

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18774

研究課題名（和文）ヒストンメチル基転移酵素EZH2は牽引力による歯根膜の骨芽細胞分化を制御するか

研究課題名（英文）Does histone methyltransferase EZH2 regulate tensile force-induced osteoblast differentiation of the periodontal ligament cell?

研究代表者

伊藤 新 (Arata, Ito)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10805914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、牽引力が負荷されたマウス骨芽細胞様細胞株およびヒト歯根膜細胞において、EZH2と関連転写因子によるエピジェネティクス制御がOsx遺伝子発現を抑制するか否かを解析し、さらに生体における矯正歯科的歯の移動牽引側において、そのエピジェネティクス制御による歯根膜細胞から骨芽細胞への分化抑制による歯根膜の恒常性維持を解明することである。本研究では分化前の未成熟な骨芽細胞において、牽引力を負荷した際に骨芽細胞分化に必要なマスター調節遺伝子の発現を調整するエピジェネティック変化を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティクスは様々な細胞プロセスを制御するが、すべての細胞種においてその機能はほとんど不明である。また、機械的刺激がエピジェネティクスに及ぼす影響について、血管系細胞に関する報告があるのみである。本研究により、牽引力が負荷された際のエピジェネティクス制御が明らかとなることで、他の細胞種における機械的刺激がエピジェネティックに及ぼす作用の解明へと発展し得る。骨芽細胞分化を制御する転写因子とヒストン修飾酵素によるエピジェネティクス制御が牽引側での骨形成と歯根膜恒常性維持へ及ぼす影響を解析することで矯正歯科治療での歯の移動における牽引側歯根膜の新規恒常性維持メカニズムが解明される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to analyze whether epigenetic regulation by EZH2 and related transcription factor suppresses Osx gene expression in MC3T3-E1 or human periodontal ligament cells subjected to traction force, and to elucidate whether the epigenetic regulation suppresses differentiation of periodontal ligament cells to osteoblasts on the traction side of orthodontic tooth movement in vivo, thereby maintaining periodontal ligament homeostasis. This study was conducted to elucidate the maintenance of periodontal ligament homeostasis by suppressing differentiation of periodontal ligament cells into osteoblasts on the traction side of orthodontic tooth movement. In this study, we analyzed the epigenetic changes that regulate the expression of master regulatory genes required for osteoblast differentiation in immature osteoblasts before differentiation under traction force.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯と歯周組織を結合する線維性組織で、咬合力や矯正歯科治療における矯正力など、歯に負荷される機械的刺激を受容する。歯根膜は歯根と歯槽骨の間わずか 0.2 mm の間隙に存在し、また骨形成能を持つものの、生理的条件下および矯正歯科的歯の移動の際、骨に置換されることなく線維性組織としての恒常性を維持する。矯正歯科治療において、牽引側歯周組織では骨形成が亢進する。申請者が所属するグループは、マウスを用いた矯正歯科的歯の移動モデル牽引側の歯根膜全体的に、骨芽細胞分化のマスター転写因子 Runx2 の発現が亢進することを示した。しかし、牽引側における骨芽細胞マーカー osteocalcin の発現は、歯根膜と歯槽骨の境界のみに認められ、Runx2 の発現領域とはごく一部で一致するのみであった。これらの結果から、牽引力により歯根膜における骨芽細胞分化活性は上昇する一方、骨芽細胞分化を抑制する分子制御が同時に働き、歯根膜の恒常性を維持するとともに、骨芽細胞が発現する領域を局限すると考えられる。しかし、歯根膜における骨芽細胞分化の抑制的分子制御機構の全容は明らかではない。

エピジェネティクスは、DNA のメチル化とヒストン修飾を介したクロマチン構造のリモデリングによる転写調節機構である。Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) は、ヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチル化 (H3K27me3) を行うヒストンメチル基転移酵素であり、骨芽細胞分化を抑制することが報告されているが、EZH2 による骨芽細胞分化抑制におけるエピジェネティクス制御機構の詳細は不明である。牽引力が負荷された前駆骨芽細胞において、EZH2 と、当科で明らかにした EZH2 とタンパク質複合体を形成していると考えられる転写因子により、Osx 遺伝子発現のエピジェネティクス制御が、骨芽細胞分化抑制の新規制御機構であると仮説を立て研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、牽引力が負荷されたマウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) において、EZH2 と関連転写因子によるエピジェネティクス制御が Osx 遺伝子発現を抑制するか否かを解析し、さらに生体における矯正歯科的歯の移動牽引側において、そのエピジェネティクス制御による歯根膜細胞から骨芽細胞への分化抑制による歯根膜の恒常性維持を解明することである。

エピジェネティクスは様々な細胞プロセスを制御するが、歯根膜における機能はほとんど不明である。また、機械的刺激がエピジェネティクスに及ぼす影響について、血管系細胞に関する報告があるのみである。本研究により、牽引力が負荷された骨芽細胞における EZH2 と関連転写因子によるエピジェネティクス制御が初めて明らかとなる。それらの知見は、将来、他の細胞種における機械的刺激がエピジェネティックに及ぼす作用の解明へと発展し得る。成長期に歯の萌出が停止し、重度の開咬を呈する患者がいる。これは、歯根膜の恒常性が破綻し歯と歯槽骨の骨性癒着を起こすためであるが、その分子生物学的な原因は未だ明らかではない。本研究により得られる知見が、歯の萌出中の骨生癒着の原因究明につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

