

DNA脱メチル化作用による歯髄細胞の石灰化誘導

著者	吉田 光希, Shamima SULTANA, 高橋 周平, Ariuntsetseg KHURELCHULUUN, Durga PAUDEL, 森川 哲郎, 佐藤 惇, 永易 裕樹, 斎藤 隆史, 安彦 善裕
雑誌名	北海道医療大学歯学雑誌
巻	39
号	1
ページ	23-30
発行年	2020-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064864/

〔原著〕

DNA脱メチル化作用による歯髄細胞の石灰化誘導

吉田 光希¹⁾, Shamima SULTANA²⁾, 高橋 周平¹⁾, Ariuntsetseg KHURELCHULUUN³⁾, Durga PAUDEL¹⁾,
森川 哲郎¹⁾, 佐藤 惇¹⁾, 永易 裕樹³⁾, 斎藤 隆史²⁾, 安彦 善裕¹⁾

- 1) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野
 2) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野
 3) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野

Calcification-induction of dental pulp cell by DNA demethylation

Koki YOSHIDA¹⁾, Shamima SULTANA²⁾, Shuhei TAKAHASHI¹⁾, Ariuntsetseg KHURELCHULUUN³⁾,
Durga PAUDEL¹⁾, Tetsuro MORIKAWA¹⁾, Jun SATO¹⁾, Hiroki NAGAYASU³⁾, Takashi SAITO²⁾,
Yoshihiro ABIKO¹⁾

- 1) Division of Oral Medicine and Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
 2) Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
 3) Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Dental pulp cells, Calcification, DNA demethylation

Abstract

This study investigated the calcification-inducing ability of porcine dental pulp cells using the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5Aza).

A cytotoxicity test on the porcine dental pulp cells showed that the optimal concentration of 5Aza was 1.0 μM. For calcification-induction, porcine dental pulp cells were cultured for 1 week under different culture conditions in :
 ① an 1.0 μM 5Aza-free group in α-MEM [Con(Mem)],
 ② an 1.0 μM 5Aza-added group in α-MEM medium [5Aza(Mem)],
 ③ an 1.0 μM 5Aza-free group in calcification induction medium containing Osteoblast-inducer reagent [Con(Oi)], and
 ④ an 1.0 μM 5Aza-added group in a calcification induction medium containing Osteoblast-inducer

reagent [5Aza(Oi)]. As a result of qRT-PCR, the expression levels of *Alp*, *Oc*, and *Msx1* mRNA were significantly increased in the 5Aza(Oi) compared to Con(Mem). With Alizarin red staining, a significantly increased level of calcification was observed in 5Aza(Oi) over that in Con(Mem). As a result of flow cytometry, the ALP / OC positive cell rate was significantly higher in 5Aza(Oi) than in Con(Mem). As a result of the MSP, the methylation rate of *Msx1* was significantly decreased in 5Aza(Oi) compared to Con(Mem). Porcine dental pulp cells may induce calcification more effectively with 5Aza under calcification-inducing culture conditions.

緒 言

エピジェネティクスは、細胞の脱分化や幹細胞の維持など様々な細胞分化を制御しており、主にDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (DNA methyltransferase inhibitors, DNMTi) やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

(histone deacetylase inhibitors, HDACi) の2つの作用により線維芽細胞が幹細胞化することが報告されている (Huangfu et al., 2008; Mikkelsen et al., 2008). 近年では歯髄幹細胞の再生医療への応用に注目が集まっており (Grando et al., 2007; Nuti et al., 2016; Luo et al., 2018), 抜去歯の歯髄由来幹細胞を応用する研究等が進められて

いる (Potdar and Jethmalani, 2015). また, 歯髄細胞に遺伝子導入をすることで歯髄由来幹細胞を作製した報告もあるが (Tamaoki et al., 2010), 遺伝子導入には癌化リスクのある点が課題である. さらに, 歯髄幹細胞の再生医療応用への課題としては, 歯髄における歯髄幹細胞の割合の低いことが挙げられる. 明確な歯髄幹細胞の割合は明らかとなっていないが, 一般に, Subpopulation細胞のひとつで, 幹細胞特性を有したSide Population (SP) 細胞は全細胞集団のうちおよそ1%未満しか存在しないことから, 歯髄幹細胞の割合も低いことが想定される (Iohara et al., 2006; Kato, 2012). この課題への解決策として, 歯髄幹細胞のみを再生医療へ応用するだけでなく, 癌化リスクの少ないエピジェネティクス修飾技術を応用することで, 歯髄幹細胞以外の歯髄細胞も目的の細胞へより効率的に分化誘導させることが期待されている. その一例として, 歯周組織再生への応用に向け, 歯髄細胞にDNMTiやHDACiといった小分子化合物のエピジェネティクス試薬を用いることで石灰化を促進させる研究等が報告されている. しかしながら, その多くはHDACiであるtrichostatin Aやvalproic acidなどの小分子化合物を用いた報告であり, DNMTiによるものはZhangらの報告しかなく (Zhang et al., 2015; Kearney et al., 2018). また, Zhangらの報告では, DNMTiの1.0 μM 5-Aza-2'-deoxycytidine (5Aza) でヒト歯髄細胞を刺激した結果, 48時間以上の作用時間では細胞毒性を示したことから, 5Azaを24時間の作用時間に留めている. しかしながら我々の先行研究では, ブタマラッセ上皮細胞に1.0 μM 5Azaで1週間刺激したところ, 細胞毒性を示さなかった. ヒト歯髄細胞とブタ歯髄細胞では動物種の違いによる作用薬の影響に違いがみられることから (Tonomura et al., 2007), 動物種の違いによる作用薬の影響について検証が必要であると考えられた.

