

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09846

研究課題名(和文) 低酸素暴露がヒト歯根膜細胞内サイトカインカスケードに及ぼす作用の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of hypoxia-induced modification of cytokine cascade in periodontal ligament cells

研究代表者

白川 哲夫 (SHIRAKAWA, Tetsuo)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00187527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：不死化ヒト乳歯由来歯根膜細胞SH9を試料に用い、通常条件(CO₂: 5%、air: 95%、37℃)または低酸素条件(CO₂: 5%、O₂: 1%未満あるいは5%、37℃)で培養したのちゲノムDNAを回収し、イルミナ社ビーズアレイを用いてDNAメチル化解析を行った。24時間の低酸素暴露によってメチル化レベルが変化した遺伝子のうち、RT-qPCRにてSMYD5およびSMYD3のmRNA発現の減少を認めた。この結果は、リジンメチル基転移活性を有するこれらのタンパクが低酸素暴露によって減少した場合、ヒストンメチル化が低下することで、クロマチン構造に広範な変化が生じる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜は歯槽骨内で歯を保持するとともに歯根周囲のセメント質や骨の代謝にも重要な役割を果たしている。歯根膜細胞が失活すると歯根の不可逆的な吸収が進行し歯を失う原因となる。怪我などで歯根膜細胞が低酸素環境に暴露された場合に、DNAを含む核内クロマチン構造にどのような変化が生じるかについて十分には分かっていない。本研究では、低酸素暴露された歯根膜細胞で、SMYD5およびSMYD3の遺伝子発現が有意に減少することを見いだした。これらのタンパクはクロマチンを構成するヒストンのメチル化に関わっていることから、低酸素暴露がクロマチンの構造変化を介して遺伝子発現の広範な変化をもたらす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Immortalized PDL cells derived from human deciduous teeth (SH9 cells) were cultured at 37℃ in 5% CO₂/95% air (normoxic condition) or in 5% CO₂/ $<$ 1% O₂ or in 5% CO₂/5% O₂ (hypoxic conditions) for 12h or 24h. After an exposure to one of these environments, genomic DNA was extracted and DNA methylation analysis was performed using Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina Inc.).

Among genes in which DNA methylation status was altered under the hypoxic conditions, SMYD5 and SMYD3 mRNA expression was reduced ($P < 0.01$) after 24h exposure to the $<$ 1% O₂ environment. This finding indicates that, in a case where the activity of SMYDs as a lysine methyltransferase is reduced under hypoxia, methylation status of lysine residues within histones may be down-regulated, and as a result, chromatin structure may change extensively.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯根膜細胞 低酸素暴露 DNAメチル化 DNA脱メチル化 ヒストンメチル化 サイトカイン ビーズアレイ CpG

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯を失う原因の一つとして外傷がある。外傷によって完全脱臼した歯の何割かは歯根の不可逆的な吸収によって最終的に脱落する。歯槽骨内に陥入した歯、あるいは過度の矯正力が加わった歯についても、同様に進行性の歯根吸収を生じることが知られている。このような歯根吸収は歯根膜組織の損傷の程度と関連があり、歯根膜に分布する毛細血管の損傷あるいは閉塞の範囲が広いほど組織への酸素供給は低下する。

低酸素環境に晒された場合、歯根膜細胞で硬組織吸収性サイトカイン産生がどのように変化するかについては、本研究計画に関連する成果として、C/EBP β および RANKL を含む遺伝子発現カスケードを見だし報告した(図1, Itoら, J Oral Sci 2018)。

しかしながら、低酸素環境がどのような分子機構を通じて歯根膜細胞のサイトカイン産生能を変化させるかについてまだ十分な知見が得られていない。また細胞周囲の酸素レベルが正常化したのち、低酸素暴露の影響が歯根膜細胞のエピゲノム内にどの程度残存するかについては全く不明である。

