

研究者：高橋亜友美（所属：北海道医療大学口腔構造・機能発育学系小児歯科分野）

研究題目：エナメル上皮細胞石灰化過程におけるエピジェネティクスの関与

目的：

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。エピジェネティクスの関与は、疾病だけでなく歯牙発生や細胞分化の過程において、遺伝子が適切に制御されるために重要な役割を果たしていることが報告されている。歯牙発生では、グルコースは必須なエネルギー源であり、グルコース代謝はFOXOにより行われている。近年、器官発生にはエピジェネティックな修飾が必要不可欠であることが明らかになった。エピジェネティックのメカニズムにはDNAメチル化とヒストン修飾があり、抗がん剤の研究において、FOXOもメチル化を受けているが報告されている。本研究では、歯牙発生におけるエピジェネティックな関与を明らかにし、エナメル質の自己修復能力を利用して再石灰化の誘導を行うことを目的とした。

方法：

細胞はラット由来歯原性上皮細胞株（SF2細胞，東北大学福本敏教授から供与）を用いた。1 × 10⁵ cells/mLのSF2細胞を10% FBSおよび1% ペニシリン-ストレプトマイシン含有DMEM/ F12（SIGMA）を使用し、37° C, 5% CO₂条件下にて培養を行った。定着後ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬（HDACi）であるバルプロ酸ナトリウム（VPA），酪酸ナトリウム（NaB）およびMS-275をそれぞれ添加した。controlとして溶媒であるα-MEM（SIGMA）を用いた。10日間培養後、アリザリンレッドS法にて石灰化物の染色を行った。またSF2細胞を培養後、MS-275, VPA, TSAおよびNaBをそれぞれ添加し、5日間および10日間培養した。その後、SF2細胞にTrizol[®] reagent（Invitrogen）を滴下し、通法に従いtotal RNAを抽出し、cDNAを作製した。HDAC class I, II a, II b, III, エナメルマトリックスであるAmelogenin, Ameloblastin, Enamelin, エナメライシン（MMP-20）およびカリクレイン4（KLK4）についてRT-PCRによる発現変化を確認した。

結果および考察：

SF2細胞では石灰化培地のみと比較し、HDACiを添加することにより石灰化の亢進が認められた。

SF2細胞はDMEM/ F12および石灰化培地においてAmelogeninの発現を認め、MS-275添加では強発現を認めた。しかし、VPA添加では発現が減少し、NaBを添加することで発現が消失した。またEnamelinはDMEM/ F12およびVPA添加において発現を認めるものの石灰化培地、NaBおよびMS-275では発現は消失した。

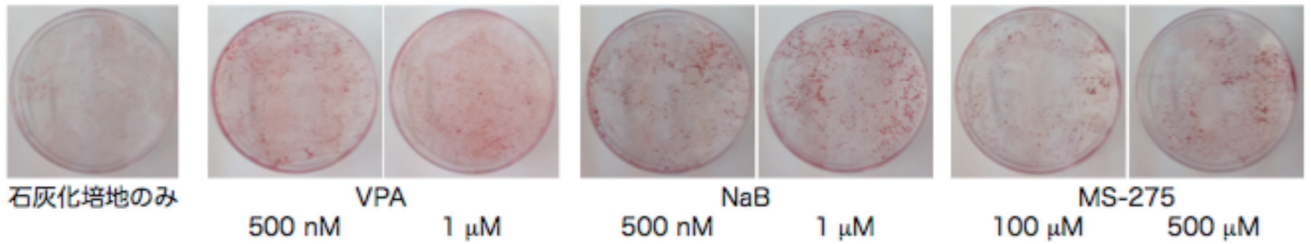


Fig.1 アリザリンレッドS染色

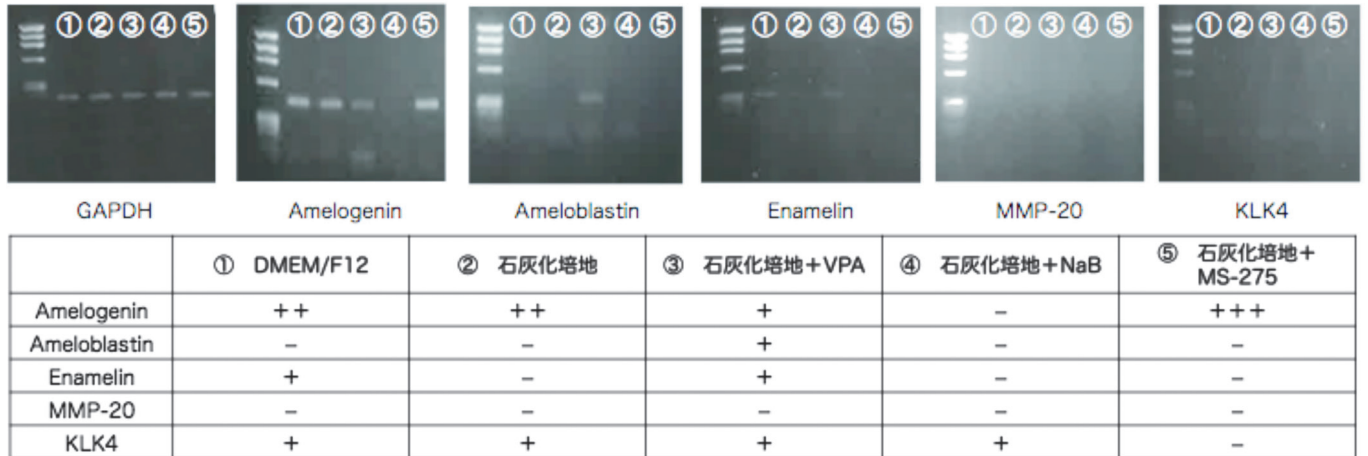


Fig2 RT-PCR

考 察：

SF2細胞にHDACiを添加することにより石灰化の亢進を認めたことから、石灰化にHDAC class IおよびII aが関与していることが考えられた。

HDAC Class I 選択的阻害薬であるMS-275を添加することにより、Amelogeninの発現が上昇し、KLK4の発現が消失したことから基質形成期が維持されたため、HDAC Class Iがエナメル芽細胞分化過程に関与していることが示唆された。

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）

現在，投稿論文作成中。