そこで本研究では, 5Azaのブタ歯髄細胞への細胞毒性を検討するとともに, 未だ報告の少ないDNMTiを応用したブタ歯髄細胞の石灰化誘導能について検討した.

材料および方法

1. ブタ歯髄細胞の分離培養

ブタ歯髄細胞は, ホクレン苦小牧支所畜産販売課で購入した6ヶ月齢のブタ下顎骨 (HOKUREN Federation of Agricultural Cooperatives, Hokkaido, Japan) から臼歯を抜き, タービンバーで歯髄腔穿孔後に摘出した歯髄を60 mm cell culture dish (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に静置した. 培地として, 10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific,

MA, USA) と, 抗菌薬として100 mg/mlペニシリンGカリウム (Meiji seika, Tokyo, Japan) および30 mg/ml Fungizone (Bristol-Myers Squibb, Tokyo, Japan) 含有のMinimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification (α -MEM) 培地 (Gibco) を使用した. 2日後より, 培地を10% FBS および2% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, MO, USA) 含有 α -MEMに変更し, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 下でコンフルエンスになるまでおよそ2ヶ月間培養した.

2. 5Azaの細胞毒性試験

DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (DNA methyltransferase inhibitors, DNMTi) である5-Aza-2'-deoxycytidine (5Aza) のブタ歯髄細胞への細胞毒性を調べるために, 60 mm cell culture dish (Gibco) にブタ歯髄細胞を 0.8×10^6 cells/mL濃度で播種し, α -MEMに5 Aza (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を0.10, 1.0, 10.0 μM 濃度で添加した. Control (Con) を5Aza添加無しとした. 2日毎に培地交換および5Aza添加を行いながら, 7日間培養を行った. 培養7日目に0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) でcell culture dishより剥離し遠心後, Phosphate Buffered Saline (PBS) で調整した0.5% Trypan Blue溶液にて死細胞を染色後, 位相差顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) および血球計算盤を用いて生細胞数を測定した.

3. 5Azaによるブタ歯髄細胞の石灰化誘導

細胞毒性試験の結果より, ブタ歯髄細胞における5 Azaの至適濃度を1.0 μM と決定した. 次いで, 5Azaによるブタ歯髄細胞の石灰化誘導を試みた. 3-4継代目のブタ歯髄細胞を 0.8×10^6 cells/mLで60 mm cell culture dishに播種し, ① α -MEM培地群 [Con (Mem)], ② α -MEM培地に1.0 μM 5 Azaを添加した群 [5 Aza (Mem)], ③石灰化誘導培地のOsteoblast-Inducer Reagent (Takara bio, Shiga, Japan) 含有RPMI 1640 Medium (Gibco) 群 [Con (Oi)], ④Osteoblast-Inducer Reagent含有RPMI1640Mediumに1.0 μM 5Azaを添加した群 [5 Aza (Oi)] の各培養条件に分け, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 下で1週間培養した. 培養7日目に, 位相差顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いて細胞形態を観察, 撮影した.

4. 石灰化マーカーにおけるmRNA発現レベルの定量的評価

ブタ歯髄細胞の石灰化状態の確認は, 定量的real-time

reverse transcription polymerase chain reaction (quantitative real-time RT-PCR, qRT-PCR) 法による石灰化マーカーのmRNA発現レベルを検討した。上記①～④の各培養条件で1週間培養後に、RNA抽出液Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA) にてtotal RNAを抽出した。1 µgのtotal RNAを、Oligo (dT)₁₂₋₁₈Primer及びSuperscript reverse transcriptase (Invitrogen) により逆転写を行った。得られたcDNAを、石灰化マーカーである*collagen type I alpha 2 (Col1a2)*, *alkaline phosphatase (Alp)*, *osteocalcin (Oc)* および*msh homeobox 1 (Msx1)* のプライマー (表1, Komori, 2010; Goto et al., 2016) とKAPA SYBR Fast qPCR Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) を用いて、Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) により、各mRNA発現量を定量的に検討した。なお、内在性Controlにはブタ*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)*, (表1) を用い、55 °Cのアニーリング温度で目的遺伝子の増幅を行った。解析には $\Delta\Delta C_t$ (Cq) 法 (Livak and Schmittgen, 2001; Bustin et al., 2009) を用いた。