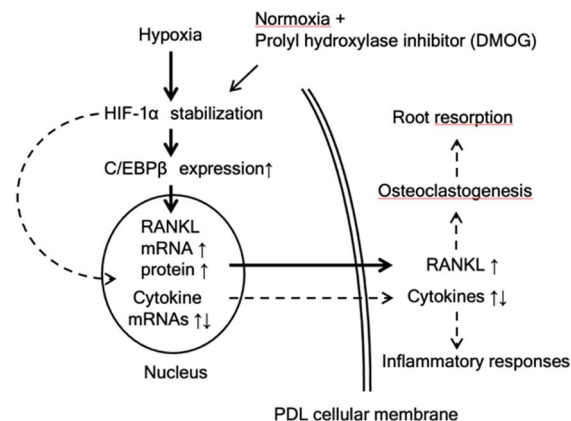


図1 低酸素暴露が歯根膜細胞のサイトカインカスケードの一つに及ぼす影響

2. 研究の目的

本研究は、低酸素環境への暴露が歯根膜細胞において特定の遺伝子プロモーター領域のメチル化の変化を惹起するかどうか、また、低酸素暴露による DNA メチル化の変化がどのような時間的経過をたどるかを明らかにする目的で計画した。一部の腫瘍細胞において、複数の遺伝子のプロモーター領域でメチル化状態が変化していることが明らかにされており、治療への応用を目的として DNA メチル化あるいはヒストン修飾の改変をターゲットにした薬物の研究が進められている。腫瘍細胞以外の細胞においても、低酸素などの強いストレス刺激が加わった場合に特定の遺伝子プロモーター上のメチル化レベルが変化することは十分に予想されることから、変化した DNA メチル化状態を部位特異的にリセットできる薬物あるいは方法が明らかになれば、脱落歯を保存あるいは再植するにあたってリセット操作を行うことで外傷歯治療の臨床成績の向上が期待できるほか、腫瘍細胞に対する薬物治療などにも応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) Step 1

ヒト乳歯歯根膜由来株化細胞 (SH9) を、5% CO₂, 37 °C, 100% humidity の条件下で 10% FBS を含む MEM にて継代培養し、必要な細胞数を確保したのち実験に供した。コントロール群ならびに低酸素に暴露する実験群各 6 プレートに相当する細胞数が得られるまで継代培養を繰り返した。

嫌気培養パック (アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学) を用いて、5% CO₂, 37 °C にて低酸素条件を O₂<1% とし、12, 24 時間のいずれかで暴露し培養した群、ならびに O₂ 濃度を可変できる CO₂ インキュベーターを用い、O₂ 濃度を 5% とし、12, 24 時間のいずれかで暴露し培養した群を準備した。さらに 24 時間低酸素暴露した群については、暴露終了直後から 1 週間または 4 週間、通常条件に戻して培養を継続した群も準備した。またコントロールとして、同一パッセージの細胞を通常条件下 (Room air + 5% CO₂, 37 °C) で同じ期間培養した群を準備した。

(2) Step 2

培養終了後、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA の抽出を行った。続いて RNase 処理を行い、吸光度測定、フルオロメーターによる 2 本鎖 DNA の蛍光定量、アガロースゲル電気泳動による品質確認ののち、EZ DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH 社) にて Bisulfite 変換を行った。精製、回収したゲノム DNA 500ng に対してアルカリ変性、酵素による全ゲノム増幅と断片化を行ったのち、Illumina 社の Infinium Methylation EPIC BeadChip とハイブリダイズさせた。アレイ上の各プローブはすべて 50 塩基の特異的配列としてビーズに結合しており、配列が一致した場合に試料由来 DNA 断片と結合する。

ハイブリダイゼーション後、BeadChip のプローブ末端に一塩基の標識ヌクレオチドを結合させたのち蛍光色素標識抗体を用いて染色を行い、iScan (Illumina 社) を用いて蛍光イメージを取得した。ソフトウェアとして iScan システムならびに iScan Control Software を使用した。取得した蛍光イメージデータについて Illumina 社の GenomeStudio/Methylation Module をインストールしたコンピュータにて解析を行った。

(3) Step 3

Step 1 の条件で培養した SH9 細胞から RNeasy Mini Kit(QIAGEN)にて total RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) にて逆転写したのち定量的 PCR 法により mRNA の発現量を測定した。測定の対象は、BeadChip による上記メチレーション解析にて $O_2 < 1\%$ での 12 時間あるいは 24 時間の低酸素暴露で明らかな脱メチル化を示した SMYD5 ならびにそのホモログである SMYD2 および SMYD3 とした。また β -actin を内在性コントロールとした。

すでに論文報告したとおり (Ito ら, 2018), SH9 細胞についての HIF-1 に着目した低酸素暴露実験で、 $O_2 < 1\%$ で 24 時間培養した場合に骨吸収性サイトカインである RANKL の mRNA ならびにタンパク量が増加し、その機序に転写因子 C/EBP の上昇が関わっていることが明らかになった。低酸素暴露に対する細胞の初期応答分子としては、HIF-1 がまず挙げられるが、本研究では免疫染色によって RANKL と HIF-1 の局在ならびに低酸素暴露の影響について調べ、続いて C/EBP と CREB の細胞内局在についても確認した。

