

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792293

研究課題名(和文) 下顎器官形成期におけるエピジェネティック制御解析

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic control of mandibular development during embryonic stage

研究代表者

寺尾 文恵 (TERAO, FUMIE)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10510018

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)：エピジェネティックに制御を行う因子の一つであり、様々な器官形成に関与することが知られているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は、ラット胎生期下顎隆起において発現が認められている。下顎隆起由来細胞におけるHDAC阻害剤により、軟骨分化は阻害された。また、下顎隆起器官培養において、メッケル軟骨の大きさが縮小した。さらに、部位特異的Hdac1ノックダウンにより、メッケル軟骨形態の変化が認められた。これらのことから、HDACは、胎生期下顎隆起の形態形成において重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylases (HDACs) have emerged as important regulators of growth and organogenesis in various tissues. Inhibition of HDAC activity by Trichostatin A repressed the formation of cartilage nodule in mandibular cell culture and the formation of Meckel's cartilage in mandibular organ culture. Knockdown of HDAC1 in the lateral region of mandibular organ caused asymmetric shape of Meckel's cartilage. These results indicate that HDAC plays an important role in pattern formation of rat mandibular process during embryonic stage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：発生・分化 細胞・組織 エピジェネティック メッケル軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面形態のみならず、様々な器官の形態形成において、環境要因、遺伝的要因(SNPなど)、エピジェネティック要因など、複数の因子が相互に関与している。ヒトゲノムプロジェクトにより、ヒトゲノムDNA配列が決定された近年の遺伝学では、エピジェネティクスが注目を集めている。その一つとして、ヒストンの修飾などがあり、ヒストンはメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化のように様々な修飾を受ける。ヒストンの修飾はDNAのメチル化と相互に作用してクロマチン構造のダイナミックな変化と遺伝子の発現調節を結び付けていると言われている。ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)はヒストンの脱アセチル化を行う酵素であり、遺伝子の転写制御において重要な役割を果たしており、様々な細胞への分化を制御することが報告されつつある。同時に、Notchシグナリングなどの細胞内情報伝達の制御にも関与している。

矯正歯科治療においては、重度の骨格的異常を顎変形症として形態学的に診断し、外科矯正の対象とする。しかしながら、この形態診断は成長を終了した個体に対する表現型の診断であり、その原因や発生メカニズムに対しては関心があまり払われていない。早い時期に診断を可能とするために、顎顔面顎変形症の表現型を決定づける遺伝的因子とその発現調節機構の解析が急がれるが、そうした研究は進んでいないのが現状である。

## 2. 研究の目的

下顎骨の形態・大きさを決定する遺伝的因子とエピジェネティックな発現制御メカニズムとの関連を解明し、将来的には、遺伝子変異によって引き起こされる顎顔面領域における表現型をエピジェネティックにコントロールすることにより、ヒトの顔面形態の形成メカニズムを踏まえた矯正歯科治療法の確立を目指す。

本研究においては、顎顔面に表現型が発現すると予測される種々の因子について、表現型とその発現および発現制御のメカニズム

を、従来のジェネティックおよびエピジェネティックの両面から解析することを最終的な目的として、実験的に HDAC を阻害およびノックダウンする実験系を用いて、下顎の形態形成のメカニズムを解析する。本研究は、顎顔面の形態形成において遺伝子の発現を調節すると考えられる HDAC の下顎器官形成における表現型への関与と、そのメカニズムを解明する事を目的として、その下顎骨、およびそのテンプレートとしての役割を持つメッセル軟骨の形態形成に果たす役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) トリコスタチン A (TSA) による HDAC 阻害実験

軟骨前駆細胞 ATDC5 を用いた実験  
ラット胎生期下顎隆起器官培養への導入に先立ち、まずマウス軟骨前駆細胞 ATDC5 を用いた実験を行った。2nM, 200nM, 20μM の TSA を添加した 5%FBS 含有 DMEM/F12 で ATDC5 細胞を 37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で培養し、培養 1 日後に細胞よりタンパク質を回収した。Western blotting 法にてアセチル化ヒストン抗体を用いてヒストンのアセチル化活性の変化を検討した。