5. Alizarin red染色による石灰化評価

ブタ歯髄細胞の石灰化状態の蛋白発現レベルの確認は、Alizarin red染色による石灰化評価を行った。

ブタ歯髄細胞を24 well plate (IWAKI, Tokyo, Japan) に 0.05×10^6 cells/mL濃度で播種し、各培養条件①～④のもと1週間培養後PBSで洗浄し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で15分間固定した。固定後PBSで洗浄し、石灰化評価セット (PGリサーチ, Tokyo, Japan) のAlizarin red溶液を0.5 mL/wellで添加し、室温で30分間染色した。染色後PBSで洗浄後、石灰化結節溶解液 (5%ギ酸) を0.5 mL/wellで添加し、プレートを10分間攪拌し

て色素を溶出した。溶出液100 µLを測定用96 well assay plate (IWAKI) に移し、450 nmの吸光度を測定した。

6. Flow cytometry解析による石灰化評価

ブタ歯髄細胞の石灰化状態は、Flow cytometryによる蛋白発現レベルでの陽性細胞率を検討した。上記培養条件のうち①Con (Mem) と④5Aza (Oi) を1週間培養後、0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) で60 mm cell culture dishより剥離しFALCON Cell Strainer (100 µm; Corning, NY, USA) を通し遠心後、Alexa Fluor 488 mouse anti-Human alkaline phosphatase (ALP, BD Biosciences, NJ, USA) およびPE mouse anti-human osteocalcin (OC, BD Biosciences) で染色し (暗室, 4 °C, 30分), 死細胞除去のために7-Amino-Actinomycin D (7-AAD, BD Biosciences) で染色した (暗室, 4 °C, 10分)。染色後、Flow cytometer (BD FACSAria IIIu, BD Biosciences) で各細胞群を10,000個ずつ記録しALP・OC共陽性細胞率を測定した。

7. ブタ歯髄細胞におけるDNAメチル化解析

ブタ歯髄細胞への5 AzaによるDNAメチル化の影響を確認するために、上記①～④の各細胞培養群のうちmRNA発現および蛋白発現レベルにおいて有意差のみられた①Con (Mem) と④5Aza (Oi) について、定量的メチル化特異的PCR (quantitative methylation-specific PCR, qMSP) 法によるメチル化レベルの解析を行った。①Con (Mem) と④5Aza (Oi) を1週間培養後、Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてDNAを抽出した。NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) によるDNA濃度測定後、500 ng/µl濃度になるよう調整し、EpiTect Fast Bisulfite Kits

表1 qRT-PCR法およびqMSP法で用いたプライマー配列

Gene	Sequence	Product size (bp)	NCBI Reference Sequence
<i>Gapdh</i>	Forward 5'-GTCGGTTGTGGATCTGACCT-3'	207	NM_001206359.1
	Reverse 5'-TTGACGAAGTGGTCGTTGAG-3'	207	
<i>Alp</i>	Forward 5'-TGCAGGAAGACTCAACTCGG-3'	111	XM_021097681.1
	Reverse 5'-ACCTGCTTCTCTCTGGAGC-3'	111	
<i>Col1a2</i>	Forward 5'-TGCTCAGCTTTGTGGATACG-3'	178	NM_001243655.1
	Reverse 5'-CCTGGGATACCATCACC-3'	178	
<i>Oc</i>	Forward 5'-TCACACTGCTTGCCCTACTG-3'	160	NM_001164004.1
	Reverse 5'-AGCCCATGATCCAGGTAGC-3'	160	
<i>Msx1</i>	Forward 5'-GAGACGCAGGTGAAGATCTGG-3'	99	NM_001162887.1
	Reverse 5'-CATGGGTTTAGCGGCCATC-3'	99	
<i>Msx1-M</i>	Forward 5'-TATTAATGGTTGGTTTTTGTGAGTC-3'	116	
	Reverse 5'-AAACGCAACGATTTTCTACG-3'	116	
<i>Msx1-U</i>	Forward 5'-TATTAATGGTTGGTTTTTGTGAGTT-3'	120	
	Reverse 5'-ATCCAAACACAACAATTTTCTACAC-3'	120	

(Qiagen)によりBisulfite処理を行った。qMSP法を行うために、*Col1a2*、*Alp*、*Oc*および*Msx1*のうち、UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)にてCpG islandsの存在が確認された*Msx1*について、Meth-Primer (<http://www.urogene.org/methprimer/>, Li LC & Dahiya R, 2002)によるMSPプライマーを設計後(表1)、Bisulfite処理されたDNA、MSPプライマー、KAPA SYBR Fast qPCR Kitを用いて、Light Cycler NanoにてqMSP法によるメチル化レベル解析を行った。qMSP法の条件は、95℃で10分間の初期変性後、95℃で10秒間の熱変性、55℃で10秒間のアニーリング、72℃で15秒間の伸長反応を60サイクルとした。メチル化レベルの算出には、以下の計算式を用いた(Lu et al., 2007)。

$$\begin{aligned} \text{Methylated DNA (\%)} &= \frac{M}{M+U} \times 100(\%) = \frac{1}{1+\frac{U}{M}} \times 100(\%) \\ &= \frac{1}{1+2^{(-\Delta Cq)}} \times 100(\%) \end{aligned}$$

M; メチル化DNAレベル (the level of methylated DNA, M), U; 非メチル化DNAレベル (the level of unmethylated DNA, U), $\Delta Cq = CqU - CqM$.

