

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792316

研究課題名(和文) ヒト歯根膜線維芽細胞のマーカー遺伝子とエピジェネティックな遺伝子発現の探索

研究課題名(英文) Research of marker gene expression by epigenetic control in human periodontal ligament fibroblasts

研究代表者

石川 美佐緒 (ISHIKAWA, Misao)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90582445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜線維芽細胞に強発現していると報告のあるアルカリフォスファターゼ(ALP)遺伝子に注目し、その遺伝子発現や活性がエピジェネティックな(特にDNAメチル化による)制御によって変化するのか、ALPプロモーター領域をバイサルファイトシーケンス解析を行うことで検討した。その結果、ALP遺伝子の発現はエピジェネティックなレベルの制御を受けているとは考えにくく、その活性は他の転写因子などの影響を受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alkaline phosphatase (ALP) gene is expressed strongly in human periodontal ligament fibroblasts. We examined the changes of the gene expression and activity by epigenetics control (by DNA methylation in particular) using a bisulfite sequence analysis of ALP promoter region. These results suggested that expression of ALP gene is not under the control of epigenetics, and the change of activity is affected by transcription factors.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯根膜線維芽細胞 アルカリフォスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

これまで線維芽細胞の中でも歯根膜線維芽細胞(PDLc)の特異的な性質について数多くの論文報告がある。また、ヒト歯根膜線維芽細胞(hPDLc)を同定するためにさまざまな研究が行われているが未だに確実なものはない。我々は、以前からhPDLcを特徴づける遺伝子について探索するため、ヒトの皮膚・歯肉・hPDLcを培養し、そこからマイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析をGene Ontology(on line)に基づき分析を開始し、それぞれのデータを比較検討してきた。そして近年、遺伝子やタンパク質の機能がいかに選択的に活性化、または、不活性化されるのかということ、「エピジェネティクス」レベルの制御と転写因子が連携し、遺伝子の転写抑制をして調整していると言われていた。そして、このエピジェネティクス制御機構の一つにDNAメチル化があり、このDNAメチル化プロファイルによって遺伝子発現制御を通じて細胞の形態・機能が細胞分裂を経ても安定して伝承されていると考えられ始めてきた。これらのことより、現在、分析中のマイクロアレイ解析にDNAメチル化プロファイル解析を加えることで、hPDLcの特異性についてより詳細なデータを取得することができhPDLcのマーカー遺伝子の確定に寄与すると思われた。

2. 研究の目的

以前からの報告より、皮膚や歯肉線維芽細胞と比べてhPDLcに特異的に強発現していると報告があるアルカリフォスファターゼ(ALP)遺伝子に注目し、その発現やその活性変化がエピジェネティクスな(特にDNAメチル化による)制御によって生じているのかについて、皮膚や歯肉線維芽細胞と比較を行いhPDLcのゲノムレベルの特徴と共に探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒト皮膚(KURABOU Co., Ltd., Osaka, Japan)・歯肉(Gin-1, DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)・歯根膜線維芽細胞(Lonza Biosciences, Basel, Switzerland)のマイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析

3つの細胞(5~7継代目を使用)を通常培養(stromal cell basal medium (SCBM™, Takara Bio Inc., Otsu, Japan) supplemented with growth factors (basic fibroblast growth factor, insulin)+ 10%FBS + gentamicin/amphotericin-B)を行いRNA抽出後、受託システムを利用しマイクロアレイによる発現遺伝子のデータ結果を得て、ALP遺伝子(ALPL)のFold Changeを比較検討。

