

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11356

研究課題名(和文) 歯根膜線維芽細胞の形質発現におけるエピジェネティック制御の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the epigenetically regulation of the phenotype of the periodontal ligament fibroblast

研究代表者

中村 芳樹 (Yoshiki, Nakamura)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：10097321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 歯根膜組織、歯肉組織のエピゲノム解析を遂行した。ヒストンH3k9me1、H3k9me2に違いがみられ歯根膜線維芽細胞で強いモノメチル修飾が観察された。メチル化酵素発現については遺伝子レベル、タンパク質レベルともにGlpとG9a発現に差を認め、どちらも歯肉に比較して歯根膜で高い発現が観察された。

ヒト歯肉、歯根膜線維芽細胞セルラインを用いたin vitroでの比較解析でも歯肉線維芽細胞に比較して歯根膜線維芽細胞でGlpとG9aの高い発現を確認した。遺伝子発現マイクロアレイ解析で発現が大きく異なる遺伝子のうち転写因子に着目して10遺伝子まで絞り込みを行った。

研究成果の概要(英文)： Epigenetical regulation of the phenotype of the periodontal ligament fibroblast was examined and compared with that of the gingival fibroblast using experimental rats. There are differences in the expression of monomethylated Histone H3K9 and dimethylated Histone H3K9, and PDL fibroblast exhibited intense expression of monomethylated Histone H3K9. Among known methyltransferases, Glp and G9a were shown difference in the expression between gingival and PDL fibroblasts. PDL fibroblasts expressed more intense Glp and G9a expression.

These data obtained by animal experiments were confirmed in the cell culture experiments using human gingival and PDL fibroblast cell lines. Then we compared gene expression using microarray, and narrowed down the candidate genes to 10, including transcription factors.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯根膜 エピジェネティクス G9a 歯肉 Glp

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は形態学的に結合組織として分類され、その歯根膜の主要な細胞である歯根膜線維芽細胞は紡錘形をした細胞として形態学的に線維芽細胞として分類されている。しかし、歯根膜線維芽細胞は通常の結合組織、例えば皮下や歯肉下の結合組織の線維芽細胞と異なる性質を有している。歯根膜線維芽細胞は多くの研究において骨芽細胞やセメント芽細胞の供給源、あるいは両細胞に分化すること(multipotency)が報告されている。また、矯正的な歯の移動における組織変化では、歯根膜の線維芽細胞が歯根膜の修復(歯根膜線維の吸収と形成)ばかりでなく、骨芽細胞やセメント芽細胞に分化し歯槽骨やセメント質の形成に関与するという報告がある(Takayanagi *et al.* Nature 408, 2000, Yoshiki *et al.* Biotech Histochem 75, 2000)。

研究代表者は、これまで歯を移動した際の歯根膜の組織変化についての組織学的・免疫組織化学的研究や分子生物学的研究等から、歯根膜線維芽細胞が通常の皮下や歯肉下の結合組織の線維芽細胞とは異なり、骨芽細胞と同様の alkaline phosphatase 活性を有し(Nakamura *et al.* Histochem Cell Biol 121, 2004)、石灰化誘導培養では石灰化物を産生すること、TGF- β (Oikawa *et al.* European J Orthod, 33, 2010)、Periostin, CTGF (Choi *et al.* J Periodontal Res. 46, 2011)などを含めて多くの遺伝子の発現が異なること、さらには iPS 細胞樹立時にヒト歯根膜線維芽細胞が cell source としても非常に高い樹立効率を示すことなどを明らかにし(Nomura *et al.* Histochem Cell Biol 137, 2012)、前述したように歯根膜線維芽細胞が他の線維芽細胞とは異なり高い multipotency を有していることを報告してきた。

最近、エピジェネティクスが細胞や組織の発生・分化・リプログラミングなどにおいて、あるいはさまざまな生命現象に関与することが明らかになってきた。エピジェネティクスは DNA 配列によらない遺伝情報の発現制御であり、体細胞ではその状態が伝承される。また、成体では組織幹細胞や細胞分化の制御のために必須の機構である。このエピジェネティクスはヒストン化学修飾、DNA メチル化修飾、ポリコーム群タンパク質、クロマチンリモデリング因子によって担われ、ゲノムインプリンティング、X 染色体不活性化、組織特異的な遺伝子発現に関与するといわれている。

研究代表者らは過去数年にわたり、歯と歯周組織の発生・分化過程における形質発現制御についてエピジェネティクスという観点から研究し、歯根膜の発生原器である歯小嚢含めた形質発現にエピジェネティクスな制御、とりわけヒストン(H3)リジン(K9)のメチル化(ヒストンの化学修飾)に関連する

