

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791962

研究課題名(和文) 局所リン代謝調節に基づく歯の形成機構の解明 - エピゲノム解析からのアプローチ -

研究課題名(英文) Study of tooth morphogenesis from the aspect of local regulation of phosphate metabolism: An epigenomic approach.

研究代表者

吉岡 広陽 (YOSHIOKA, HIROTAKA)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：50523411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDNAメチル化について、マウス歯胚発生過程に注目して解析を行った。抗5-メチルシトシン抗体および抗5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)抗体を用いた免疫染色およびドットプロット解析を行い、分泌期以降のエナメル芽細胞で5-hmC量が上昇し、さらに移行期に入るとクロモセーターを形成することが確認された。また、維持メチル化酵素Dnmt1が内エナメル上皮に発現し、分化に伴い低下することを確認した。以上の結果から、Dnmt1が内エナメル上皮細胞の未分化状態の維持に関与する可能性が示唆された。さらに分化に伴いDNAメチル化状態および核内高次構造がダイナミックに変動することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have performed histological and molecular experiment to uncover the distribution of epigenetic modifications, especially DNA methylation and hydroxymethylation, and related factors during mouse amelogenesis. The global increase of 5-hydroxymethylcytosine levels was observed when the ameloblast cells enter into secretory stage; then onset of differentiation into secretory stage, the formation of chromocenter was observed. Also, Dnmt1 mRNA and protein expression showed highest levels in immature dental epithelial cells, with decreasing levels at later stages of development. These results suggest that Dnmt1 may sustain the maintenance of undifferentiation status of dental epithelial cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

歯や骨などの硬組織においては、主に2つのIII型ナトリウム依存性リン酸(Na/Pi)トランスポーター(Slc20a1, Slc20a2)が細胞内へのリン酸(Pi)の取り込みを担っていることが報告されている。近年、Piがシグナル分子として機能し、Pi代謝調節因子と協調して、歯や骨における細胞の分化や石灰化に関与していることが明らかになっている。特に、低リン血症性骨軟化症/くる病等の疾患では、骨のみでなく歯の形成異常を伴う症例も多く、全身性のPi代謝調節(血清Pi濃度の恒常性)と硬組織の石灰化との関連が詳細に検討されている。また、我々はこれまでにSlc20a1を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析を進め、全身性の血清Pi代謝調節のみならず、歯を構成する細胞局所でのPi代謝調節の重要性を示唆している(Yoshioka et al., Calcif Tissue Int, 2011)。さらに、高Pi血症が歯胚発生に与える影響を分子レベルで探索することを目的として、以下の実験を行っている。マウスの下顎臼歯歯胚を器官培養し、過剰なPi負荷により発現変動する遺伝子(Pi応答遺伝子)をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。この結果から、培養歯胚へのPi負荷により、象牙芽細胞の分化は促進されるが、その一方、エナメル芽細胞の分化は抑制的な方向へと進むことが示唆された。培養細胞株を用いた実験により、Piが象牙芽細胞の分化・石灰化を促進することから、Piによる影響は、象牙芽細胞へは直接的であり、エナメル芽細胞へは上皮-間葉の相互作用を介した間接的なものであると考えられた。しかし、これらの細胞内応答(Pi応答)がどのようなエピジェネティック制御で引き起こされるのか、そしてそれが歯の発生にどう影響するのか、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

細胞内へのPiの流入がERKシグナルを活性化することが知られているが、このシグナル伝達過程がエピジェネティック制御によってどのように媒介され、歯の発生にどう影響するのかは未だ不明である。そこで本研究では、まず、マウス歯胚発生過程におけるエピジェネティックな修飾ならびに関連因子の時空間的分布や挙動を把握することを目的とする。また、これらエピゲノム解析を通じて、歯を構成する細胞局所でのPi代謝調節(Piによるシグナル伝達)に関与するエピジェネティック制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯胚形成過程におけるDNAメチル化ダイナミクスの解析

マウス下顎切歯(10日齢)のパラフィン標本を材料に、抗5-メチルシトシン

(5-mC)抗体あるいは抗5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)抗体を用いた免疫染色を行う。

マウス下顎切歯(6日齢)の切端または根尖からエナメル上皮層のみを分離し、DNAを抽出する。それぞれのDNAに対して、抗5-mC抗体あるいは抗5-hmC抗体を用いたドットプロット解析を行い、ゲノム中の5-mCあるいは5-hmCを定量する。

(2) 歯胚形成過程におけるDNAメチル化およびヒドロキシメチル化関連因子の発現パターンの解析

マウス下顎切歯(6日齢)の切端または根尖からエナメル上皮層のみを分離し、RNAを抽出する。それぞれのRNAからcDNAを合成する。

上記cDNAについて、エナメル芽細胞の分化マーカー遺伝子、Ameloblastinおよびp75Ngfr、の発現をリアルタイムPCRにより解析し、分化段階を確認する。

上記cDNAについて、DNAメチル化関連因子、Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3bおよびヒドロキシメチル化関連因子Tet1, Tet2, Tet3の発現変動をリアルタイムPCRにより解析する。