4. 研究成果

(1) 低酸素暴露が SH9 細胞の DNA メチル化レベルに及ぼす影響

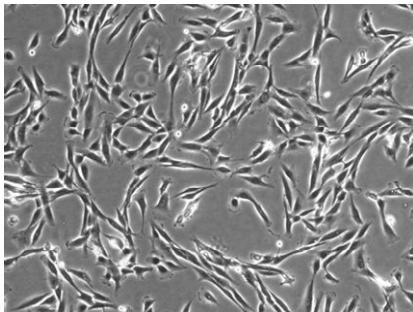
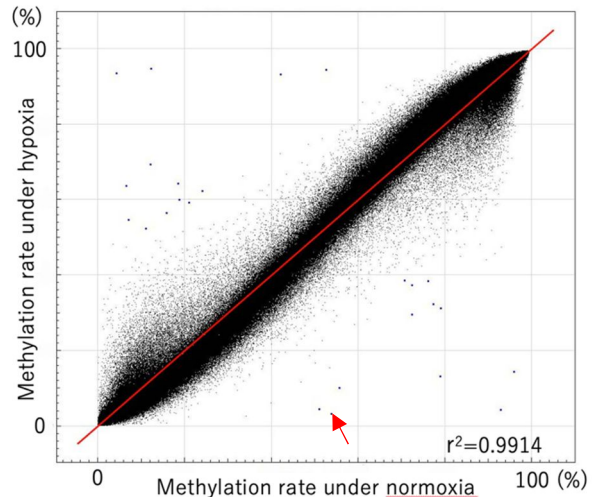


図2 低酸素暴露開始時の SH9 細胞

図3 (右図) 通常培養した細胞と $O_2 < 1\%$ で 24 時間培養した細胞でのメチル化頻度の比較。赤線は直線 $y=x$ を示す。



実験に用いた SH9 細胞はヒト乳歯歯根膜由来線維芽細胞で (図 2), *hTERT* 遺伝子を導入することで不死化されている (Hasegawa ら, Int J Mol Med 2010)。Step 1 に記載した手順で SH9 細胞を $O_2 < 1\%$ の低酸素環境あるいは通常環境で 24 時間培養し、Step 2 ならびに Step 3 に記載した方法で処理ならびに解析 (Scatter Plot) した結果の一部を図 3 に示す。

解析ソフトウェア GenomeStudio を使用し、通常培養した SH9 と低酸素暴露した SH9 から抽出した DNA について、メチル化サイトを含む配列 837,262 箇所でのメチル化頻度を調べ、これら 2 群間の相関について検討した。図 3 で X 軸は通常培養した SH9 でのメチル化頻度、Y 軸は低酸素暴露した SH9 のメチル化頻度を示しており、完全メチル化は 100%、完全非メチル化は 0% で表している。相関係数 r^2 は高い値を示しているが x 値と y 値の等価性はやや低下しており、低酸素暴露でメチル化頻度が変化したサイトが多数存在することを示している。

図 3 では $O_2 < 1\%$ で 24 時間培養した SH9 を通常培養したコントロールと比較したが、本研究では他に $O_2 < 1\%$ で 12 時間培養した群、また低酸素暴露後に通常環境に戻して培養を継続した群、さらに O_2 濃度を 5% とし、12 時間あるいは 24 時間培養した群についてもコントロールとの比較を行った。低酸素暴露の影響は、図 3 に示す $O_2 < 1\%$ で 24 時間培養した群がもっとも顕著であったが、他の群でも比較的少数の遺伝子について低酸素暴露によるメチル化頻度への影響が認められた。

(2) 低酸素暴露が SMYD2, SMYD3 および SMYD5 の mRNA 発現に及ぼす影響

SH9 を $O_2 < 1\%$ で 24 時間培養した場合に顕著な脱メチル化を示した配列 12 箇所について検索し、それらの配列をプロモーター領域を含む遺伝子のうち、炎症性応答に関与している分子を絞り込み SMYD5 (図 3 の赤矢印) を分析の対象にすることとした。

