

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 24日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390344

研究課題名（和文） DNAメチル化とヒストン修飾による骨格原基細胞の分化制御

研究課題名（英文） DNA methylation and histone modification regulate differentiation of skeletal stem cells

研究代表者

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：00240747

研究成果の概要（和文）：細胞が分化や決定を受ける時にはクロマチン構造が変化する。その変化には、DNA配列のCpGのシトシン残基のメチル化とヒストン末端の翻訳後修飾のパターンが関わる。本研究は骨格系細胞分化におけるそれらの変化を解析したところ、ヒストン末端のH3K9メチル化を担う酵素群が分化に伴って発現がダイナミックに変化し、さらにその基質の局在も変化することを見いだした。またヒストン修飾を変化させると分化機能にも影響を及ぼすことがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Chromatin structure is a critical determinant to regulate gene expression and it alters during fate decision or/and cell differentiation. Patterns of post-translational modification at histone tails as well as methylation patterns of cytosine residues at DNA affect chromatin structure. In this study, we examined histone modification during skeletal cell differentiation. We observed dynamic changes of expression of H3K9 methyltransferases at H3K9 and localization of three H3K9 methylation patterns, me1, me2, and me3, during skeletal development. It also suggests that inhibition of H3K9 me2 affects gene expression and subsequent cell differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 5,600,000 | 1,680,000 | 7,280,000 |
| 2011年度 | 5,000,000 | 1,500,000 | 6,500,000 |
| 2012年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,700,000 | 4,410,000 | 19,110,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：細胞分化、骨格組織

1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造が遺伝子の発現ならびに幹細胞の未分化状態の維持あるいは分化・決定に重要な役割を果たす。胚性幹細胞(ES細胞)の分化やiPS細胞における分化細胞から未分化状態への初期化の本質は、クロマチン構

造の変化であると考えられている。骨格系細胞においてもcytidineのアナログ5-azacytidineを線維芽細胞に用いると、DNAの脱メチル化により筋肉・脂肪・軟骨細胞へと分化する。DNA配列のCpGメチル化のみならず、ヒストンのメチル化・アセチル化など

のヒストン修飾が分化に関わる可能性が示唆されている。例えばヒストン H3 のリジン 27 残基をメチル化する酵素 Ezh2 は、筋肉細胞や神経細胞の分化を制御することが示唆されている。またリジン 4, 9, 27 のメチル化状態の組み合わせが、分化に関わる遺伝子発現を規定することから、ヒストンメチル化状態の重要性が示されている。

細胞増殖時には DNA メチル化だけでなくヒストン修飾状態が維持されることで、クロマチン構造自体は定常状態に保たれる。また DNA メチル化は転写抑制のみならず、転写活性化部位でも認められ、クロマチン構造の変化は DNA メチル化以外の要素も重要であることが明らかにされつつある。DNA メチル化やヒストン修飾状態が大きく変化するのは、分化における決定など重要な段階であると思われるが、骨格系組織も含めて、多くの組織の分化でどの時期にダイナミックなエピジェネティックな変化が起きるか、どのような DNA メチル化やヒストン修飾の変化であるか、十分には明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は骨格系細胞分化における DNA メチル化とヒストン修飾の役割の一端を明らかにすることを目的とする。具体的にはまず骨格系細胞の分化において DNA メチル化維持に関わる分子、H3 ヒストンのメチル化を担う分子の発現の解析を行う。また骨格系細胞分化における、DNA メチル化レベル、ヒストンメチル化レベルを変化させた場合の影響を調べる。さらに、ヒストンメチル化酵素やその基質となるメチル化ヒストンの *in vivo* での骨格形成過程における局在を調べる。また骨格形成に密接な関係のある歯の形成において同様にヒストンメチル化酵素 H3K9 とメチル化ヒストンの局在について調べる。さらにヒストンメチル化の機能を明らかにする目的で、ヒストンメチル化酵素の conditional knockout mice を作成し、骨格組織分化への影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 骨格系細胞分化におけるヒストン修飾酵素の発現

骨格系細胞分化モデルとしてマウス胎生 18 日齢の骨芽細胞、11 日齢の骨格原基前軟骨細胞、ST2 幹細胞株を用いそれぞれその分化過程におけるヒストン修飾酵素群の発現を real time PCR にて解析した。