リアルタイムPCRの結果から発現変動を認める因子を絞り込み、免疫染色による発現局在を解析する。

(3) Pi代謝関連因子に関与するエピジェネティック制御機構の解析

Pi代謝関連因子について、バイオインフォマティクスを用いた遺伝子構造およびCpGアイランドの有無を解析する。DNAメチル化による制御を受ける可能性があるかどうか絞り込みを行う。

エナメル芽細胞株あるいは象牙芽細胞株をDNAメチル化阻害剤で処理し、Pi代謝関連因子の発現に変動が認められるか確認する。

4. 研究成果

(1) 歯胚形成過程におけるDNAメチル化ダイナミクスの解析

切歯の発生過程、とりわけエナメル上皮細胞の分化に伴い、5-mCおよび5-hmCの分布がダイナミックに変動した。5-mCは移行期以降、5-hmCは分泌期以降のエナメル芽細胞に点状の染色を認めた。

ドットプロット解析の結果,ゲノム中の5-mCの量はエナメル芽細胞の分化に関わらず一定であった。一方,5-hmCの量は分化したエナメル芽細胞で多くなることが明らかとなった。

以上の結果から,エナメル芽細胞が分泌期に入るとDNAメチル化状態がダイナミックに変動し,さらに移行期に入るとクロモセンターの形成など核内高次構造が変化することを示唆している。

(2) 歯胚形成過程におけるDNAメチル化関連因子の発現パターンの解析

マウス下顎切歯(6日齢)の切端または根尖からエナメル上皮層のみを分離し, RNAを抽出後,cDNAを合成した。切端ではAmeloblastinが多く発現し,根尖ではp75Ngfrが多く発現することから,エナメル芽細胞の分化段階に合わせて発現変動を解析できることを確認した。

上記cDNAを用いて,DNAメチル化関連因子Dnmt1,Dnmt3a,Dnmt3bについて,ヒドロキシメチル化関連因子Tet1,Tet2,Tet3について,エナメル上皮の分化に伴う発現変動を解析した。

Dnmt1の発現が未分化エナメル上皮において高く,分化に伴い低下することを確認した。

Dnmt3a,Dnmt3b,Tet1,Tet2,Tet3については分化に関わらず一定の発現を示した。

マウス下顎切歯(10日齢)のパラフィン標本を材料に,抗Dnmt1抗体による免疫染色を行い,内エナメル上皮細胞層に高く発現し,分化に伴い低下することを確認した。

(3) Pi代謝関連因子に關与するエピジェネティクス制御機構の解析

DNAメチル化により制御を受けると推測されるPi代謝関連因子は明らかとなったが,DNAメチル化阻害剤により発現変動する因子は未だ見つかっていない。

以上の結果から,Dnmt1が内エナメル上皮細胞の未分化状態の維持に關与する可能性が示唆された。さらに分化に伴いDNAメチル化状態および核内高次構造がダイナミックに変動することが明らかになった。

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1件)

1. Yang Z, Yoshioka H, McCarrey JR. Sequence-specific promoter elements regulate temporal-specific changes in chromatin required for testis-specific activation of the *Pgk2* gene. *Reproduction*, 146: 501-516, 2013 (査読あり) DOI:10.1530/REP-13-0311.

[学会発表](計6件)

1. Minamizaki T, Konishi Y, Sakurai K, Yoshioka H, Kozai K, Yoshiko Y. Soluble Klotho does not rescue but rather exaggerates skeletal defects in Klotho-deficient mice. 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, Oct. 12-13, 2013, Hiroshima
2. Fujino Y, Minamizaki T, Sakurai K, Irie Y, Yoshioka H, Takei Y, Kozai K, Okada M, Yoshiko Y. Imaging mass spectrometry-based molecular histology of bone shows the implication of MEPE-ASARM for the Klotho-deficient phenotype. The American Society for Bone and Mineral Research 2013 Annual Meeting, Oct. 4-7, 2013, Baltimore, USA
3. 吉岡広陽, 南崎朋子, 吉子裕二. マウス歯胚発生過程におけるエピジェネティクス制御機構の解明. 第55回歯科基礎医学会学術大会, 2013年9月21日, 岡山
4. Minamizaki T, Konishi Y, Sakurai K, Yoshioka H, Kozai K, Yoshiko Y. Soluble Klotho does not rescue but rather exaggerates skeletal defects in Klotho-deficient mice. 2nd Joint Meeting of International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28 - Jun. 1, 2013, Kobe
5. 大西梓, 吉岡広陽, 南崎朋子, 吉子裕二. マウス歯胚発生過程におけるDNAメチル化酵素Dnmt1の役割. 第118回日本解剖学会総会・学術集会, 2013年3月28日, 高松
6. Minamizaki T, Konishi Y, Yoshioka H, Kozai K, Yoshiko Y. Transient but not constitutive activation of ERK is necessary for the unique action of FGF23 in bone. The 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Oct. 12-15, 2012, Minneapolis, USA

[その他]
ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anato1/welcome.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 広陽 (YOSHIOKA HIROTAKA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：50523411