

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11780

研究課題名(和文) エピジェネティック機構の破綻が顎顔面発生過程に与える影響

研究課題名(英文) Influence of epigenetic regulation breakdown on maxillofacial development

研究代表者

東堀 紀尚 (Higashihori, Norihisa)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50585221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、エピジェネティクス機構を司るヒストンメチル化酵素の一つであるESETの顎顔面発生過程への影響を調べるため、顔の大部分の元となる神経堤細胞に対し特異的にESETが全く働かないマウス(以下ESET CKO)を作製した。ESET CKOは、口蓋、歯胚、メッケル軟骨、前頭骨の形成に異常を認めた。本研究期間において、我々はメッケル軟骨におけるESETの役割を詳細に検討した。ESET CKOのメッケル軟骨は、肥大化し、増殖能の増加およびBMPシグナルの増加が要因となっている可能性が示唆された。本研究より、ESETによるエピジェネティクス機構がメッケル軟骨の発生に必須であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面領域の先天奇形は、硬軟組織の形態・機能の異常だけではなく、心理社会的障害を惹起する可能性があり、その発症メカニズムを解明する事は、疾患の予防や創薬への道筋となり、患者に与える成果は多大である。昨今より、環境因子によるエピジェネティックな変化が多因子疾患の発症と強く関係しているとの報告がある。一方、顎顔面領域におけるエピジェネティック制御機構についての研究は殆ど無いのが現状である。本研究は、エピジェネティックな変化を修飾する酵素ESETの役割に着目し、特にメッケル軟骨での働きを詳細に解明した。これらの結果は、先天異常の発症原因の解明、予防法の開発等の臨床応用への基盤となる研究となる。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the influence of ESET, which is one of the histone methylation enzymes responsible for the epigenetic mechanism, on the maxillofacial development process, we used mice harboring ESET specifically knockdown for neural crest cells (hereinafter referred to as ESET CKO) for this study. ESET CKO showed abnormal formation of palate, tooth germ, Meckel's cartilage, and frontal bone. We examined in detail the role of ESET in Meckel's cartilage. It has been suggested that Meckel's cartilage of ESET CKO is hypertrophic and may be due to increased proliferative capacity and increased BMP signaling which is known as a key signaling for chondrogenesis. From this study, it was shown that the epigenetic mechanism regulated by ESET is essential for the development of Meckel's cartilage.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：エピジェネティクス 顎顔面奇形 メッケル軟骨 ヒストンメチル化酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天異常患者の約7割に顎顔面領域に異常が生じていると言われている。我が国では、先天性疾患に起因した咬合異常に対する歯科矯正治療の保険診療適応が拡大し、歯科医療分野の社会的ニーズが増加してきている。一方、先天性疾患の要因には、単一遺伝子、染色体異常等の病因が解明されているものから、非症候群性の口唇裂・口蓋裂に代表される遺伝要因と環境要因との相互作用によって発症する多因子疾患のように、いまだに発症要因が解明されていないものも多いのが現状である。したがって個々の疾患の病因・病態の解明が歯学において解決すべき重要課題となっている。

近年、がん化や代謝性疾患が、環境因子によるエピゲノム変化によって疾患が引き起こされているという報告が多数されている。すなわち、環境因子によって細胞のエピゲノム情報が修飾され、本来起きることのない形質変化により、疾患が発症することがわかってきた。また、発生というダイナミックな形質変化が生じる生命現象では、複雑なネットワークによるエピジェネティックな変化により、同一ゲノムをもつ細胞が分化にしたがい組織特異的な遺伝子発現のパターンを生じさせ、それぞれがアイデンティティーを持った個体を形成する。すなわち、発生段階ではエピジェネティックな変化が頻繁に起きていると考えられ、より一層環境因子の暴露による影響を受けやすく、異常なエピジェネティックな変化により先天性疾患が発症しやすくなると考えられる。

エピジェネティックな変化には、DNAのメチル化同様、ヒストンの修飾が大きな役割を担っており、その仕組みは真核生物で高度に保存されている。ヒストン修飾には、アセチル化、メチル化、リン酸化などがあり、多岐に渡る修飾の組み合わせにより遺伝子発現の on/off だけでなく、その時間幅、強度といった微細な調整がなされ細胞の多様性を生み出している。中でもヒストンメチル化修飾は、ヒストン3蛋白のリジン基をメチル化することによって遺伝子発現を制御し、修飾を行う酵素には、ヒストンメチル化酵素もしくはヒストン脱メチル化酵素がある。近年、ヒストン修飾酵素の異常により先天性疾患が発症する報告がされており(表1)、発生時におけるヒストン修飾が重要な役割を担っており、生体内でのヒストン修飾酵素の機能を解析することは新たな疾患の仕組みの解明につながると考えられる。また、我々は環境因子であるレチノイン酸の過剰投与による口蓋裂発症に、ヒストンメチル化酵素 WHSC1 の減少が関与している可能性を示したことよりも³、ヒストン修飾酵素・環境因子と疾患との関連が強く示唆される。