8. 統計分析

得られた結果は、IBM SPSS Statistics 23 (IBM, NY, USA)を用いたKruskal-Wallis検定および χ^2 検定にて比較・検討した。 χ^2 検定では調整済み残差の値が ± 1.96 を両側5%水準とし、 p 値0.05未満を有意差有りと判定した。

結 果

1. 5Azaの細胞毒性試験

ブタ歯髄細胞への5Azaの細胞毒性試験の結果、Conに比べ5Aza添加濃度が10 μ Mで生細胞数の有意な減少を認めた(図1, $*p < 0.05$; Kruskal-Wallis検定)。

2. 各培養条件によるブタ歯髄細胞の位相差顕微鏡像

培養7日目に、位相差顕微鏡を用いて細胞形態を観察、撮影した結果、Con (Mem), α -MEM 5Aza (Mem), Con (Oi), 5Aza (Oi)の各培養条件において細胞の形態に明らかな違いは認められなかった(図2, 原倍率 $\times 100$, Scale bar = 100 μ m)。

3. 石灰化マーカーにおけるmRNA発現レベルの定量的評価

歯髄細胞を1週間培養後、石灰化マーカーについてqRT-PCR法を行った結果、*Alp*、*Oc*および*Msx1*mRNA

発現レベルはCon (Mem)に比べ5Aza (Oi)において有意な発現上昇を認めた(図3, $*p < 0.05$; Kruskal-Wallis検定)。*Col1a2*では有意差はなかったものの、5Aza (Oi)においてmRNA発現レベルの上昇傾向を認めた(図3)。

4. Alizarin red染色による石灰化評価

Alizarin red染色による石灰化程度を評価した結果、wellの全体像では5Aza (Oi)において石灰化結節の出現(赤褐色)を認めた。また、石灰化結節溶解液による色素溶出後に450 nmの吸光度を測定した結果、Con (Mem)に比べ5Aza (Oi)において石灰化程度の有意な上昇を認めた(図4, $*p < 0.05$; Kruskal-Wallis検定)。

5. Flow cytometry解析による石灰化評価

Flow cytometryによるタンパクレベルでのALP・OC共陽性細胞率を検討した結果、細胞10,000個のうち、ALP・OC共陽性細胞数(率)はCon (Mem)で437個(4.4%)、5Aza (Oi)では2,547個(25.5%)となった。この結果から、Con (Mem)に比べ5Aza (Oi)においてALP・OC共陽性細胞率の有意な上昇を認めた(図5および表2, $*p < 0.05$; χ^2 検定)。

6. ブタ歯髄細胞におけるDNAメチル化解析

qMSP法の結果、*Msx1*のメチル化率はCon (Mem)で95.1%、5Aza (Oi)では66.6%となり、Con (Mem)に比べ5Aza (Oi)においてメチル化率の有意な低下を認めた(表3, $*p < 0.05$; χ^2 検定)。

考 察

本研究では、DNMTiである5Azaがブタ歯髄細胞を効

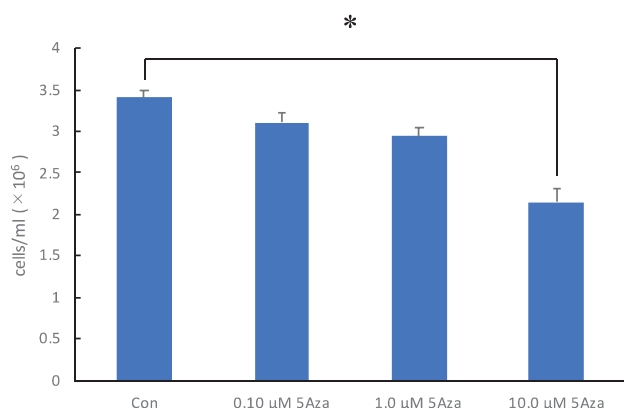


図1 5Azaの細胞毒性試験

ブタ歯髄細胞への5Azaの細胞毒性試験の結果、Conに比べ5Aza添加濃度が10.0 μ Mで生細胞数の有意な減少を認めた($*p < 0.05$; Kruskal-Wallis検定, $n = 3$)。