(2)ヒト皮膚・歯肉・PDLcのALP活性とALP遺伝子発現の確認

3つの細胞を通常培養後、ALP染色(TRAP and ALP assay kit, Takara Bio Inc., Otsu,

Japan)を行い吸光度(OD 405nm)によるALP活性測定。

3つの細胞の通常培養を行いRNA抽出後、cDNAへ変換 RT-PCRにてALPL発現の確認。また、同様に3つの細胞のALPLプロモーター発現の確認。

(3)ヒト皮膚・歯肉・PDLcのALPLプロモーター領域のDNAメチル化解析

3つの細胞のDNAサンプルをパイサルファイト処理し、ALPLプロモーターの塩基配列領域を中心にPCRとクローニング処理後、シーケンス解析。

(4)ヒト皮膚・歯肉・PDLcのALP活性変化の観察

3つの細胞を石灰化誘導培地

(Osteoblast-Inducer Reagent (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)で28days培養を行い、経時的にALP染色によるALP活性測定。

28dayには、Alizaline red S染色とvon Kossa染色による石灰化物形成の確認。

hPDLcを石灰化誘導培地で培養1.3.7daysの経時的発現遺伝子の網羅的解析。

hPDLcを石灰化誘導培地で培養後1.3.7daysのRNA抽出を行い、受託システムを利用しマイクロアレイによる発現遺伝子のデータ結果を得て、発現遺伝子のFold Changeを経時的に比較検討。

4. 研究成果

ヒト皮膚(DF)とヒト歯根膜線維芽細胞

(hPDLc)のマイクロアレイ解析を比較した結果、ALPLの発現はhPDLcで約6.2倍上昇、ヒト歯肉(GF)とhPDLcの比較ではhPDLcで約14.5倍上昇していた。通常培養においてhPDLcのALPL発現は他の線維芽細胞と比べて大きく上昇していることが分かった。

ALP活性測定にALP染色を用いて行くと、通常培養のhPDLcでのみ陽性反応を示し(Fig.1)、吸光度測定を行うと他の線維芽細胞(GF, DF)よりも2倍以上のALP活性を示した(Fig.3)。

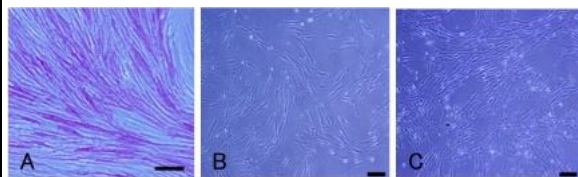


Fig.1 ALP染色後の組織像

A; ヒト歯根膜線維芽細胞(PDL)、B; ヒト歯肉線維芽細胞(GF)、C; ヒト皮膚線維芽細胞(DF)。PDLのみALP染色が陽性を示した。

Bar; 200 μ m

ゲノムレベルの確認を行うため、RT-PCRを用いてALPL発現を確認したところ、全ての細胞(hPDLc, GF, DF)で発現していることを確認した。また、ALPL発現のプロモーターは2つある(SP1, SP3)とされており、それらプロモーターの発現を確認したところ、3つの線維芽細胞のそれぞれのプロモーター発現も確認した(Fig.2)。この結果、Fig.1のALP染色結

果とは異なり、3つの細胞のALPL遺伝子が働いていることが分かった。

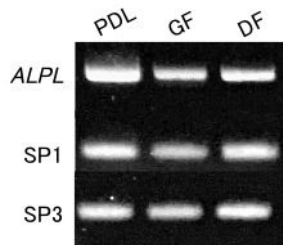


Fig.2 Alkaline phosphataseのRT-PCR 全ての細胞のALPL発現とそのプロモーター(SP1, SP3)の発現を認めた。

次に、3つの細胞の2つのプロモーター領域のDNAメチル化解析を行うため、パイサルファイトシーケンス解析を用いた結果、全ての細胞の両方のプロモーター領域が脱メチル化状態であることが分かり、細胞に特異的なDNAメチル化プロファイルを得ることができなかった。この結果、ALPL発現にはエピジェネティクスな(DNAメチル化による)制御を受けていないことが分かった。

ALPLプロモーター領域のDNAメチル化プロファイルに細胞特異的な情報が得られなかったことから、他の因子によるALP活性変化が生じていることが考えられるため、全ての細胞(hPDLc, GF, DF)を石灰化誘導培地で培養し、経時的にALP活性測定を行い、その変化を確認した。その結果、hPDLcで14dayをピークとした特異的なALP活性変化を示した(Fig.3)。しかし、GFとDFにはALP活性に大きな変化はみられなかった。