(2) 骨格系細胞分化に対する、DNA メチル化阻害、ヒストンメチル化酵素阻害薬の影響
DNA メチル化阻害を行う 5-azacytidine とヒストンメチル化酵素 G9a の阻害剤である、BIX-01294 を骨格系細胞に作用させ、その影

響を real time PCR や Alkaline phosphatase staining にて観察した。

(3) ヒストンメチル化酵素阻害によるメチル化状態の変動

ヒストンメチル化酵素阻害におけるメチル化状態の変化の解析を行うために、H3K9 メチル化に関わる酵素 G9a を siRNA でノックダウンし、Chip を行うことで H3K9 メチル化の状態の変化を調べた。

(4) ヒストンメチル化酵素の *in vivo* での骨格形成過程における局在

ヒストンメチル化酵素の *in vivo* での骨格形成過程における局在を調べるために、G9a, GLP, 並びに SETDB1 について免疫組織学染色 Immunohistochemistry, Western blot Real time PCR を用いて調べた。メチル化としての H3K9me1, 2, 3, アセチル化としての H3Kac の局在も同様に比べた。

(5) ヒストンメチル化酵素の *in vivo* での歯の発生過程における局在

ヒストンメチル化酵素の *in vivo* での歯の形成過程における局在を調べるために、G9a, GLP, PRDM2, SUV39H1 について Immunohistochemistry, Western blot, Real time PCR を用いて調べた。メチル化としての H3K9me1, 2, 3, アセチル化としての H3Kac の局在も同様に比べた。

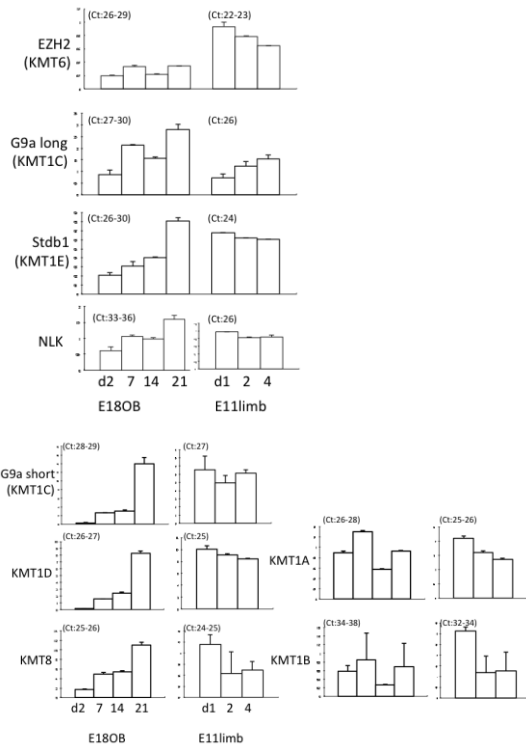
(6) ヒストンメチル化酵素の G9a の *in vivo* における機能解析

G9 floxed/floxed mice と sox9-cre の交配によって sox9 発現領域、すなわち骨格原基や神経堤においてヒストンメチル化酵素の G9a の機能欠損となった場合の影響について観察した。

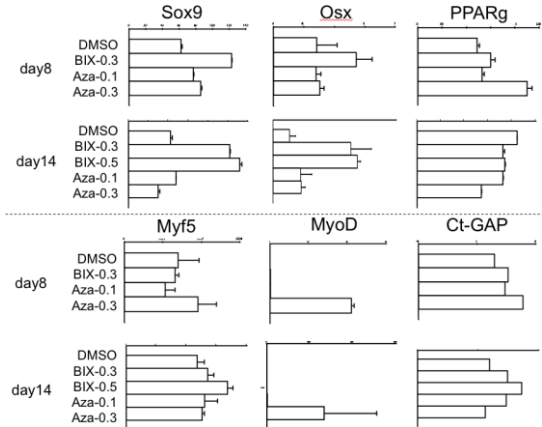
4. 研究成果

(1) 骨格系細胞分化におけるヒストン修飾酵素の発現

マウス胎生 18 日齢の骨芽細胞、11 日齢の骨格原基前軟骨細胞の分化におけるヒストンメチル化酵素群の発現を調べたところ、G9a, Setdb1, KMT1D, KMT8 は類似の発現変動を示すことがわかった。

