

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10398

研究課題名（和文）異常なエピジェネティック制御機構が引き起こす口蓋裂発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cleft palate pathogenesis caused by abnormal epigenetic regulation

研究代表者

東堀 紀尚（Higashihori, Norihisa）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：50585221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、口蓋裂をはじめとする先天異常の発症にエピジェネティック制御機構が関与していると報告されている。本研究は、エピジェネティック制御機構の一つであるヒストンのメチル化に関与している酵素（SETDB1）の異常が口蓋発生にどのような影響を与えているかを検討することを目的とした。顎顔面領域の骨や軟骨へと分化する神経堤細胞由来の細胞に対し、Setdb1を特異的に欠失させたマウスを解析したところ、すべての胎仔に口蓋裂を認めた。細胞の増殖能の低下および口蓋発生に重要と考えられている遺伝子群の発現が低下が、口蓋裂発症の要因と示唆され、エピジェネティック制御機構が口蓋発生に重要である所見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇裂・口蓋裂は、高頻度（1/600人）にみられ、その治療には、矯正歯科医を始め、小児歯科医、口腔外科医、形成外科医、言語療法士など、様々な専門家による長期に渡る治療が必要であり、患者、またその両親の身体・精神・経済的負担は大きい。従って、分子生物学見地から口唇裂・口蓋裂の発生機序をより良く解明する事は、発症率および症状の軽減をはかり、患者の負担の軽減につながる。また、従来よりがんと先天異常は共通したシグナルを介することが多いとの報告からも、本研究から得られる知見は顎顔面領域の発生だけでなく、がん研究など他分野の研究にも応用が可能と考えられ、医学全体に多大な進歩をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, it has been reported that epigenetic regulations are involved in the pathogenesis of congenital abnormalities, including cleft palate. The purpose of this study was to investigate how an abnormality in an enzyme involved in histone methylation (SETDB1), one of the epigenetic regulation mechanisms, affects the development of the palate. When mice were analyzed in which Setdb1 was specifically deleted in cells derived from neural crest cells that differentiate into bone and cartilage in the maxillofacial region, all fetuses showed cleft palate. The reduced proliferative capacity of the cells and decreased expression of genes thought to be important in palatal development were suggested to be factors in the development of cleft palate, indicating that epigenetic regulations are important in palatal development.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂 先天異常 エピジェネティック ヒストンメチル化酵素 神経堤細胞

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂の多くは他に先天的な異常を持たない非症候性であり、その発症要因は遺伝的要因と環境的要因との相互作用であると考えられている。近年、がん化や代謝性疾患が、環境因子による刺激に対し細胞のエピゲノム情報が修飾され、本来生じることのない形質変化が起き、疾患が発症することがわかってきた。発生というダイナミックな形質変化が起こる生命現象では、エピジェネティックな変化が頻繁に起きているため、より一層環境因子の暴露によるエピゲノム情報に異常が生じやすく、口唇裂・口蓋裂といった先天的な問題が生じるのではないかと推察され、発生とエピジェネティックの関連を理解することは新たな先天異常発症メカニズムに解明につながる。

エピジェネティックな変化には、ヒストンの修飾が大きな役割を担っており、その仕組みは真核生物で高度に保存されている。ヒストン修飾には、アセチル化、メチル化、リン酸化などがあり、多岐に渡る修飾の組み合わせにより遺伝子発現のon/offだけでなく、その時間幅、強度といった微細な調整がなされ細胞の多様性を生み出している。近年、ヒストン修飾酵素の異常により先天性疾患が発症するとの報告がされており、ヒストンメチル化酵素であるMMSETやヒストン脱メチル化酵素であるPHF8の異常によって口唇口蓋裂が発症する事より、発生時においてヒストン修飾が重要な働きを示していることが推察される。

SETDB1はヒストンメチル化酵素の一つであり、ヒストン H3 の9番目のリジン残基をトリメチル化することにより、遺伝子発現を負に制御している。*Setdb1* コンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死であり、各組織での *Setdb1* の役割には不明な点が多い。これまでに我々は、神経堤細胞特異的に *Setdb1* をノックダウンさせた *Setdb1^{fl/fl};Wnt1-Cre⁺* (*Setdb1* CKO) マウスを作製し、メッケル軟骨における *Setdb1* の役割を報告した。メッケル軟骨は通常発生過程が進行するにつれ消失していくが、*Setdb1* CKO マウスでは軟骨細胞の肥大化を伴うメッケル軟骨の増大を認めた。*Setdb1* CKO マウスのメッケル軟骨の細胞では増殖能が増加しており、BMP シグナルおよび副腎皮質ホルモン受容体の増加による影響が示唆された。以上より、顎顔面領域において SETDB1 は重要な役割を担っていることが示唆された。