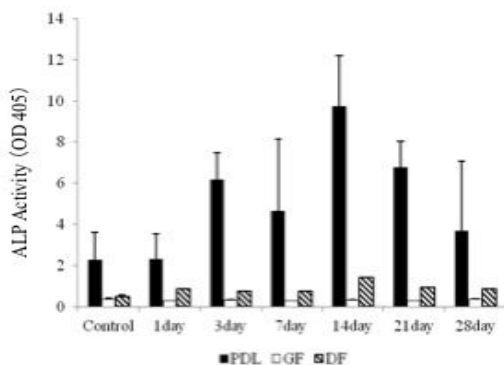


Fig. 3 石灰化誘導培地で培養した際の経時的なALP活性の測定 PDLは通常培養時でもGF、DFと比べALP活性が高く、14dayをピークに経時的な活性変化を示した。

また、石灰化物の産生を確認したところ、28dayでhPDLcにのみAlizaline red S染色と von Kossa染色で陽性反応を示し、従来通りhPDLcのみ石灰化物の産生能を確認した(Fig.4)。このことより、hPDLcを石灰化誘導

培地で培養を行うと、ALP活性変化を起こしながら骨芽細胞に分化し、石灰化物の産生を行っていると考えられる。

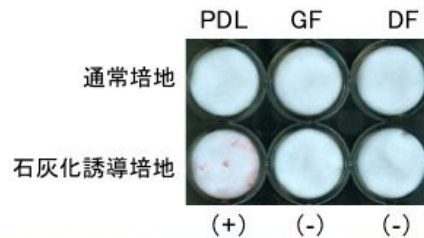


Fig.4 石灰化誘導培地で28日間培養後の石灰化物の確認 上段; Alizaline red S染色、下段; von Kossa染色 PDLのみに石灰化物産生を確認した。

さらにALP活性変化を起こしている因子を探るため、石灰化誘導培地で培養したhPDLcのALP活性が急激な上昇を示す7dayまでを、マイクロアレイによる発現遺伝子の経時的網羅解析を行った。その結果、7dayには20倍以上も上昇する遺伝子が多数あった。その中の特徴的なものとして、STAT4(7day; 約77倍上昇)やASPIN(7day; 約69倍上昇)など転写因子や骨・軟骨形成に関与する遺伝子の発現が上昇していることが分かった(Fig.5)。今後は、これら遺伝子の発現確認と、その遺伝子とALP活性変化との相互関係について詳しく調べる必要がある。

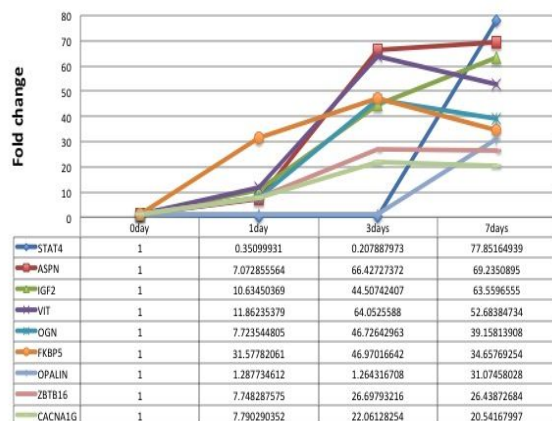


Fig.5 石灰化誘導培地で培養したPDLのマイクロアレイ解析の経時的な結果 (20倍以上の上昇を示した遺伝子) 転写因子や骨・軟骨形成に関わる遺伝子の発現が大きく上昇している。

以上のことより、線維芽細胞の中でも特異的に強発現を示しhPDLcの特徴の一つとされているALP遺伝子の発現やその活性変化は、エピジェネティクスなレベルの制御よりも転写因子などのゲノムレベルでの影響を受けていることが示唆された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 美佐緒 (ISHIKAWA MISAO)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90582445

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し