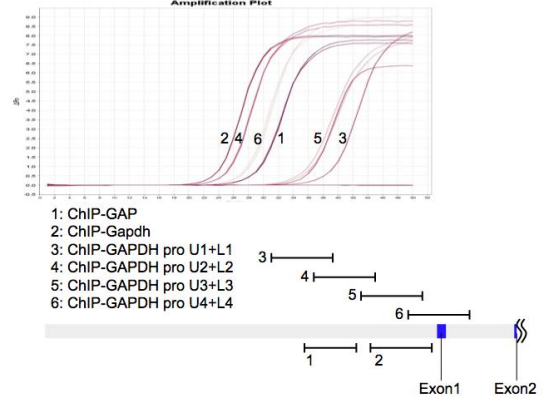


(2) 骨格系細胞分化に対する、DNA メチル化阻害酵素、ヒストンメチル化酵素阻害薬の影響
 骨格系細胞分化を起こすことのできる 10T1/2 細胞を用い DNA メチル化阻害を行う 5-azacytidine とヒストンメチル化酵素 G9a の阻害剤である、BIX-01294 を作用させた。BIX-01294 を作用させることで骨格系分化に必須である転写因子 *sox9*, *Osx* の発現上昇が認められた。

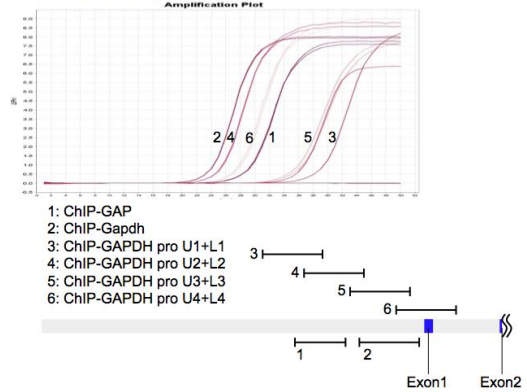


(3) ヒストンメチル化酵素阻害によるメチル化状態の変動
 Chip 実験条件を決めるために免疫沈降後に amplification plot を作成した。H3K9me1-antibody (Upstate) を用いた実験では GAPDH, beta-globin のプロモーター領域の Chip 解析。TSS 近傍プロモーター領域にピークがあることがわかった。

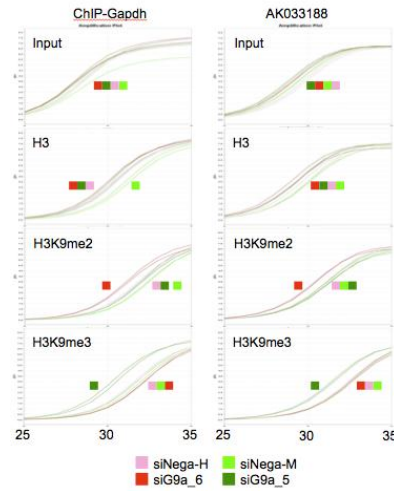
ChIP-GAPDH primer check



ChIP-GAPDH primer check

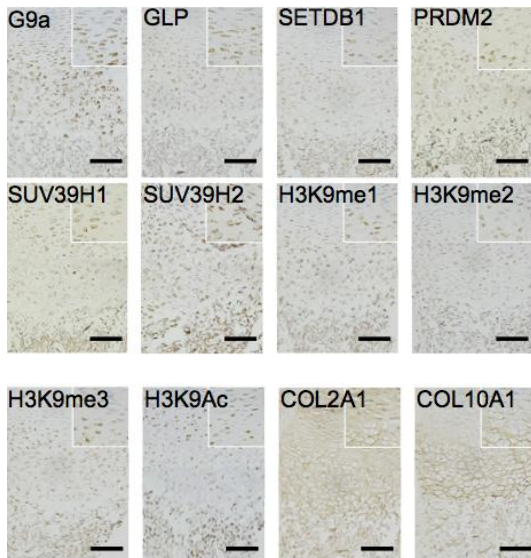


さらに H3, H3K9, me1, me2, me3 抗体を用いて G9a を siRNA でノックダウンした細胞に用いたところ、me2 の結合が有意に減少していることが認められた。