口唇裂・口蓋裂は遺伝的要因と環境的要因の相互作用によって発症する多因子疾患であり、顎顔面領域において最も頻度の高い先天異常疾患である。遺伝子改変マウスを用いた研究より、BMP, TGF β , FGF, SHH, Notch, WNT などのシグナル伝達経路に関わる遺伝子や、転写因子である *Pax9*, *Msx1/2*, *Tbx1*, *Tbx22* などの単一遺伝子変異によって口蓋裂が発症していることが報告されている。一方、一卵性双生児は同一遺伝子を有するにも関わらず口唇裂・口蓋裂の不一致を生じる場合があることから、口唇裂・口蓋裂の発症には遺伝子変異だけでなく、環境的要因によるエピジェネティックな変化が関与している可能性が考えられる。

申請者は、環境因子による異常なエピジェネティックな変化が口唇裂・口蓋裂をはじめとする先天異常疾患の発症に大きく関わっているのではないかとという「問い」に対し、ヒストン修飾酵素によるエピジェネティック制御機構がどのように顎顔面の発生を制御しているかの検討を続けている。

2. 研究の目的

口蓋における *Setdb1* を中心としたエピジェネティックな遺伝子制御メカニズムを明らかにし、口蓋裂の発症要因の解明、予防法の開発等の臨床応用への基盤となる研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) *Setdb1^{fl/fl};Wnt1-Cre⁺* (*Setdb1* CKO) マウスの作製
Wnt1-Cre マウスと *Setdb1^{fl/fl}* マウスを交配させ、Cre-LoxP システムを用い神経堤細胞特異的に *Setdb1* を欠失させたマウスを作製した。
- (2) 組織学的解析
胎生 13.5~15.5 日齢 (E13.5~E15.5)の胎仔を採取し、パラフィン組織切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。
- (3) BrdU 標識による細胞増殖能の解析
E14.5 の妊娠マウスに BrdU (100mg/kg) を腹腔内注射し、2 時間後に胎仔を採材した。口蓋間葉の 200 μ m \times 200 μ m のエリアおよび口蓋上皮で全細胞数と BrdU 陽性細胞数をカウントし、BrdU 陽性細胞の割合を求めた。
- (4) 細胞培養・siRNA による *Setdb1* のノックダウン
E13.5 の *Setdb1^{fl/fl};Wnt1-Cre⁺* マウスから口蓋間葉細胞を採取した。培養した後、6 ウェルプレートに細胞を播種し約 80% コンフルエントにした。遺伝子のノックダウンには口蓋間葉細胞内在性 *Setdb1* に対してあらかじめ設計された siRNA を用いた。
- (5) 定量的リアルタイム PCR
siRNA をトランスフェクション後 48 時間にて、RNA を抽出し、cDNA を合成後、定量的 RT-PCR (SYBR-Green 法) にて口蓋発生に重要な遺伝子群について発現量を検討した。各

遺伝子については標準曲線を作成し、相対的な遺伝子量を算出した。すべてのデータは、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* の発現量を指標とし、定量的な検討を行った。

(6) *In situ* hybridization

E13.5 の胎仔を採材し、厚さ 12 μ m の凍結切片を作製した。各遺伝子に対する Digoxigenin (DIG) 標識アンチセンス RNA プローブを生成し、60 $^{\circ}$ C でハイブリダイゼーションを行った。アルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体とインキュベートした後、ニトロブルーテトラゾリウム/プロモクロロインドリルリン酸(NBT/BCIP) を用いてシグナルを検出した。

(7) 免疫蛍光染色

リン酸化 SMAD1/5/9 を認識する抗体を用い、蛍光標識した抗ウサギ抗体を認識する二次抗体にて検出した。細胞核は DAPI にて染色した。

4. 研究成果

(1) *Setdb1* CKO マウスは口蓋裂をはじめ、様々な表現型を認めた (Fig.1)

Setdb1 CKO マウスは全個体(18/18)において口蓋裂を発症し、生後間もなく死亡した。E13.5 での *Setdb1* CKO マウスの冠状断は、コントロールマウスと比較して口蓋の形態に大きな差を認めなかったが、E14.5 および E15.5 の *Setdb1* CKO マウスでは口蓋裂を呈していた。また、歯胚や舌の低形成に加えメッケル軟骨の肥大化を認めた。

(2) *Setdb1* CKO マウスの口蓋間葉細胞の増殖能は低下した

Setdb1 CKO マウスでは、口蓋の間葉系細胞において BrdU 陽性細胞数が有意に減少し、増殖能の低下が観察された。

(3) 口蓋発生に重要な遺伝子群の発現様相 (Fig.2)

口蓋発生において重要な遺伝子群に対し SETDB1 が与える影響を検討するため、口蓋の間葉系細胞において siRNA を用いて *Setdb1* をノックダウンし、口蓋発生に重要な遺伝子群の mRNA 発現量を検証した。*Pax9* は 37%、*Wnt5a* は 62%、*Fgf10* は 75%、*Bmpr1a* は 32% と有意に減少した。さらに、*In situ* ハイブリダイゼーション法にて *Setdb1* CKO マウスの口蓋における mRNA の発現局在を検証したところ、*Bmp4*、*Fgf10*、*Pax9* は口蓋の前方から後方にかけての全域、*Wnt5a* は口蓋の前方、*Bmpr1a* は口蓋の後方において発現が減少した。