酵素群について RT-PCR、in situ hybridization、免疫組織化学、western blot 法を用いて検討し、これら組織の発生・分化過程における形質発現制御に H3K9 のメチル化が重要であることを報告してきた(2014年日本骨代謝学会優秀ポスター演題賞受賞、Histochem Cell Biol 143, 2014)。

以上を考慮すると、この歯根膜線維芽細胞での他の線維芽細胞との異なる形質発現はエピジェネティクスな制御、特に H3K9 のメチル化の影響を受けているものと考えられる。

2. 研究の目的

歯根膜線維芽細胞は他の結合組織の線維芽細胞と比較してその遺伝子情報としての表現型(phenotype)である形質発現が異なることが明らかになっている。しかしながら、この形質発現の違いのメカニズムについては全く明らかにされていない。

本研究では、歯根膜線維芽細胞と通常の線維芽細胞(歯肉線維芽細胞)についてエピジェネティクスという観点から H3K9 のメチル化酵素群に焦点をあて、歯根膜線維芽細胞と歯肉線維芽細胞との違いを明らかにする。H3K9 は、転写制御の働きをしていることが分かっているが、具体的には両細胞の H3K9 methyltransferase 群の G9a, Glp, Suv39h1, Prdm2 についてその発現局在について免疫組織化学的、in situ hybridization、real time-PCR、ならびに Western blot 法にて検討し、H3K9 メチル化修飾酵素を介したヒストンリジン残基のメチル化が歯根膜線維芽細胞の形質発現にいかなる役割を果たしているかを解明する。

歯根膜線維芽細胞もその他の結合組織の線維芽細胞も間葉系細胞から分化すると考えられているが、上述したように両者は異なる酵素活性や遺伝子発現を示すという所見は多くみられる。そして、この歯根膜線維芽細胞は骨芽細胞やセメント芽細胞に分化する能力を持っており、multipotent な細胞であることを示す所見も多く報告されている(Zhou *et al.* J Periodontal 79, 2008)。しかしながら、この歯根膜線維芽細胞の特徴を決定付ける因子等の報告はなく、形態学的所見のような状況証拠的所見に基づいているのが現状である。

本研究では、この歯根膜線維芽細胞の形質発現について、これまで行われている DNA 配列による遺伝情報やシグナリングだけではなく、エピジェネティクスという観点から、直接的な分化の過程を明らかにするものであり、非常に独創性の高いものである。この結果が歯根膜線維芽細胞の形質発現の解明に貴重な貢献をするものと確信している。さらに、この研究が歯根膜組織の解明とともに、他細胞からの歯根膜組織の再生研究にも新機軸を開くものと確信している。

3. 研究の方法

本研究ではヒストン (H3) リジン (K9) methyltransferases (H3K9MT) 発現をラット臼歯部歯根膜と歯肉で検討し、その結果を培養歯肉線維芽細胞に適用し、検討するという *in vivo* と *in vitro* 研究より構成される。

【解析項目】

(1) ラット臼歯部歯根膜と歯肉における H3K9MT 群の G9a, Glp, Setdb1, PRDM2 (RIZ1) の発現局在、ならびに H3K9 メチル化(モノメチル化: me1, ジメチル化: me2, トリメチル化: me3)の分布について免疫組織化学的に観察し、酵素の存在とメチル化の分布について検討する。

(2) 歯根膜と歯肉での Real time-定量 PCR 法と Western blot 法を用いて、その H3K9 のメチル化修飾レベルについて検討し、歯根膜線維芽細胞に特有の H3K9MT を特定する。

(3) 培養歯肉線維芽細胞を用いて歯根膜線維芽細胞に特有の H3K9MT、あるいはその遺伝子を導入しそれらの細胞内動態と歯根膜線維芽細胞特有の遺伝子発現を検索する。

(4) 上記ヒストンメチル化修飾で発現制御を受ける遺伝子の同定以上より、歯根膜線維芽細胞の形質発現制御のメカニズムを解明する。

【具体的な研究方法】

(1) H3K9MT 群酵素と H3K9 メチル化 (H3K9me1, 2, 3) の局在と分布について検討
10 週齢ラットを 4%パラフォルムアルデヒドで固定