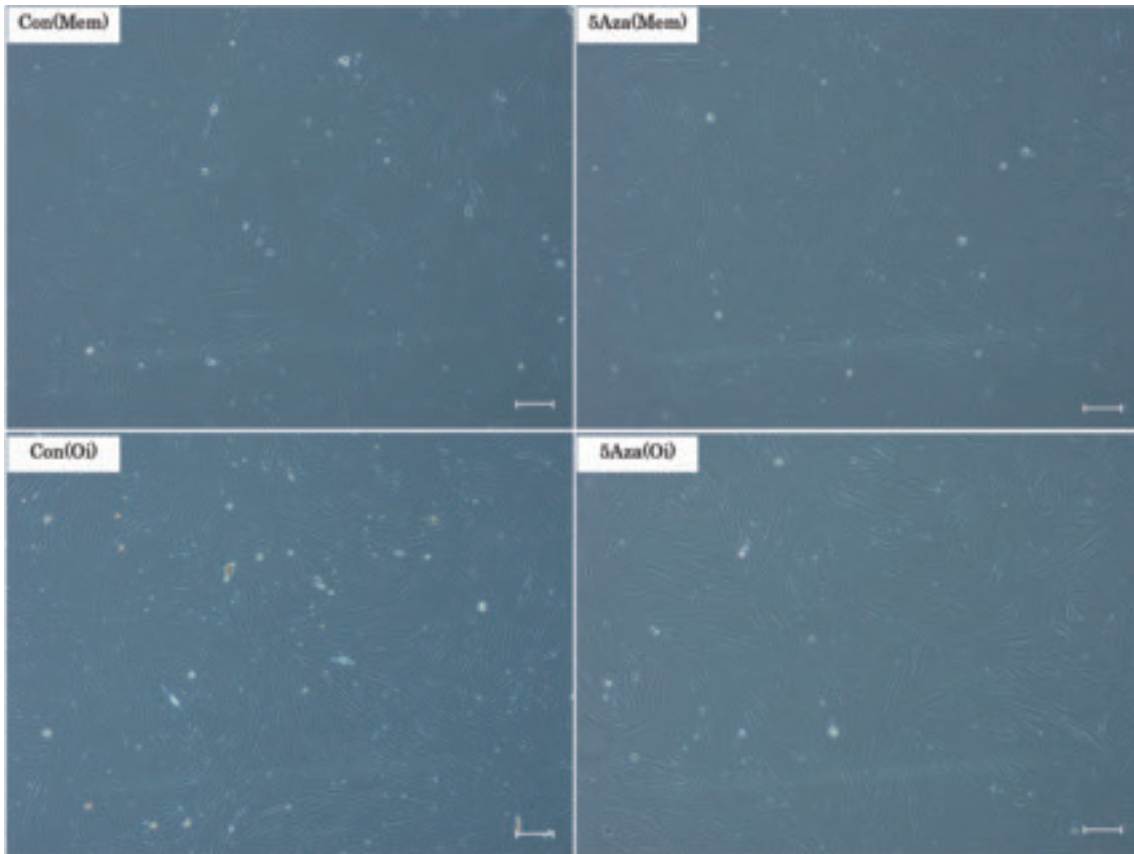


図2 各培養条件によるブタ歯髄細胞の位相差顕微鏡像
培養7日目に、位相差顕微鏡を用いて細胞形態を観察、撮影した結果、Con (Mem), α -MEM 5Aza (Mem), Con (Oi), 5Aza (Oi) の各培養条件において細胞の形態に明らかな違いは認められなかった。原倍率 $\times 100$, Scale bar = 100 μ m.