(4) *Setdb1* CKO マウスでは Smad 依存性 BMP シグナルが低下する

SMAD 依存性 BMP シグナルのマーカであるリン酸化 SMAD1/5/9 を認識する抗体にて免疫蛍光染色を行なったところ、コントロールマウスでは口蓋の前方から後方にかけてリン酸化 SMAD1/5/9 陽性細胞が認められたのに対し、*Setdb1* CKO マウスでは陽性細胞数の減少を認めた。

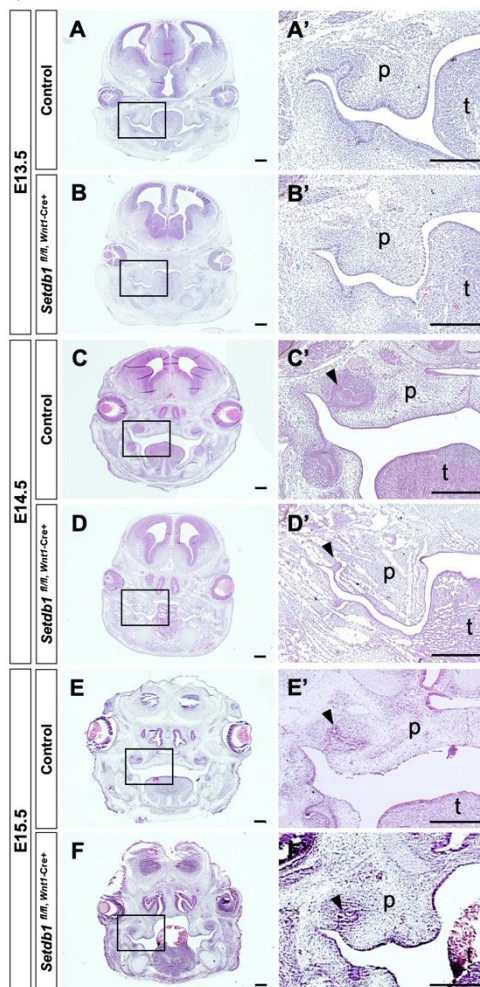


Fig 1. *Setdb1* *fl/fl*; *Wnt1-Cre*⁺ mice have fully penetrant cleft palate. Hematoxylin and eosin staining of control and *Setdb1* *fl/fl*; *Wnt1-Cre*⁺ mice heads at (A, B) embryonic day 13.5 (E13.5), (C, D) E14.5, (E, F) E15.5. Higher-magnification views are shown in panels A' to F' to illustrate that the palatal shelves exhibited no adherence to the opposing tissues. The arrowhead indicates the position of the tooth embryo. Key: p, palatal shelf; t, tongue. Scale bar = 200 μ m.

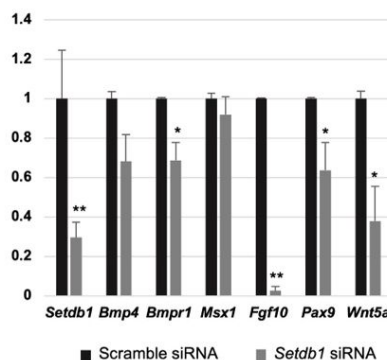


Fig 2. Gene expression in palatal mesenchymal cells of control mice with *Setdb1* knocked down by siRNA treatment. *Setdb1* siRNA was transfected into palatal mesenchymal cells of control mice. Quantitative PCR was performed using RNA extracted 48 h after transfection. Genes in the process of palatal development were assayed. Data is expressed as gene expression relative to that of *Gapdh*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

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 0件）

1. 著者名 Kano S, Higashihori N, Thiha P, Takechi M, Iseki S, Moriyama K	4. 巻 598
2. 論文標題 The role of the histone methyltransferase SET domain bifurcated 1 during palatal development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Thiha P, Higashihori N, KanoS, Moriyama K	4. 巻 131
2. 論文標題 Histone methyltransferase SET domain bifurcated 1 negatively regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor to control chondrocyte proliferation in Meckel's cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2021.105251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 狩野桜子、東堀紀尚、ピョティハ、武智正樹、井関祥子、森山啓司
2. 発表標題 口蓋の発生過程におけるヒストンメチル化酵素SETDB1の役割
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野桜子、東堀紀尚、森山啓司
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素 SETDB 1 が口蓋発生に与える影響
3. 学会等名 第46回 日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Thiha P, Higashihori N, Kano S, Moriyama K
2. 発表標題 Histone methyltransferase SETDB1 negatively regulates PTH/PTHrP receptor in chondrocytes
3. 学会等名 代68回国際歯科研究学会日本部会 [JADR] 総会・学術大会
4. 発表年 2020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