歯肉を含む上顎第一臼歯部を採取

EDTA 脱灰 (3 週間)、エタノール・キシレンによる脱水、パラフィン包埋、5 μm 厚の連続切片作製

形態観察: H-E 染色

免疫組織化学的観察: H3K9MT の抗体ならびに H3K9me1, 2, 3 の抗体
以上より、歯根膜と歯肉における局在を検討する。

(2) H3K9MT 群酵素の Real time-定量 PCR 法による解析

Real time-定量 PCR 法

ラット上顎部の凍結固定

上顎第一臼歯の凍結切片を作成

Laser capture microdissection (LCM) による歯肉・歯根膜と歯根膜の採取

RNA の精製、増幅

cDNA の精製

real-time PCR 測定: G9a, Glp, Setdb1, PRDM2 について測定 (Primer sequence は Ideno *et al.* Gene Expr patterns 13, 2013 に準拠)

(3) H3K9MT 群酵素の Western blot 法による解析

ラット上顎部の凍結固定

上顎第一臼歯の凍結切片を作成

Laser capture microdissection による歯肉下結合組織と歯根膜の採取

ヒストンの精製アクリルアミドゲル (SDS

に抜き) による SDS-PAGE

至適ヒストン量の検定

これら遺伝子・タンパクレベルの解析を行い得られた結果を精査し、歯根膜線維芽細胞の形質発現に關与する候補遺伝子について、その遺伝子あるいはタンパクを歯肉線維芽細胞に導入し、それらの細胞内動態と歯根膜線維芽細胞特有の遺伝子発現について検討する。

4. 研究成果

(1) ヒストンメチル化修飾について

ヒストンメチル化修飾には H3k9me1 (モノメチル化)、H3k9me2 (ジメチル化) と H3k9me3 (トリメチル化) があり、その 3 種について検討した。

H3k9me1 は歯根膜線維芽細胞、骨膜骨芽細胞にその局在が観察されたが、歯肉線維芽細胞にはほとんど認められなかった。

H3k9me2 はやはり H3k9me1 と同じく歯根膜線維芽細胞、骨膜骨芽細胞にその局在が観察された。しかし歯肉線維芽細胞にはほとんど認められなかった。

H3k9me3 は歯根膜線維芽細胞、骨膜骨芽細胞ならびに歯肉線維芽細胞にわたって観察された。

以上から、免疫組織学的観察では、歯根膜線維芽細胞、骨膜骨芽細胞ならびに歯肉線維芽細胞では H3k9me1、H3k9me2 酵素の局在に違いがみられ、両者の細胞のエピジェネティックな違いがあることが明らかとなった。

(2) メチル化修飾酵素発現について

H3K9 のメチル化に關与するといわれている酵素、G9a, Glp, Suv39h1, Suv39h2, Prdm2, Setdb1 についてその遺伝子発現を real-time RT-PCR にて検討した。まず最初に、ラット第一臼歯の歯周組織を含む凍結連続切片をスーパーハードナイフを使用して作製し、その凍結切片からレーザーキャプチャーマイクロダイゼクション法を用いて歯根膜と歯肉の結合組織の採取した。そして、それらの資料を用いて G9a, Glp, Suv39h1, Suv39h2, Prdm2, Setdb1 の遺伝子を RT-PCR の結果、Glp と G9a に発現を認めた。両者の発現の強度は Glp の方が G9a よりも強発現しているものと考えられた。一方、その他の酵素の遺伝子発現については認められなかった。

次に Glp と G9a について、その歯周組織内での発現局在について、免疫組織学的に検討した。すなわち、上述した凍結切片を用いて、歯根膜と歯肉結合組織における Glp と G9a の局在を調べた。その結果、昨年の H3K9 のメチル化の発現と同様に、Glp と G9a とともに骨芽細胞と血管内皮細胞にその強い発現が認められた。そこで Glp と G9a の免疫染色の定量化を試みたところ、Glp では歯肉よりも歯根膜で有意に強い染色性が認められた。G9a も歯根膜で歯肉よりも強い染色傾向を示した。

以上から、歯根膜での H3K9 のメチル化に

はGlpとG9aが関与していることが示唆された。

(3) *in vitro* 解析

ヒト歯肉、歯根膜線維芽細胞セルラインを用いて *in vitro* での比較解析を行うこととし、ラットで得られたデータの再現性があるかを確認した。

ヒト歯肉に比較して歯根膜線維芽細胞でGlpとG9aの高い発現を確認した。

歯肉セルラインと歯根膜線維芽細胞セルラインの遺伝子発現マイクロアレイ解析から、発現が大きく異なる遺伝子のうち転写因子に着目して10遺伝子まで絞り込みを行った。

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)

[雑誌論文](計18件)

Fukaya S, Kanzaki H, Miyamoto Y, Yamaguchi Y, Nakamura Y. 2017. **Possible alternative treatment for mandibular asymmetry by local unilateral igf-1 injection into the mandibular condylar cavity: Experimental study in mice.** American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics. 152(6):820-829. 査読有 DOI:10.1016/j.ajodo.2017.05.023

