

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17147

研究課題名(和文)顎口腔疾患の病態形成におけるエピジェネティックな制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of stomatognathic system

研究代表者

浮田 万由美(Ukita, Mayumi)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10778971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：変形性顎関節症は加齢とともに罹患率が増加する疾患で、顎関節の関節軟骨の代謝異常により関節が吸収されて発症すると考えられている。エピジェネティックな制御は軟骨の代謝に関わることが示唆されているが、顎関節の関節軟骨の吸収とエピジェネティックな制御の関係についてはよくわかっていない。今回ヒストンH3のメチル化に注目して研究を行なったところ、H3K9のメチル化は顎関節軟骨代謝を制御する可能性が示唆され、今後の変形性顎関節症の治療法へも繋がることが期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科治療で扱う病気は、虫歯や歯周病、歯科矯正、顎関節症など多岐にわたるが、歯磨き、食生活、頬杖をつくなどの日常の環境や習慣が疾患の発症に関係することが多い。今回着目したエピジェネティックな制御とは、環境による遺伝子制御として近年注目されている。歯科疾患は環境要因が疾患発症に関わることが多いにも関わらず、エピジェネティックな制御との関連はこれまであまり研究されてこなかった。本研究で歯科疾患とエピジェネティックな制御の関連が示唆されたことにより、未だ解明されていない歯科領域の難病や治療法の開発に貢献できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Temporomandibular joint osteoarthritis (TMJOA) morbidity increases with age. Condylar articular cartilage degradation, which causes TMJOA, is known to be involved in articular chondrocyte metabolic imbalance in the temporomandibular joint (TMJ). Epigenetic regulation is implicated in cartilage homeostasis. However, few studies have been conducted on the epigenetic regulation of condylar articular cartilage degradation. In this study, we investigated the regulation of H3K9 methylation and its effects on the pathogenesis of degenerative TMJ cartilage disorder. Our results indicate that histone H3K9 methylation regulates chondrocyte homeostasis in terms of cell growth, apoptosis, and gene expression and highlights a possible future therapy option for TMJOA treatment.

研究分野：冠橋義歯補綴学

キーワード：エピジェネティクス 変形性顎関節症

## 1. 研究開始当初の背景

進行性下顎頭吸収は後天性の難治性疾患である。下顎頭吸収は前歯部開咬を引き起こし、咀嚼の他、顔貌も急激に変化するため、機能・心理面での患者 QOL 低下が著しい。また、臼歯部に咬合力が集中し咬合痛・顎関節部痛が起きることもある。原因・治療法ともに全く不明のため、現在はマウスピースや補綴処置などで咬合の安定を図り、下顎頭吸収の停止を待つしかない。再発の可能性もあり、早急な原因究明と治療法の開発が必要である。

全身の関節が年々摩滅し、運動時にひどい痛みが生じるようになる場合がある。これは変形性関節症(Osteoarthritis; OA)といい全身の関節が不可逆的に破壊される疾患である。遺伝的要因や、関節への過剰負荷などの環境因子が関わると考えられているが、病態形成メカニズムは明らかになっていない。しかし、基礎研究・ヒト臨床研究から、軟骨代謝異常におけるエピジェネティックな制御が OA 病態形成メカニズムとして新たに報告された。

軟骨代謝とは、関節の軟骨細胞が古くなったコラーゲンなどの軟骨基質を分解し、新しく軟骨基質を合成することである。正常な軟骨代謝は、関節の摩擦力に対する耐久性獲得に重要である。軟骨代謝異常により、軟骨の摩擦力に対する耐久性が低下し、OA が発症・進行することが示唆されている。

エピジェネティックな制御とは「遺伝子の DNA 配列は変化せず 後天的な環境により起こり、次の世代へ引き継がれる遺伝子制御」であり、その分野をエピジェネティクスと呼ぶ。世界で精力的に研究されている、新たな遺伝子制御メカニズムである。私たちの体は心臓、脳、皮膚など役割の異なる様々な器官で構成されている。しかし、実はどの器官の細胞も同じ遺伝子を持っていて、働く遺伝子の ON/OFF を調節することで 1 個体の中に様々な器官を持ち、その機能を安定的に維持している。遺伝子の ON/OFF を行うのがエピジェネティックな制御であり、染色体や DNA に生じる後天的な化学修飾 (DNA のメチル化など) が中核をなしている。そのため、先天的に同じ遺伝子を持っていても、後天的な環境要因で遺伝子がエピジェネティックな修飾を受け細胞の形質が変化する。変化した形質は細胞分裂後も引き継がれ、細胞増殖の結果、組織、そして個体レベルで形質が変化すると考えられている。

