

# 論文内容要旨

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

主指導教員：栗原 英見教授

(応用生命化学部門 歯周病態学)

副指導教員：柴 秀樹教授

(統合健康科学部門 歯髓生物学)

副指導教員：加藤 功一教授

(基礎生命科学部門 生体材料学)

高橋 慶太

(医歯薬学総合研究科 歯周病態学専攻)

## 論文内容要旨

論文題目：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

**目的：**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。移植された MSC は局所において様々な刺激を受けて増殖・分化し、歯周組織再生が達成されることから、歯周組織構成細胞から分泌される液性因子が MSC の増殖・分化を中心とした細胞機能に影響を及ぼすと考えられる。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は、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すことが知られており、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 の関与に着目し、歯周組織構成細胞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。

**材料と方法：** Transwell®を用いて下層に MSC、上層に MSC、歯肉線維芽細胞 (HGF) あるいは歯周靭帯細胞 (HPL cells) を培養する非接触共培養を行った。始めに骨分化誘導条件下で共培養を行い、下層の MSC から total RNA を回収し、骨分化関連遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法によって検討した。さらに石灰化の比較をアリザリンレッド染色によって検討した。

次に未分化条件下および骨分化誘導条件下における HDAC1 および HDAC2 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法、HDAC1 および HDAC2 の活性およびヒストン 3 のアセチル化をウェスタンブロッティング法によってそれぞれ解析し検討した。

さらに HDAC 活性調整の影響を検討するため、HDAC 阻害剤トリコスタチン A(TSA)を MSC に作用させ、骨分化誘導時の HDAC1、HDAC2、RUNX2、オステオポンチン(OPN) オステオカルシン(OC)の mRNA 発現の比較をリアルタイム PCR、石灰化の比較を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活性をアルカリフォスファターゼ染色によってそれぞれ比較検討を行った。

**結果と考察：** MSC は骨分化誘導条件下において HPL cells との共培養では OPN、RUNX2、OC の mRNA 発現の抑制、HGF との共培養では OPN の mRNA 発現の抑制が見られた。両者においてアリザリンレッド染色の抑制が認められたことから共培養によって MSC の骨分化能が抑制されることが示唆された。同条件において、HPL

cells との共培養では HDAC1 および HDAC2 の mRNA 発現の有意な減少が見られ、タンパク質レベルでもリン酸化 HDAC1 およびリン酸化 HDAC2 発現の減少が見られた。また、未分化条件下においては HDAC1 mRNA 発現上昇したが、HDAC2 では変化は認めず、タンパク質レベルにおいても同様の傾向であった。

一方、HGF との共培養では骨分化誘導時に HDAC1 の mRNA 発現が上昇し、HDAC2 では mRNA の変化はなかったが、タンパク質レベルでは両者とも有意に減少した。さらに HPL cells または HGF との骨分化誘導条件下共培養においては HDAC1 および HDAC2 の活性低下に伴いアセチル化ヒストン 3 の発現がタンパク質レベルで上昇した。一方、未分化条件下ではリン酸化 HDAC 1 がタンパク質レベルで上昇したにもかかわらずアセチルヒストン 3 の発現がタンパク質レベルで上昇がした。

次に、MSC 骨分化誘導時の TSA の影響を検討した。骨分化誘導培地において TSA 添加群では、非添加群と比較してアリザリンレッド染色、フォンコッサ染色およびアルカリフォスファターゼ染色において染色度が限弱していた。RUNX2, OPN, OC などの骨分化関連遺伝子 mRNA 発現の減少もしていたことから TSA によって HDAC1 および HDAC2 の活性が抑制されたため、骨分化および石灰化が抑制されることが示唆された。

以上のことから HPL cells や HGF からの液性因子が MSC 内部の HDAC1 または HDAC2 に作用し、これらの活性制御およびヒストン 3 のアセチル化を介して MSC の骨分化の制御に関与していることが示唆された。

**結論：** HPL cells や HGF の液性因子によって、HDAC はヒストンのアセチル化を介し MSC の骨分化に影響を与えた。