Kanzaki H, Shinohara F, Itohiya K, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Matsuzawa M, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y. 2017. **Rank1 induces bach1 nuclear import and attenuates nrf2-mediated antioxidant enzymes, thereby augmenting intracellular reactive oxygen species signaling and osteoclastogenesis in mice.** The FASEB Journal. 31(2):781-792. 査読有 DOI: 10.1096/fj.201600826R

Miyamoto Y, Kanzaki H, Wada S, Tsuruoka S, Itohiya K, Kumagai K, Hamada Y, Nakamura Y. 2017. **Asporin stably expressed in the surface layer of mandibular condylar cartilage and augmented in the deeper layer with age.** Bone reports. 7:41-50. 査読有 DOI:10.1016/j.bonr.2017.07.002

Narimiya T, Wada S, Kanzaki H, Ishikawa M, Tsuge A, Yamaguchi Y, Nakamura Y. 2017. **Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type iv collagen degradation by matrix metalloproteinase -12.** Journal of periodontal research. 52(5):842-852. 査読有 DOI:10.1111/jre.12453

Wada S, Kanzaki H, Narimiya T, Nakamura Y. 2017. **Novel device for application of**

continuous mechanical tensile strain to mammalian cells. Biology Open. 6(4): 518-524. 査読有 DOI:10.1242/bio.023671

Yamaguchi Y, Kanzaki H, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Narimiya T, Wada S, Nakamura Y. 2018. **Dimethyl fumarate inhibits osteoclasts via attenuation of reactive oxygen species signalling by augmented antioxidation.** J Cell Mol Med. 22(2):1138-1147. 査読有 DOI: 10.1111/jcmm.13367

Itohiya K, Kanzaki H, Ishikawa M, Wada S, Miyamoto Y, Narimiya T, Nakamura Y. 2016. **Occlusal hypofunction mediates alveolar bone apposition via relative augmentation of TGF- signaling by decreased Asporin production in rats.** Dental, Oral and Craniofacial Research (3) 査読有 DOI:10.15761/DOCR.1000192

[学会発表](計15件)

勝又裕太、菅崎弘幸、本田義知、田中知成、山口祐希、中村芳樹 **EGCG徐放ゼラチン単回局所投与による矯正学的歯の移動の抑制** 第76回日本矯正歯科学会学術大会 2017年

成宮毅、和田悟史、菅崎弘幸、中村芳樹 **特異的MMP12阻害は、矯正学的歯の移動時の牽引側歯根膜組織における血管新生を抑制する** 第76回日本矯正歯科学会学術大会 2017年

山口祐希、菅崎弘幸、宮本豊、糸日谷佳菜子、深谷紗吏、勝又裕太、中村芳樹 **成長期マウスへの食餌mio-inositol栄養強化は下顎頭軟骨に高発現しているPik3CDを介して下顎頭軟骨特異的に成長を促進する** 第76回東京矯正歯科学会学術大会 2017年

糸日谷佳菜子、菅崎弘幸、石川美佐緒、下田信治、中村芳樹 **Asporinは咬合機能低下に伴う新生歯槽骨添加を制御する** 第58回歯科基礎医学会学術大会 2016年

成宮毅、和田悟史、菅崎弘幸、中村芳樹 **MMP12は矯正学的歯の移動時の牽引側歯根膜組織における血管網再構築に重要な役割をはたしている** 第75回日本矯正歯科学会大会 2016年

糸日谷佳菜子、菅崎弘幸、石川美佐緒、下田信治、中村芳樹 **Asporinは咬合機能低下に伴う新生歯槽骨添加における制御因子である** 第75回日本矯正歯科学会大会 2016年

深谷紗吏、菅崎弘幸、宮本豊、山口祐希、
中村芳樹 IGF-1 の顎関節局所投与による下
顎骨非対称に対する治療の可能性 第74回
日本矯正歯科学会大会 2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 芳樹 (NAKAMURA, Yoshiki)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：10097321

(2) 研究分担者

野田 晃司 (NODA, Koji)
鶴見大学・歯学部・臨床教授
研究者番号：10148059

新井 千博 (ARAI, Chihiro)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：10460221

和田 悟史 (WADA, Satoshi)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：20581119

菅崎 弘幸 (KANZAKI, Hiroyuki)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号：30333826

石川 美佐緒 (ISHIKAWA, Misao)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：90582445

高野 吉郎 (TAKANO, Yoshiro)
鶴見大学・歯学部・臨床教授
研究者番号：90126425