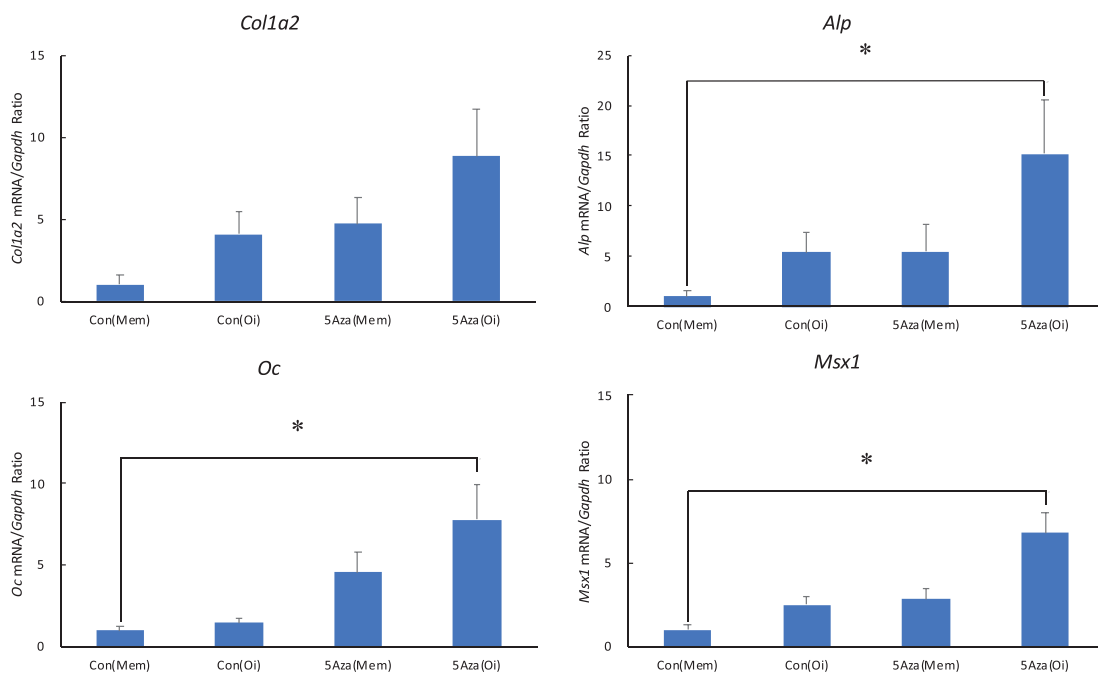


図3 石灰化マーカーにおけるmRNA発現レベルの定量的評価
ブタ歯髄細胞を1週間培養後、石灰化マーカーについてqRT-PCR法を行った結果、*Alp*, *Oc*および*Msx1* mRNA発現レベルはCon (Mem) に比べ5Aza (Oi) において有意な発現上昇を認めた。*Col1a2*では有意差はなかったものの、5Aza (Oi) においてmRNA発現レベルの上昇傾向を認めた (* $p < 0.05$; Kruskal-Wallis検定, $n = 3$).

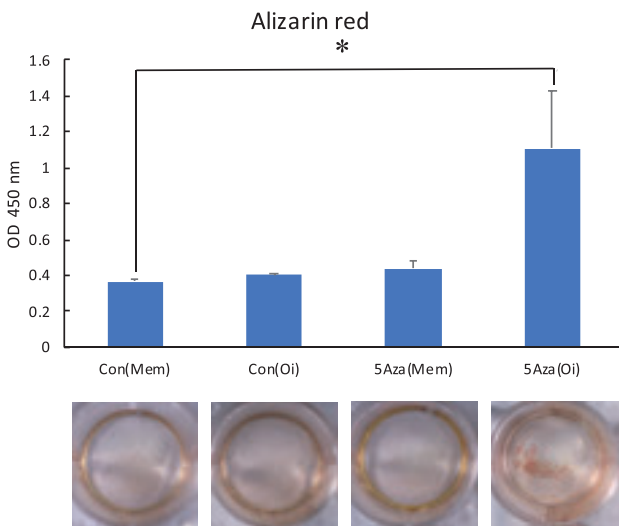


図4 Alizarin red染色による石灰化評価
Alizarin red染色による石灰化程度を評価した結果, wellの全体像では5Aza (Oi)において石灰化結節の出現(赤褐色)を認めた. また, 石灰化結節溶解液による色素溶出後に450 nmの吸光度を測定した結果, Con (Mem) に比べ5Aza (Oi) において石灰化程度の有意な上昇を認めた (* $p < 0.05$; Kruskal-Wallis検定, $n = 3$).

率的に石灰化誘導できるかについて, 間葉系幹細胞を骨分化誘導培地で石灰化誘導する方法を応用し検討した (Yamaguchi et al., 2014). 細胞毒性試験の結果, 5Azaは1.0 μM でブタ歯髄細胞を1週間刺激しても有意な細胞毒性を示さなかったことから至適な濃度・期間と判断し, 石灰化誘導を試みた. その結果, 培地に5Azaを添加することで効率的に石灰化誘導することが可能となっ

表2 Flow cytometry解析の統計分析

		陽性(%)	陰性(%)	合計
Con (Mem)	度数	437 (4.4)	9563 (95.6)	10000
	調整済み残差	-41.9	41.9	
5Aza (Oi)	度数	2547 (25.5)*	7453 (74.5)	10000
	調整済み残差	41.9	-41.9	
合計		2984	17016	20000

図5のFlow cytometry解析を統計分析した結果, Con (Mem) に比べ5Aza (Oi) においてALP・OC共陽性細胞率の有意な上昇を認めた (* $p < 0.05$; χ^2 検定).

表3 ブタ歯髄細胞におけるDNAメチル化解析

		メチル化(%)	非メチル化(%)	合計
Con (Mem)	度数	95	5	100
	調整済み残差	5	-5	
5Aza (Oi)	度数	67*	33	100
	調整済み残差	-5	5	
合計		162	38	200

MSP法の結果, *Msx1*のメチル化率はCon (Mem) で95.1%, 5Aza (Oi) では66.6%となり, Con (Mem) に比べ5Aza (Oi) においてメチル化率の有意な低下を認めた (* $p < 0.05$; χ^2 検定, $n = 3$).