軟骨代謝異常におけるエピジェネティックな制御については、軟骨形成に関わる遺伝子がメチル化されて発現抑制され、軟骨基質分解に関わる遺伝子は脱メチル化されて発現促進される。軟骨代謝に重要な役割を担う遺伝子がエピジェネティックな修飾を受けた結果、全体として軟骨分解に代謝が傾き変形性関節症が発症・進行すると報告された。

顎の不調を訴える患者は増加しており、疼痛だけでなく、下顎頭の吸収・変形を伴うことが少なくないが、その発症のメカニズムは明らかになっていない。鎮痛剤やマウスピース装着などによる対症療法が主であるため、症状が長引くと長期にわたる通院を余儀なくされる。再発のリスクもあることから、下顎頭形態の回復という根本的な治療法の開発が望まれる。そのためには病態形成メカニズムを明らかにすることが必須である。

下顎頭吸収では、関節軟骨の細胞数減少、軟骨の菲薄化、表面の亀裂増加などの組織解剖学的な報告や、軟骨細胞の 2 型コラーゲン合成減少、MMP 合成増加など生化学的变化も報告されている。顎関節においても、軟骨代謝異常で、咬合力などの関節のメカニカルストレスに耐えられなくなることが下顎頭吸収の病態形成に関わると示唆されている。ところが、顎関節では下顎頭吸収の病態形成におけるエピジェネティックな制御に関する報告は全くない。

顎関節は、解剖組織学的構造や機能、発生学的な起源が四肢関節とは異なる。実際、四肢関節と顎関節の発生学的な差異がそれぞれの関節炎の病態形成の違いに影響を与えることが報告されている。そのため、四肢関節のエピジェネティックな制御の報告を顎関節に当てはめることは難しく、下顎頭吸収におけるエピジェネティックな制御の関連を調べる必要があった。

## 2. 研究の目的

近年、分子レベルでのエピジェネティックな制御 (環境による遺伝子制御) の観点からの病態形成メカニズム解明が行われるようになってきたが、顎口腔疾患への応用例は非常に少ない。実際、顎関節症などの顎の不調は食生活習慣や頬杖をつく、片側ばかりで食事をするなどの環境要因と顎の不調の関係も示唆されているが、エピジェネティックな制御との関連についてはわかっていない。

関節軟骨吸収の病態形成には、エピジェネティックな制御を介した後天的な軟骨代謝異常が関係すると報告されている。しかし、下顎頭吸収において、そのような報告は全くない。

そこで、本研究では、下顎頭吸収におけるエピジェネティックな制御の関連を解明し、後天性の難治性疾患である進行性下顎頭吸収を含む、下顎頭の異常吸収の病態形成メカニズムを解明し疾患の予防法・治療法につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウスでは加齢により関節の吸収が起きるとされているため、20 ヶ月齢の高齢マウス

(C57BL/6NcrSlc マウス)を下顎頭吸収マウス,8週齢のマウスを健常マウスとした.麻酔下に4%パラホルムアルデヒドを用いてマウスを灌流固定し,顎関節を採取した.次にEDTAで脱灰を行い,パラフィンを作成した.

(2)下顎頭吸収の組織学的解析として,高齢のC57BL/6NcrSlcマウスの下顎頭吸収を確認するため,顎関節のHE染色,サフラニンOファストグリーン染色を行い,またエピジェネティックな制御との関連についてメチル化ヒストン(H3K9me1,H3K9me2,H3K9me3)の免疫染色を行った.メチル化ヒストン陽性細胞数を測定し,加齢とメチル化ヒストンの発現変化の関連を調べた.

(3)マウス前軟骨細胞ATDC5細胞にchaetocin(ヒストンH3K9のメチル化阻害剤)を加えて培養した.ATDC5細胞のcaspase活性の測定や軟骨の同化に関わるsox9・2型コラーゲンや軟骨の異化に関わるMMP13や10型コラーゲンなどの遺伝子のmRNA発現量を測定し,ヒストンH3K9のメチル化が軟骨代謝やアポトーシスに与える影響を生化学的に検討した.

#### 4. 研究成果

(1)HE染色とサフラニンOファストグリーン染色を行なったところ,高齢マウスでは下顎頭の軟骨細胞層が薄くなり,軟骨細胞層の断裂やプロテオグリカンの減少が見られた.顎関節吸収の指標とされているモディファイドマンキンスコアは健常マウスに比べ優位に高値を示し,高齢マウスでは下顎頭吸収が起きていることが観察された(図1).