また、ATDC5 細胞を 1×10<sup>7</sup> 個/ml に再懸濁し、10μl をスポット状にプレート上に播種し、軟骨分化誘導のための Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) を含有した 5%FBS DMEM/F12 培地で高密度培養を行った。播種翌日に TSA を 2nM, 200nM, 20μM の濃度で添加し、培養開始 7 日目にアルシアンブルー染色を行った。

胎齢 12 日ラット下顎隆起を用いた実験  
胎齢 12 日目のラットより下顎隆起を摘出し、細胞を分散、播種し、10%FBS 添加 DMEM 培地を用いて下顎隆起細胞の高密度培養を行った。TSA を 2nM, 200nM, 20μM の濃度で添加し培養を行い、培養開始 7 日目にホールマウントアルシアンブルー染色を行った。

## (2) HDAC1 shRNA ベクター導入による HDAC1 阻害実験

### ATDC5 を用いた実験

ATDC5 細胞へ Hdac1 shRNA ベクターおよび Hdac1 siRNA のトランスフェクションを行い、培養 1 日後、2 日後に細胞より Total RNA およびタンパク質を回収した。得られた Total RNA を逆転写により cDNA を作製、リアルタイム PCR 解析により、Hdac1 のノックダウンを確認した。また、Western blotting 法にて HDAC1 タンパク量の変化を確認した。アセチル化ヒストン抗体を用いてヒストンのアセチル化活性の変化を検討した。

### 下顎隆起器官培養を用いた実験

次に、Hdac1 の shRNA ベクターおよび siRNA を胎生期下顎隆起器官培養へ導入を行った。導入は下顎隆起の右側側方部に行い、左側を対照側とした。導入 7 日後にホルマウントアルシアンブルー染色を行い、メッケル軟骨の形態を観察した

## 4. 研究成果

### 1) トリコスタチン A (TSA) による HDAC 阻害実験

ATDC5 細胞において、TSA 添加から 1 日後にヒストン H3 のアセチル化が増加していた。このことから、TSA の HDAC 阻害能が確認できた。

ATDC5 細胞の高密度培養において、TSA 添加による HDAC 阻害により、軟骨ノジュールの形成が抑制された。

ラット胎生期下顎隆起の器官培養において、TSA 添加による HDAC 阻害により、メッケル軟骨の形成が抑制され、1mM 以上の濃度においてはメッケル軟骨の形成が完全に消失した。以上の結果より、HDAC は胎生期下顎隆起におけるパターン形成、とくにメッケル軟骨の形成において、大変重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 2) HDAC1 shRNA ベクター導入による HDAC1 阻害実験

リアルタイム PCR 解析により、Hdac1 のノックダウンが確認できた。細胞から抽出したタンパクの解析により、HDAC1 タンパク量の減少を確認した。また、アセチル化ヒストン抗体を用いてヒストンのアセチル化活性の変化を検討した結果、shRNA ベクターを導入して 1 日後にヒストン H3 のアセチル化が増加していた。

下顎隆起器官培養において、shRNA ベクター導入 7 日後にホルマウントアルシアンブルー染色を行い、メッケル軟骨の形態を観察した。その結果、導入側において、メッケル軟骨の形態異常が認められ、左右非対称の形状を示した。

これらのことより、ラット胎生期下顎隆起において、Hdac1 はメッケル軟骨の形態形成制御に関わることが示唆された。

## 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. Umeda M, Terao F, Yoshizaki K, Takahashi I, Profiling MicroRNA Expression in Mouse Mandibular Condylar Cartilage during Development, 91st General Session of International Association for Dental Research, シアトル・アメリカ合衆国, 2013.3.20-23
2. Terao F, Umeda M, Yoshizaki K, Takahashi I, Real-time Monitoring of Intracellular ERK in ATDC5 Under Mechanical Stress, 91st General Session of International Association

for Dental Research, シアトル・アメリカ合衆国, 2013.3.20-23

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

寺尾 文恵 (TERAO FUMIE)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：10510018

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (3)研究協力者

梅田 まりこ (UMEDA MARIKO)  
九州大学病院・医員