た. また, 1.0 μM 濃度の5Azaによってヒトおよびブタの皮膚線維芽細胞をダイレクトリプログラミング法によってインスリン分泌細胞へ分化誘導させた報告のあることから (Pennarossa et al., 2013; Pennarossa et al., 2014), 1.0 μM 濃度の5Azaはブタの細胞において各目的に応じた使用に効果的であると考えられた. 一方で, Zhangらの報告においてはヒト歯髄細胞を石灰化誘導するのに1.0 μM 濃度の5Azaが効果的であったものの

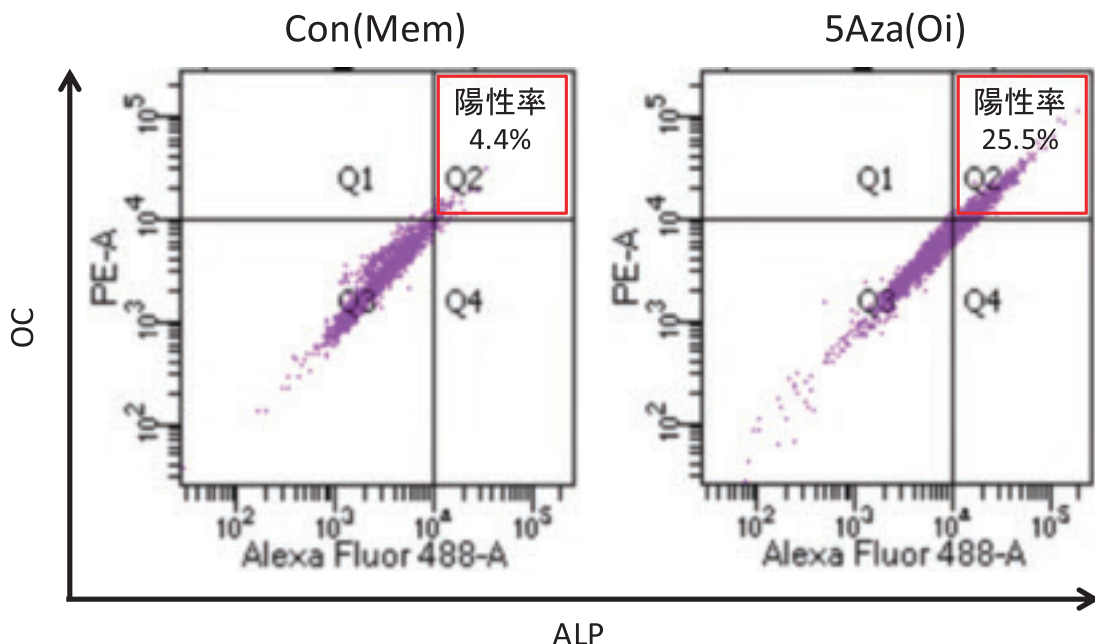


図5 Flow cytometry解析
Flow cytometryによるタンパクレベルでの陽性細胞率を検討した結果, 細胞10,000個のうち, ALP・OC共陽性細胞数(率)はCon (Mem) で437個(4.4%), 5Aza (Oi) では2,547個(25.5%)となった. Q1-Q4はGating区分を示す. Q2をALP・OC共陽性細胞としてGatingを行った. 統計分析結果は表2に示す.

(Zhang et al., 2015), 48時間以上の刺激時間では細胞毒性を示したことが本研究結果との違いである。これはヒトとブタとの動物種の違いによる影響が考えられる。ヒト歯髄細胞では1,25-dihydroxyvitaminD(3)(VitD3)の刺激によって象牙芽細胞への石灰化誘導を促進したのに対し、ブタ歯髄細胞ではVitD3の刺激によって象牙芽細胞への石灰化誘導を抑制したことからも(Tonomura et al., 2007), 動物種の違いによる作用薬の影響について更なる検証が必要であると考えられた。mRNA発現レベルにおいて、歯髄の通常の培養条件であるCon(Mem)に比べ、 α -MEM培地に1.0 μ M 5Azaを添加した5Aza(Mem)や、石灰化誘導培地のCon(Oi)、石灰化誘導培地に1.0 μ M 5Azaを添加した5Aza(Oi)の中で、5Aza(Oi)において有意な発現上昇を認めた。さらに蛋白発現レベルにおいても、Con(Mem)に比べ5Aza(Oi)でのAlizarin red染色による石灰化程度の有意な上昇や、Flow cytometry解析によるALP・OC共陽性細胞率の有意な上昇を認めた。そこで5AzaによるDNAメチル化の影響を確認するためにMSP法を行った結果、*Msx1*のメチル化率はCon(Mem)に比べ5Aza(Oi)において有意な低下を認めた。このことから、5Azaは石灰化関連遺伝子である*Msx-1*の脱メチル化を促進し、*Msx-1*遺伝子発現の上昇を効率的に誘導したことが確認された。5Azaには、脱メチル化作用があり、5Aza単独では特定の遺伝子発現を制御することは難しいものの、目的に沿った特定の条件下で用いることで、目的の遺伝子に特化した発現制御を行うことが可能となるため、遺伝子導入に比べ癌化などの副作用のリスクを抑えることができる(Lim et al., 2011)。本研究で用いた石灰化誘導培地のOsteoblast-Inducer Reagentに含まれているアスコルビン酸や β -グリセロフォスフェート、ヒドロコルチゾン、ラット由来骨前駆細胞やマウス骨芽細胞様細胞、ヒト臍帯間葉系幹細胞の骨分化誘導を促進することから(Bellows et al., 1998; Ramis et al., 2012; Miyamoto et al., 2015), 石灰化誘導培地に5Azaを用いることで、*Msx1*をはじめとした石灰化関連遺伝子の脱メチル化を促進し、石灰化関連遺伝子の発現上昇に特化した誘導が可能になったものと考えられた。