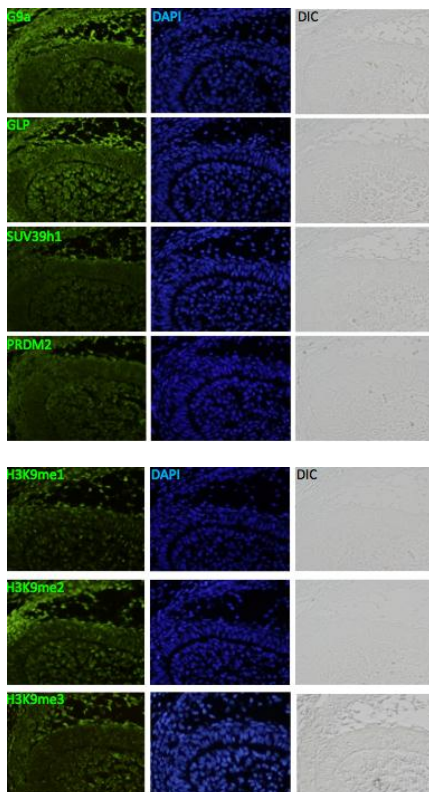


(4) ヒストンメチル化酵素の in vivo での骨格形成過程における局在
 マウス胎児 16 日齢長管骨 growth plate におけるヒストン H3K9 メチル化酵素 G9a, GLP, PRDM2, SUV39H1, SUV39H2 ならびに Setdb1, H3K9 メチル化としての H3K9me1, 2, 3, アセチル化としての H3Kac, 軟骨分化のマーカーと

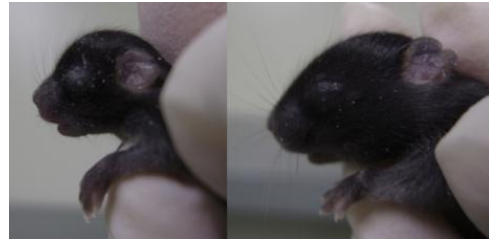
しての Collagen type2, typ10 の局在を示す。
前肥大軟骨細胞層でメチル化酵素群の発現集積が認められた。



(5) ヒストンメチル化酵素の in vivo での歯の発生過程における局在
マウス胎児 16 日齢下顎歯胚領域におけるヒストンメチル化酵素群の発現局在では、歯胚に G9a, GLP の顕著な集積が認められた。



(6) ヒストンメチル化酵素の G9a の in vivo における機能解析
右側が野生型、左側が機能欠損マウスの外見を示す。明らかな顔面骨格の劣成長を認める。



詳細な解析が進行中であり、このマウスにおける骨格組織分化への影響を調べることで、ヒストンメチル化酵素の機能を明らかにしていく予定である。

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 6 件)

① Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K, Nifuji A. Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Patterns*. 13: 84-90, 2013. (査読有)

② Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from iPSCs or ESCs. *Nature* 494: 100-104, 2013. (査読有)

③ Nifuji A Molecular mechanisms of skeletal tissue formation. *J Physical Fitness and Sports Medicine*. 2 (1),1-8, 2013
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfsm/2/1/2_1/_article (査読有)

④ Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Pöschl E, Nifuji A. Improved methods for detection of β -galactosidase (lacZ) activity in hard tissue. *Histochem Cell Biol*. 137:841-847, 2012. (査読有)

⑤ Nifuji A, Ideno H, Ohyama Y, Takanabe R, Araki R, Abe M, Noda M, Shibuya H. Nemo-like kinase (NLK) expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation. *Exp Cell Res*, 316(7):1127-36.. 2010(査読有)

⑥ Nifuji A, Ideno H, Takanabe R, Noda M Extracellular modulators regulate Bone Morphogenic Proteins in skeletal tissue, *J Oral Biosciences*, 52(4):311-321, 2010
<https://www.jstage.jst.go.jp/article/joralbios>

〔学会発表〕(計 19 件)

① Uda M, Araki R, Hoki Y, Sayama M, Nakamura M, Andou S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Limited and comparable immunogenicity of terminally differentiated cells derived from both iPSCs and ESCs. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場, 福岡.

② Kamiunten T, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Expression of three histone 3 lysine 9 methyltransferases during development of mouse molar. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場, 福岡.

③ Wada S, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Nakashima K, Nifuji A. Soluble factors may mediate signals from tendons to bone. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場, 福岡.

④ Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Imaizumi K, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Histone 3 lysine 9 methyltransferases G9a, GLP and SETDB1 are predominantly expressed in the prehypertrophic chondrocytes during the growth plate chondrocyte development. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場, 福岡.

⑤ Ideno H, Nakashima K, Imaizumi K, Kasama Y, Araki R, Abe M, Nifuji A. Region-specific CpG demethylation patterns of the myogenin promoter is required for MyoD mediated myogenic conversion from fibroblasts into myoblasts. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場, 福岡.

⑥ 出野 尚、中島 和久、荒木 良子、今泉 和彦、二藤 彰
MyoD-induced myogenic conversion requires cell proliferation
第 67 回日本体力医学会大会 2012 年 9 月 14 日 長良川国際会議場 岐阜

⑦ 出野 尚、中島和久、荒木 良子、今泉 和彦、安倍 真澄、二藤 彰

TSAによるmyogeninプロモーター脱メチル化制御を介した筋芽細胞への分化転換の抑制。第30回日本骨代謝学会学術集会, 2012年7月20日、京王プラザホテル、東京。

⑧小松浩一郎、島田 明美、出野 尚、柴田 達也、中島 和久、二藤 彰。アレンドロネートの細胞内取込みによる骨形成の促進。第30回日本骨代謝学会学術集会, 2012年7月19日、京王プラザホテル、東京。

⑨Ideno H, Araki R, Imaizumi K, Abe M, Nifuji A.
The myogenic conversion from fibroblasts into myogenic cells is blocked by Trichostatin A through suppression of myogenin expression. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日、パシフィコ横浜会議センター、神奈川県

⑩Shimada A, Shibata T, Komatsu K, Ideno H, Nifuji A. Pre-incubation of whole teeth in collagen gel enrich progenitor cells of mouse periodontal ligament. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日、パシフィコ横浜会議センター、神奈川県

⑪ Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Amizuka N, Brachvogel B, Nifuji A. Annexin a5 Expression Regulates Periodontal Tissue and Cementum Formation. 2011 Annual Meeting of ASBMR, 2011年9月19日, San Diego, California, USA.

⑫出野 尚、荒木 良子、今泉 和彦、安倍 真澄、二藤 彰 DNAメチル化阻害剤とHDAC阻害剤による筋細胞分化制御
第 66 回体力医学会大会, 2011 年 9 月 17 日, 下関市海峡メッセ, 山口

⑬島田 明美、小松浩一郎、中島 和久、網塚 憲生、Bent Brachvogel、二藤 彰。歯周組織形成過程におけるAnnexin a5の発現と機能。第29回日本骨代謝学会学術集会, 2011年7月28日, 大阪国際会議場, 大阪

⑭二藤 彰、出野尚、荒木良子、安倍真澄 レトロトランスポゾン L1 断片を持つ遺伝子群の骨格系細胞分化過程における統合的発現変動第 33 回日本分子生物学会, 2010 年 12 月 10 日, 神戸ポートピア, 兵庫

⑮出野 尚、荒木 良子、今泉 和彦、安倍 真澄、二藤 彰

多能性間葉系細胞10T1/2をモデルとした筋肉細胞、脂肪細胞への選択的分化制御 第65回日本体力医学会, 2010年9月17日, 千葉商科大学, 千葉

⑯小松浩一郎、島田 明美、出野 尚、柴田達也、二藤 彰. エンドサイトーシスを介した骨芽細胞の生存と分化に対するアレンドロネートの影響. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 2010年7月23日, 京王プラザホテル, 東京.

⑰島田 明美、小松浩一郎、二藤 彰. 硬組織における β -Galactosidase (LacZ) レポーター遺伝子発現検出法の検討. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 2010年7月23日, 京王プラザホテル, 東京

⑱二藤 彰、出野尚、荒木良子、安倍真澄. non-LTR型レトロトランスポゾン L1 を持つ遺伝子群の骨格系分化過程における統合的発現制御. 第28回日本骨代謝学会学術集会, 2010年7月23日, 京王プラザホテル, 東京

⑲Shimada A, Shibata T, KomatsuK, Nifuji A. Collagen Gel Culture Accelerates Proliferation of Mouse Periodontal Ligament Cells. 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010年7月17日, Centre Convencions Internacional Barcelona, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：00240747

(2) 研究分担者

柴田 達也 (SHIBATA TATSUYA)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：90323708

(3) 連携研究者

なし