以下、マウス骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) を用いて解析を行った。

#### (1) 牽引力を負荷することによる EZH2、目的転写因子発現に対する影響

フィブロネクチンを用いてシリコン製ストレッチチャンバー (STREX 社) 表面をコーティングし、接着性細胞が播種できるようにした。ストレッチチャンバーは細胞進展装置 (STREX 社) に設置した後、ストレッチチャンバーに細胞を播種し、インキュベーター内で 24 時間培養し、チャンバー表面に細胞を接着させる。その後、インキュベーター内で 12% 牽引力を 2 時間負荷する。対象群は牽引力を負荷せず、ストレッチチャンバーに播種した細胞サンプルを使用した。対象群と比較して、実験群では EZH2 および目的転写因子 mRNA 発現およびタンパク質発現に変化が生じるか解析した。回収した細胞サンプルから RNA 抽出およびタンパク質抽出を行った。EZH2、転写因子の mRNA 発現変化をリアルタイム PCR で解析した。また、EZH2、転写因子タンパク質発現変化をウェスタンブロットで解析した。

#### (2) EZH2 と転写因子の相互作用に対する牽引力の影響

(1) の方法に準じて細胞に牽引力の負荷を行った。対象群と比較して、実験群では EZH2 と転写因子の結合に変化が生じるか解析した。解析には Duolink™ In Situ PLA (Sigma 社) を用いた。ストレッチチャンバーの細胞を播種した部分を切り取り、スライドガラスに張り付けた。キットのプロトコールに従い、PFA 固定後、細胞内に存在する EZH2 および目的転写因子に対する一次抗体と反応させ、さらにそれぞれの一次抗体に結合する PLA プロープ (プラスもしくはマイナス) と反応させる。2 つのタンパク質が極近距離にある際、プラスおよびマイナスの PLA プロープどうしが結合し、蛍光を発する。タンパク質結合部を蛍光顕微鏡で観察し、蛍光を発することが確認出来たら、タンパク質どうしが結合、相互作用していると判断した。

(3) 牽引力負荷による Osx 遺伝子プロモーター上への EZH2、関連転写因子、H3K27me3 動員の解析

(1)の方法に準じて細胞に牽引力負荷を行った。対象群と比較して、実験群では Osx 遺伝子プロモーター領域への転写調節因子およびヒストン修飾の動員量に変化が生じるか解析した。細胞を回収し、Cut & Run assay kit (CST 社)を用いて、Cut & Run assay を行った。PFA で固定後、細胞をスクレーパーにて回収した。標的タンパク質に特異的な一次抗体と Protein A-Protein G-Micrococcal Nuclease (pAG-MNase) を用いて、標的タンパク質である EZH2 もしくは目的転写因子と Osx 遺伝子プロモーター領域 DNA による複合体を分離する。DNA 精製を行い、Osx 遺伝子プロモーター領域に対するプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行い、目的転写因子のコンセンサス結合配列への EZH2、転写因子、H3K27me3 の動員量の変化を各々解析した。

(4)牽引力負荷による Osx 発現の解析

(1)の方法に準じて細胞に牽引力負荷を行った。対象群と比較して、実験群では Osx mRNA 発現および Osx タンパク質発現に変化が生じるか解析した。回収した細胞から RNA 抽出およびタンパク質抽出を行った。Osx 遺伝子 mRNA 発現変化をリアルタイム PCR で解析し、Osx タンパク質発現変化をウェスタンブロットで解析した。

#### 4. 研究成果

(1)メカニカルストレスを負荷した際の Osx 遺伝子発現を制御するヒストン修飾の変化について検証：伸展装置に播種した細胞に牽引力を負荷し、Cut&Run assay を用いて Osx 遺伝子プロモーター領域でのヒストン修飾量を解析したところ、伸展刺激によってヒストン修飾量が変化することが示唆された。

(2)メカニカルストレスを負荷した際の転写因子およびヒストン修飾酵素の相互作用に変化があるか検証：伸展装置に播種した細胞に牽引力を負荷し、Duo Link in situ PLA を用いて、転写因子およびヒストン修飾酵素の相互作用の変化を解析したところ、伸展刺激によってこれらの因子の相互作用が変化することが示唆された。

(3)Osx 発現に関与する転写因子遺伝子をエレクトロポレーション法でノックダウンした細胞に対し、メカニカルストレスを負荷した際に Osx 遺伝子、および Osx 発現に関与する転写因子、EZH2 について、リアルタイム-PCR を用いて発現量の変化を検証：伸展装置に播種した細胞に伸展刺激を負荷し、RT-PCR を用いて各遺伝子の発現量を解析したところ、伸展刺激によって発現量が変化することが示唆された。

(4)メカニカルストレスを負荷した際、Osx 発現量に変化があるか検証：伸展装置に播種した細胞に、メカニカルストレスを負荷することで、Osx 遺伝子発現量に変化があることが示唆された。

(5)細胞にメカニカルストレスを負荷した際、EZH2 および Osx 発現に関与する転写因子の、Osx プロモーター領域への動員量の変化について Cut&Run assay を行った。メカニカルストレス負荷により、動員量の変化が示唆された。

以上から、短時間の牽引力を負荷させた際の骨芽細胞マスター調節遺伝子である Osx 発現変化には、ヒストンメチル基転移酵素 EZH2 が関連する転写因子と相互作用をしながら Osx プロモーター領域でヒストン修飾を制御しながら骨芽細胞分化抑制に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------