SMYD5 は SET and MYND domain-containing proteins (SMYD) ファミリーメンバーの 1 つで (Spellmon ら, Int J Mol Sci 2015), 炎症応答遺伝子のプロモーター領域に相当するヒストン H4 のテール上のリジン残基 H4K20 での trimethylation に関与することが報告されている (Stender ら, Mol Cell 2012)。本研究では、定量的 PCR 法により、SMYD5 とそのファミリーメンバーである SMYD2, SMYD3 についても合わせて mRNA 発現量を調べ、低酸素暴露群と通常培養群で比較した。

定量的 PCR 法により、SMYD5 ならびに SMYD3 は 24 時間の低酸素暴露によって mRNA 発現量が有意に抑制されることが明らかになった。この結果は、一般的な DNA 脱メチル化と遺伝子発現との関係性からみて逆方向の変化である。そこで Scatter Plot 上で確認したサイト（赤矢印）以外の SMYD5 遺伝子メチル化サイトも含め、計 22 箇所のサイトについて SMYD5 のメチル化レベル変化を調べたところ、低酸素暴露 24 時間において最も脱メチル化したサイトが 4 であったのに対し、12 時間で脱メチル化したのち 24 時間で初期レベルに戻ったサイトが 9 あり、SMYD5 の遺伝子脱メチル化は低酸素暴露後 12 時間のほうが顕著であることが示唆された。このような時間依存性のメチル化変動がどのように SMYD5 の mRNA 発現に関わっているかについて引き続き検討していく予定である。

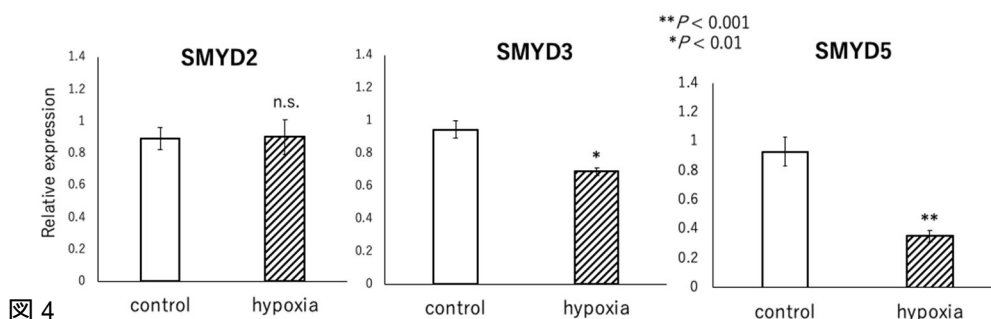


図 4

(3) SH9 細胞における RANKL, HIF-1, C/EBP ならびに CREB の局在

低酸素暴露 ($O_2 < 1\%$, 24 時間) した SH9 を対象に、免疫蛍光染色法にて RANKL, HIF-1 の局在を調べ、通常培養したコントロールと比較した。また、C/EBP, CREB の細胞内局在についても通常培養あるいは低酸素暴露した SH9 を試料として検討した。