我々は、ヒストンメチル化酵素 ESET に着目し、その顎顔面領域における役割を解明することにより、先天異常の発症原因の解明、予防法の開発等の臨床応用への基盤となる研究を行うことを目的に研究を行っている。

2. 研究の目的

我々は、エピジェネティクス機構を司るヒストンメチル化酵素の一つである ESET の顎顔面発生過程への影響を調べるため、神経堤細胞特異的にノックダウンさせたマウスを作製したところ、口蓋、歯胚、メッセル軟骨、前頭骨の形成に異常を認めた。そこで、本研究は ESET の役割を解明することにより先天異常の発症原因の解明、予防法の開発等の臨床応用への基盤となる研究を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

神経堤細胞におけるヒストン修飾酵素 ESET の役割を解明するため、Cre-LoxP システムを用い、神経堤細胞のみ ESET がノックアウトされるマウス(*ESET* CKO)を用いた実験をベースに in vivo, in vitro 両面から研究を行った。

- (1) メッセル軟骨の時空間での形態的特徴を把握するために、各ステージの前頭断切片を作成し、染色を行った。
- (2) メッセル軟骨における増殖能を検討するため、胎児を採取する2時間前に BrdU を投与し、その取り込みを蛍光免疫染色法にて陽性細胞数を計測し、定量的に野生型と比較した。また、軟骨芽細胞 ATDC5 の *ESET* を siRNA にてノックダウンさせ、同様に増殖能を検討した。

- (3) 軟骨芽細胞 ATDC5 の *ESET* を siRNA にてノックダウンさせ、軟骨分化マーカーの遺伝子および BMP シグナルに關与する遺伝子の発現様相を定量的 RT-PCR 法を用い、検討した。
- (4) 抗リン酸化 SMAD1/5/8 抗体を用いた蛍光免疫染色法により、BMP シグナリングの強度を組織切片上で比較した。また siRNA にて *ESET* をノックダウンさせた ATDC5 においても、同様に比較、検討した。

4. 研究成果

胎生 18.5 日の *ESET* CKO は、顎顔面領域の低形成を認め、特に下顎の低形成が顕著であった。胎生 13.5 日から 18.5 日の胎児顎顔面部の前頭断を觀察すると、メッセル軟骨は発生過程の進行に伴い消失していくが、*ESET* CKO では全ステージで対照群と比較し増大していた。また、胎生 16.5 日と胎生 18.5 日では一部の軟骨膜が消失し、さらに胎生 18.5 日では、アリザリンレッド陽性の領域がメッセル軟骨内の一部に認められた。また、胎生 18.5 日の *ESET* CKO のメッセル軟骨の軟骨細胞は、対照群と

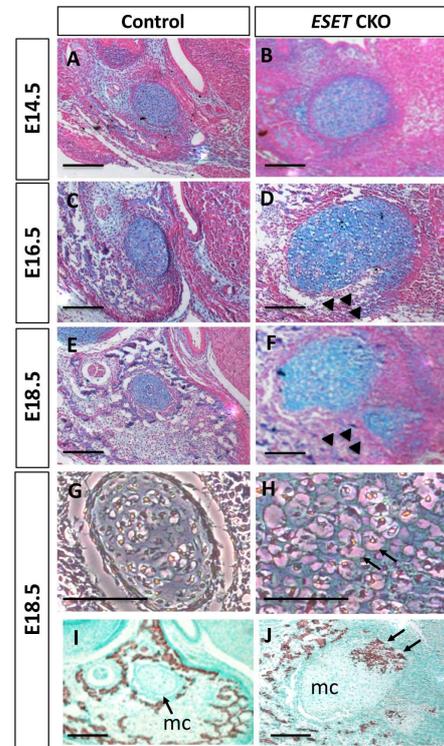


図1 .ESET CKO のメッセル軟骨の肥大化

比較し増大していた (図 1)。

メッセル軟骨の肥大化に軟骨細胞の増殖が關与しているのではないかと考え、細胞増殖時に取り込まれる BrdU 量を觀測することにより増殖能の検討を行った。*ESET* CKO のメッセル軟骨では野生型と比較し、

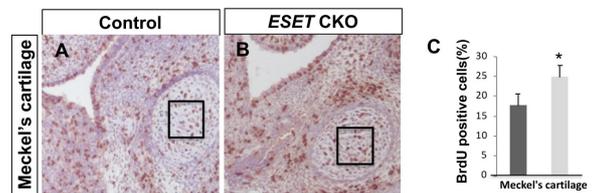


図2 .ESET CKO のメッセル軟骨における細胞増殖能の亢進

BrdU 陽性細胞数の割合は増加していた (図 2)。この結果は、*ESET* をノックダウンさせた ATDC5 においても同様に認められた。以上より、*ESET* CKO のメッセル軟骨の肥大化の一要因として軟骨細胞の増殖能の亢進が示唆された。

