44 Mizuno N, Ozeki Y, Shiba H, Kajiya M, Nagahara T, Takeda K, Kawaguchi H, Abiko Y, Kurihara H. Humoral factors released from human periodontal ligament cells influence calcification and proliferation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* . 2008 Dec;79(12):2361-70.
- 45 Isenmann, S. et al. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem Cells* 27, 2457-2468, doi:10.1002/stem.181 (2009).
- 46 Oshima, A. et al. A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist. *J Cell Biochem* 86, 792-804, doi:10.1002/jcb.10272 (2002).
- 47 Merle B1, Bouet G, Rousseau JC, Bertholon C, Garnero P. Periostin and transforming growth factor β -induced protein (TGF β 1p) are both expressed by osteoblasts and osteoclasts. *Cell Biol Int*. 2014 Mar;38(3):398-404.
- 48 Kaewsrichan, J., Wongwitwichot, P., Chandarajoti, K., Chua, K. H. & Ruszymah, B. H. Sequential induction of marrow stromal cells by FGF2 and BMP2 improves their growth and differentiation potential in vivo. *Arch Oral Biol* 56, 90-101, doi:10.1016/j.archoralbio.2010.09.003 (2011).
- 49 Ueno K, Katayama T, Miyamoto T, Koshihara Y. Interleukin-4 enhances in vitro mineralization in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* . 1992 Dec 30;189(3):1521-6.
- 50 Xu QC1, Wang ZG1, Ji QX1, Yu XB1, Xu XY1, Yuan CQ1, Deng J1, Yang PS2. Systemically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells contributing to bone tissue regeneration. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Jul 15;7(8):4922-9.
- 51 Yang, N. et al. Tumor necrosis factor α suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 28, 559-573, doi:10.1002/jbmr.1798 (2013).
- 52 Dighe, A. S., Yang, S., Madhu, V., Balian, G. & Cui, Q. Interferon gamma and T cells inhibit osteogenesis induced by allogeneic mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res* 31, 227-234, doi:10.1002/jor.22212 (2013).
- 53 Suzuki, K., Onoe, K. & Takahira, H. Activation of Ca(2+)-dependent K⁺ channel and Cl⁻ conductance in canine pancreatic acinar cells through a cyclic AMP pathway. *Jpn J Physiol* 42, 267-281 (1992).
- 54 Ghosh AK1, Mori Y, Dowling E, Varga J. Trichostatin A blocksTGF β -inducedcollagengeneexpression in skinfibroblasts: involvement of Sp1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 9;354(2):420-6.
- 55 Kock, A. L. & Levy. H. R.: Protein turnover in growing cultures of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 217, 947-957 (1955)

- 56 Chen TH, Chen WM, Hsu KH, Kuo CD, Hung SC. Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* . 2007 Apr 20;355(4):913-8.
- 57 Maroni P1, Brini AT, Arrigoni E, de Girolamo L, Niada S, Matteucci E, Bendinelli P, Desiderio MA. Chemical and genetic blockade of HDACs enhances osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells by oppositely affecting osteogenic and adipogenic transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 16;428(2):271-7.
- 58 Paino F1, La Noce M, Tirino V, Naddeo P, Desiderio V, Pirozzi G, De Rosa A, Laino L, Altucci L, Papaccio G. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells*. 2014 Jan;32(1):279-89.
- 59 Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, Khater SM, Ashamalla SA, Ismail AM, El-Halawani SM, Ghoneim MA. Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Insulin-Producing Cells: Evidence for Further Maturation In Vivo. *Biomed Res Int* . 2015;2015:575837.
- 60 Cho YD, Yoon WJ, Kim WJ, Woo KM, Baek JH, Lee G, Ku Y, van Wijnen AJ, Ryoo HM. Epigenetic modifications and canonical wingless/int-1 class (WNT) signaling enable trans-differentiation of nonosteogenic cells into osteoblasts. *J Biol Chem* . 2014 Jul 18;289(29):20120-8.
- 61 Ishiguro K1, Sartorelli AC. Coinduction of embryonic and adult-type globin mRNAs by sodium butyrate and trichostatin A in two murine interleukin-3-dependent bone marrow-derived cell lines. *Blood*. 1998 Dec 1;92(11):4383-93.
- 62 Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC (2005). "Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 495–528.
- 63 Agudelo M, Gandhi N, Saiyed Z, Pichili V, Thangavel S, Khatavkar P, Yndart-Arias A, Nair M. Effects of alcohol on histone deacetylase 2 (HDAC2) and the neuroprotective role of trichostatin A (TSA). *Alcohol Clin Exp Res* . 2011 Aug;35(8):1550-6.

Gene	Assay ID
β-actin	4310881E
RUNX2	Rn01512298_m1
OPN	Hs00959010_m1
OC	Hs01587814_g1

gene	Sequence (5' → 3')
β-actin	F:CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA
	R:AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA
HDAC2	F:CAG ATC GTG TAA TGA CGG TAT CA
	R:CCT TTT CCA GCA CCA ATA TCC

表 1 Real-time PCR に用いた Gene Expression Assay の Assay ID (TaqMan®) およびプライマーの塩基配列 (SYBR® Green)