歯科医療分野においては依然として5Azaをはじめとするエピジェネティクス試薬に関する研究データの蓄積が不足しており、今後の歯科再生医療分野での応用可能性について更なる検討が必要であると考えられた。

結 語

ブタ歯髄細胞は、石灰化誘導培養条件下において、

DNMTiの5Azaを用いることでより効率的な石灰化誘導が可能であることが示唆された。

本研究は、平成27年度北海道医療大学歯学会研究奨励金および2017-2018年度北海道医療大学個体差健康科学研究助成金により遂行した。本研究において開示すべき利益相反はない。

文 献

- Bellows CG, Ciaccia A, Heersche JN. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone*. 23 : 119-125, 1998.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines : minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 55 : 611-622, 2009.
- Goto N, Fujimoto K, Fujii S, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Kawamoto T, Noshiro M, Shukunami C, Kozai K, Kato Y. Role of MSX1 in Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016 : 8035759, 2016.
- Grando Mattuella L, Westphalen Bento L, de Figueiredo JA, Nör JE, de Araujo FB & Fossati AC. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod* 33 : 524-530, Review, 2007.
- Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. 26 : 795-797, 2008.
- Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells*. 24 : 2493-2503, 2006.
- Kato K. Stem cells in human normal endometrium and endometrial cancer cells : characterization of side population cells. *Kaohsiung J Med Sci*. 28 : 63-71. Review, 2012.
- Kearney M, Cooper PR, Smith AJ, Duncan HF. Epigenetic Approaches to the Treatment of Dental Pulp Inflammation and Repair : Opportunities and Obstacles. *Front Genet*. 9 : 311. Review, 2018.
- Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 339 : 189-195, Review, 2010.

- Li LC & Dahiya R. MethPrimer : designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18 : 1427–1431, 2002.
- Lim SP, Neilsen P, Kumar R, Abell A, Callen DF. The application of delivery systems for DNA methyltransferase inhibitors. *BioDrugs*. 25 : 227–242. Review, 2011.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods*. 25 : 402–408, 2001.
- Lu L, Katsaros D, de la Longrais IA, Sochirca O & Yu H. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res* 67 : 10117–10122, 2007.
- Luo L, He Y, Wang X, Key B, Lee BH, Li H, Ye Q. Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. *Stem Cells Int*. 2018 : 1731289. Review, 2018.
- Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. 454 : 49–55. 2008.
- Miyamoto S, Miyamoto Y, Shibata Y, Yoshimura K, Izumida E, Suzuki H, Miyazaki T, Maki K, Kamijo R. In situ quasi-static and dynamic nanoindentation tests on calcified nodules formed by osteoblasts : Implication of glucocorticoids responsible for osteoblast calcification. *Acta Biomater*. 12 : 216–226. 2015.
- Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells : a Literature Review. *Stem Cell Rev*. 12 : 511–523, Review, 2016.
- Pennarossa G, Maffei S, Campagnol M, Tarantini L, Gandolfi F, Brevini TA. Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110 : 8948–8953, 2013.
- Pennarossa G, Maffei S, Campagnol M, Rahman MM, Brevini TA, Gandolfi F. Reprogramming of pig dermal fibroblast into insulin secreting cells by a brief exposure to 5-aza-cytidine. *Stem Cell Rev*. 10 : 31–43, 2014.
- Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells : Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 7 : 839–851. Review, 2015.
- Ramis JM, Rubert M, Vondrasek J, Gayà A, Lyngstadaas SP, Monjo M. Effect of enamel matrix derivative and of proline-rich synthetic peptides on the differentiation of human mesenchymal stem cells toward the osteogenic lineage. *Tissue Eng Part A*. 18 : 1253–1263. 2012.
- Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, Iida K, Kunisada T, Shibata T, Yamanaka S, Tezuka K. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res*. 89 : 773–778. 2010.
- Tomomura A, Sumita Y, Ando Y, Iejima D, Kagami H, Honda MJ, Ueda M. Differential inducibility of human and porcine dental pulp-derived cells into odontoblasts. *Connect Tissue Res*. 48 : 229–238, 2007.
- Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnol*. 14 : 105, 2014.
- Zhang D, Li Q, Rao L, Yi B, Xu Q. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*. 41 : 640–645, 2015.



吉田 光希

平成18年 3月 北海道医療大学歯学部卒業
 平成19年 3月 北海道医療大学病院 歯科医師臨床研修修了
 平成21年 4月 北海道医療大学大学院歯学研究科入学
 平成25年 3月 同 修了
 平成25年 4月 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野助教就任
 現在に至る