続いて *ESET* が軟骨細胞の分化に与える影響を検討した。*ESET* をノックダウンさせた ATDC5 は RNA レベルで、軟骨分化マーカーである *Sox9*、*Collagen II*、*Aggrecan*、*Mmp13* が有意に減少し、軟骨を未分化な状態に維持させる機能を持つ *Axin2* が有意に上昇していた。*ESET* の機能低下により、軟骨分化が抑制されたことによりメッセル軟骨の増大に影響を与える可能性が示唆された。

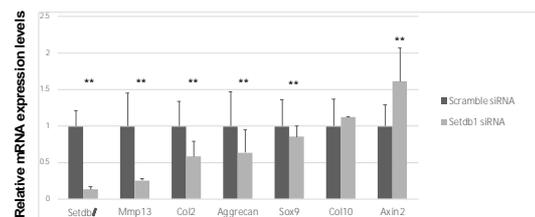


図3 . ESET の機能低下による軟骨分化の抑制

次に軟骨形成において重要な役割を果たす BMP シグナルに対する影響を調べた。BMP シグナルのマーカーであるリン酸化 SMAD1/5/8 を認識する抗体にて免疫染色を行ったところ、対照群のメッセル軟骨内では軟骨膜付近の軟骨細胞において、リン酸化 SMAD1/5/8 陽性細胞が認められなかった。一方、*ESET* CKO ではメッセル軟骨内全域でリン酸化 SMAD1/5/8 陽性細胞が認められ、陽性細胞数は対照群より有意に増加した。*ESET* をノックダウンさせた ATDC5 でも同様に、リン酸化

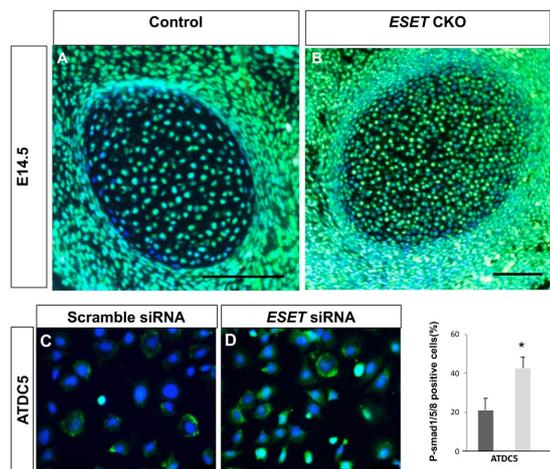


図4 . ESET の機能低下による BMP シグナルの増強

SMAD1/5/8 陽性細胞が認められ、陽性細胞数は対照群より有意に増加した。*ESET* をノックダウンさせた ATDC5 でも同様に、リン酸化

SMAD1/5/8 陽性細胞は有意に増加した。また ESET をノックダウンさせた ATDC5 では、*Bmp4*、*Bmpr1*、*Bmpr2* は有意に増加し、BMP のアンタゴニストである *Noggin* は有意に減少した。以上のことより、ESET の機能低下により、SMAD 依存性の BMP シグナルが活性化されることで、メッケル軟骨の肥大化に影響を与える可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Higashihori N, Lehnertz B, Sampaio A, Underhill TM, Rossi F, Richman JM. Methyltransferase G9A Regulates Osteogenesis via Twist Gene Repression. *Journal of Dental Research*. 96(10):1136-1144, 2017. DOI: 10.1177/0022034517716438. 査読有
Yahiro K, Higashihori N, Moriyama K. Setdb1 is indispensable for Meckel 's cartilage development. *Biochem Biophys Res Commun*. 482(4):883-888, 2017. 10.1016/j.bbrc.2016.11.128. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

八尋浩平, 東堀紀尚, 森山啓司. メッケル軟骨の発生過程に及ぼすヒストンメチル化酵素 Setdb1 の影響と BMP シグナルの関与. 第 76 回日本矯正歯科学会学術大会. 2017 年 10 月 18-20 日. 札幌. 学術大会優秀発表賞

八尋浩平, 東堀紀尚, 森山啓司. 顎顔面発生過程におけるヒストンメチル化酵素 Setdb1 の役割. 第 75 回日本矯正歯科学会学術大会. 2016 年 11 月 7-9 日. 徳島.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 起穂

ローマ字氏名：Kobayashi, Yukiho

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：医歯学総合研究科 顎顔面矯正学分野

職名：助教

研究者番号(8桁)：20596233

研究分担者氏名：渡辺 千穂

ローマ字氏名：Kadota, Chiho

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：医歯学総合研究科 顎顔面矯正学分野

職名：特任助教

研究者番号(8桁)：30736658

(2)研究協力者

研究協力者氏名：八尋 浩平

ローマ字氏名：Yahiro, Kouhei

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。