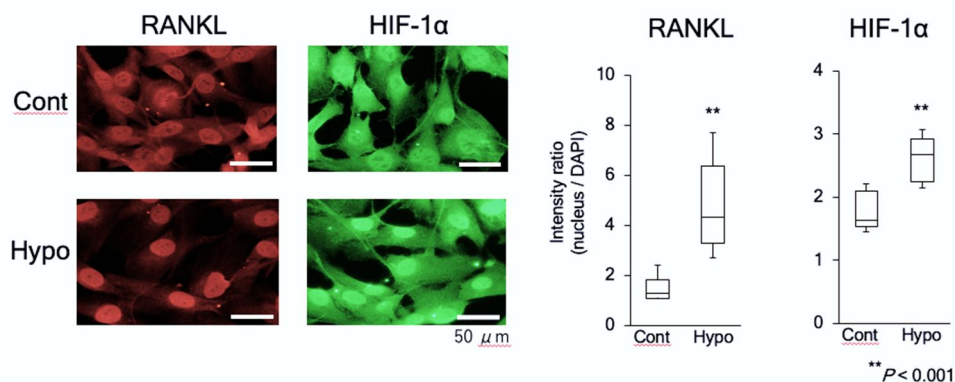


図 5 低酸素暴露により、SH9 細胞では細胞質に対して核内の RANKL および HIF-1 の発現強度の有意な上昇が認められた。

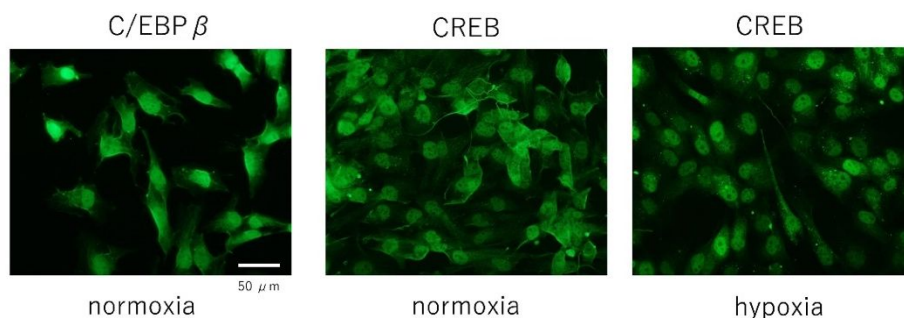


図 6 C/EBP, CREB とともに主として核内に局在を認めた。CREB については低酸素暴露した場合、細胞質に比べ核内の発現強度が上昇した可能性があり、RANKL ならびに HIF-1 を含む発現カスケードについての検討が必要と考えられた。

(4) 成果のまとめ

Illumina 社の Infinium MethylationEPIC BeadChip を用いた網羅的 DNA メチル化解析により、 $O_2 < 1\%$, 24 時間の低酸素暴露は SH9 細胞の DNA に広範囲な脱メチル化ならびにメチル化を生じさせることが明らかになった。また、まず着目した SMYD5 については低酸素暴露 12 時間で最も顕著な脱メチル化を生じており、低酸素暴露による DNA メチル化の変化には時間的要因が

大きく関与していることが考えられた。さらに、ヒストンのメチル基転移酵素である SMYD5 および SMYD3 の発現が低酸素暴露の影響を受けていたことから、ヒストンのメチル化修飾にも低酸素暴露の影響が及んでいることが示された。

<引用文献>

Ito H et al, Effect of hypoxia on the expression of CCAAT/enhancer-binding protein and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand in periodontal ligament cells, *J Oral Sci*, 60, 544-551, 2018

Hasegawa T et al, Establishment of immortalized human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth, *Int J Mol Med*, 26, 701-705, 2010

Spellmon et al, Structure and function of SET and MYND domain-containing proteins, *Int J Mol Sci*, 16, 1406-1428, 2015

Stender JD et al, Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20, *Mol Cell*, 48, 28-38, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ito Hisanori, Kifune Takashi, Ishiyama Misa, Iwasa Satoko, Takei Hiroki, Hasegawa Tomokazu, Asano Masatake, Shirakawa Tetsuo	4. 巻 60
2. 論文標題 Effect of hypoxia on the expression of CCAAT/enhancer-binding protein and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand in periodontal ligament cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 544 ~ 551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.17-0436	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 -

1. 著者名 Kifune Takashi, Ito Hisanori, Ishiyama Misa, Iwasa Satoko, Takei Hiroki, Hasegawa Tomokazu, Asano Masatake, Shirakawa Tetsuo	4. 巻 60
2. 論文標題 Hypoxia-induced upregulation of angiogenic factors in immortalized human periodontal ligament fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 519 ~ 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.17-0441	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ito Hisanori, Kifune Takashi, Ishiyama Misa, Iwasa Satoko, Takei Hiroki, Hasegawa Tomokazu, Asano Masatake, Shirakawa Tetsuo
2. 発表標題 Hypoxia-induced expression of CCAAT/enhancer-binding protein and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand in periodontal ligament cells
3. 学会等名 27th IAPD Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shirakawa Tetsuo, Kifune Takashi, Ito Hisanori, Ishiyama Misa, Iwasa Satoko, Takei Hiroki, Hasegawa Tomokazu, Asano Masatake
2. 発表標題 Upregulation of angiogenin and VEGF productions in immortalized human periodontal ligament fibroblasts exposed to hypoxia
3. 学会等名 27th IAPD Congress（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究協力者	石山 未紗 (ISHIYAMA Misa)		
研究協力者	伊藤 寿典 (ITO Hisanori)		
研究協力者	武井 浩樹 (TAKEI Hiroki)		
研究協力者	星 まなみ (HOSHI Manami)		
研究協力者	長谷 賢知 (HASE Kenchi)		
連携研究者	浅野 正岳 (ASANO Masatake) (10231896)	日本大学・歯学部・病理学講座・教授 (32665)	

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
---------	---------