(2)メチル化ヒストン(H3K9me1,H3K9me2,H3K9me3)の免疫染色では,吸収の起きている高年齢マウスの下顎頭では染色性が低下した.また,H3K9me1,H3K9me2,H3K9me3いずれのメチル化ヒストンH3K9においても陽性細胞率が減少した.

(3)H3K9メチル化阻害剤chaetocinを加えてATDC5細胞を培養したところ,H3K9のメチル化抑制が確認された.H3K9のメチル化を阻害したATDC5細胞では,アポトーシスの活性が増加した(図2).

(4)軟骨の同化に関わるsox9・2型コラーゲンのmRNA発現量が減少し,軟骨の異化に関わるMMP13の発現量が増加した(図3)ことから,軟骨代謝を負に制御すると考えられた.以上より,顎関節の吸収や軟骨の代謝にH3K9メチル化に関わる可能性が示唆された.

(5)歯科疾患は,口腔内環境や食生活,頬杖をつくなどの生活環境も病気の発症に関わるとされている.本研究からエピジェネティックな制御,環境による遺伝子制御,下顎頭吸収の関連が示唆されたことから,進行性下顎頭吸収などの治療法の確立されていない難治性疾患に対して,エピジェネティックな制御の観点から,病態形成メカニズムを解明し治療法の開発へつなげる可能性が期待される.

図1 下顎頭吸収とModified Mankin score

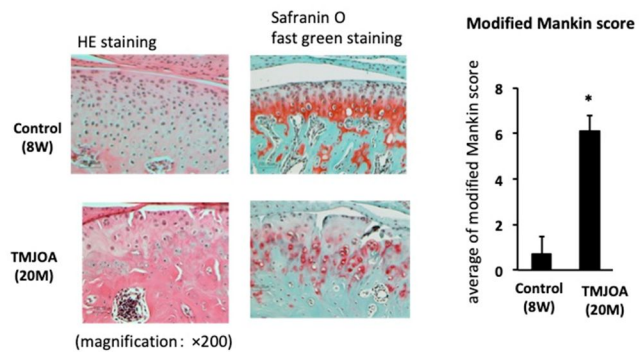


図2 chaetocin添加時のアポトーシス活性の変化

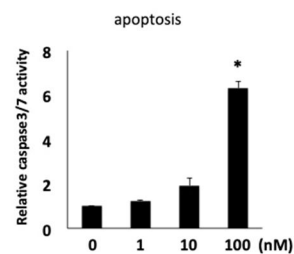
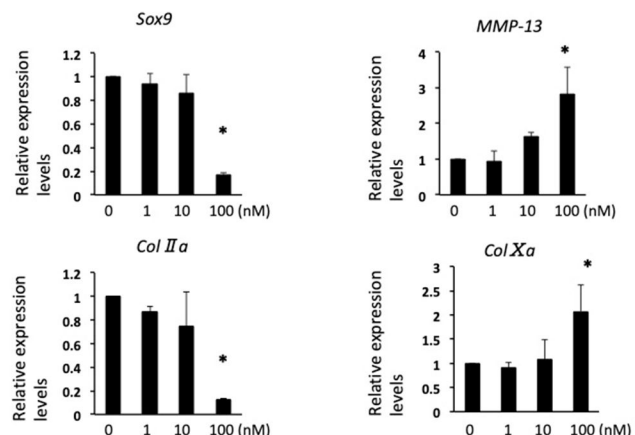


図3 chaetocin添加時のmRNA発現量



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ukita Mayumi, Matsushita Kenji, Tamura Masato, Yamaguchi Taihiko	4. 巻 45
2. 論文標題 Histone H3K9 methylation is involved in temporomandibular joint osteoarthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 607, 614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijmm.2019.4446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 浮田万由美、山口泰彦、田村正人、松下健二
2. 発表標題 ヒストンメチル化は下顎頭吸収に関わる
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ukita Mayumi, Yamaguchi Taihiko, Tamura Masato, Matsushita Kenji
2. 発表標題 Histone methylation involved in temporomandibular joint osteoarthritis
3. 学会等名 Australian and New Zealand Bone and Mineral Society 2018 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浮田万由美、松下健二、田村正人、山口泰彦
2. 発表標題 ヒストンメチル化は変形性顎関節症に関与する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ukita Mayumi, Yamaguchi Taihiko, Tamura Masato, Matsushita Kenji
2. 発表標題 Histone methylation involved in temporomandibular joint osteoarthritis in aged mice
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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