

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09897

研究課題名（和文）骨に必須のマスター遺伝子を制御する核内分子G9aの増殖・分化調節メカニズム

研究課題名（英文）Mechanism by which nuclear molecule G9a regulates master genes involved in cell proliferation and differentiation during osteogenesis

研究代表者

出野 尚（Ideno, Hisashi）

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：40435699

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）：本研究は核内分子G9aが細胞系譜特異的マスター遺伝子の機能を調節する仕組みを、骨代謝を担う細胞を用いて明らかにする事を目的とした。その結果、破骨細胞系譜において、G9aノックダウンおよびG9a欠損することで破骨細胞分化マスター遺伝子Nfatc1および増殖関連遺伝子の発現は変動せず、Nfatc1制御下のCathepsin K (Ctsk) の発現が亢進する事、Ctskプロモーター上へのNfatc1の集積が更新する事、G9aとNfatc1が直接結合しない事、が明らかになった。以上から、前駆破骨細胞分化過程にてG9aがNfatc1の機能を間接的に調節する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内分子G9aはH3K9のメチル化を介し、様々な核内タンパク質と相互作用する重要なエピジェネティック修飾因子である。本研究では、G9aがH3K9のメチル化とは異なる仕組みをもって破骨細胞系譜の重要な転写因子NFATC1の機能を調節することによって、破骨細胞形成に抑制的にはたらく新しい可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to understand how the nuclear molecule G9a influences the function of specific cell lineage master genes in cells related to bone metabolism. The results showed that knocking down G9a and its loss in the osteoclast lineage did not change the expression of the osteoclast differentiation master gene Nfatc1 and proliferation-related genes. However, it did enhance the expression of Nfatc1-regulated Cathepsin K (Ctsk), resulting in renewed Nfatc1 accumulation on the Ctsk promoter. Additionally, it was observed that G9a and Nfatc1 do not bind directly. These findings suggest that G9a may indirectly regulate Nfatc1 function during progenitor osteoclast differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：破骨細胞 Nfatc1 骨芽細胞 Runx2 G9a

1. 研究開始当初の背景

細胞分化に必須で、しかもそれが発現する事で細胞分化を正に進める事ができる指令スイッチとして機能する転写因子をマスター遺伝子と呼ぶ。細胞の増殖と分化は密接に関わる事から、マスター遺伝子は分化のみならず増殖にも関わると考えられている。例えば、筋細胞では MyoD1 が細胞周期抑制因子と協調的に働き増殖抑制し、一方で筋特異的遺伝子を活性化する事で、分化促進の機能を持つ事が知られている。どのマスター遺伝子も増殖抑制・分化促進という負・正の機能を持つかという事そう単純ではない。骨芽細胞分化のマスター遺伝子 Runx2 は、分化促進に働くが、増殖においても FGF 経路を介して正に働く。また、破骨細胞分化のマスター遺伝子 Nfatc1 は、増殖抑制・分化促進という機能を持つ。この細胞系譜特異的マスター遺伝子の増殖における機能の違いは、協調して働く核内分子の種類あるいは機能の違いによると考えられるが、詳細は明らかではない。我々がこれまで取り組んできた核内分子 G9a は、元来ヒストン H3K9 を基質とするメチル化修飾酵素をコードする核内分子として発見されたが、マスター遺伝子を含む多くの転写因子に影響する重要な分子である事が、我々も含む複数から報告されている (ECR2017, JBC2013, PNAS2012)。我々は、G9a がマスター遺伝子 Runx2、Nfatc1 と共役するが、機能制御の仕方が異なるという予備的検討結果を得た。すなわち G9a は Runx2 と結合しその作用を正に制御する可能性がある (ASCB2017)。このような基礎的データから、G9a は両マスター遺伝子と共役するが、その機能調節のメカニズムが異なり、増殖におけるマスター遺伝子の機能の違いにつながるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞分化過程のマスター遺伝子 Runx2 と破骨細胞分化のマスター遺伝子 Nfatc1 に共通の共役分子として核内分子 G9a が存在する事、さらに各々のマスター遺伝子による増殖と分化の制御に G9a が関わる事を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

【実験 1】破骨細胞を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を進めるための実験条件の検討 1

ChIP 解析を進めるためには、ある程度のクロマチン量が必要である。一方で、破骨細胞の分化は培養面積によって効率が異なるとの見解があり、クロマチン量を多く得られ、分化効率の良い条件の検討が必要であった。

初代骨髄由来マクロファージ (BMMs) を MCSF+RANKL にて分化誘導し、マウスマクロファージ系細胞株 RAW 細胞を RANKL にて分化誘導し、各々 48 ウェルプレート、24 ウェルプレート、12 ウェルプレート、6 ウェルプレート、6cm ディッシュ、10cm ディッシュで破骨細胞を作成し TRAP 染色をおこなった。

【実験 2】抗 Nfatc1 抗体を用いた ChIP 解析を進めるための実験条件の検討 2

抗 Nfatc1 抗体 (sc-7294, Santa Cruz) を用いた ChIP 解析の予備検討では、得られる DNA 断片が非常に少ない事が分かっており、DNA 断片の収量を増やす条件の検討が必要であった。

Nfatc1 発現ベクターを 293 細胞へ transfection してクロマチンを回収した。そのクロマチンと抗 Nfatc1 抗体を用いて 1.5mL チューブ、0.5mL チューブにて抗体 クロマチン複合体の形成をおこない、得られる Nfatc1 の量を比較検討した。

【実験 3】Nfatc1 と G9a による複合体形成の解析

骨芽細胞分化のマスター遺伝子 Runx2 と G9a の結合は認めていたが (Bone2020) Nfatc1 と G9a の結合は不明だった。Nfatc1 発現ベクター、G9a 発現ベクターを 293 細胞へ co-transfection して、抗 Nfatc1 抗体および抗 G9a 抗体を使った共免疫沈降法 (co-IP) 解析をおこなった。

【実験 4】G9a の機能阻害化合物の処理による骨芽細胞分化の解析

G9a^{fllox/fllox} マウスの作出が順調に進まない時期があり G9a^{fllox/fllox} 初代培養細胞の代替として、G9a のメチル化酵素機能の阻害化合物 (BIX-01294, UNC0638, UNC0642) の利用を検討した。G9a のメチル化酵素機能阻害化合物を処理した骨芽細胞分化能をもつ複数の細胞株をアスコルビン酸 (AA) + グリセルリン酸 (-GP) にて骨芽細胞分化を誘導した。誘導後 7 日で RNA とタンパク質を回収し、骨芽細胞分化のマーカー遺伝子発現と H3K9me2 修飾レベルの解析をおこなった。

【実験 5】G9a の機能阻害化合物の処理による破骨細胞分化の解析

G9a のメチル化酵素機能の阻害化合物 (BIX-01294, UNC0638, UNC0642) を処理した BMMs を MCSF+RANKL にて破骨細胞分化を誘導した。誘導後 3 日でタンパク質を回収し H3K9me2 修飾レベルの解析と TRAP 染色をおこなった。

【実験 6】siRNA を用いて G9a をノックダウンした RAW 細胞から分化した破骨細胞の解析

G9a のメチル化酵素機能の阻害化合物の処理した破骨細胞では予備検討と異なる結果となったため、si-G9a または si-Negative control (si-nega) を導入した RAW 細胞を RANKL にて分化誘導し破骨細胞を作成した。誘導後 3 日でタンパク質を回収し H3K9me2 修飾レベルの解析と TRAP 染色をおこなった。

【実験 7】 siRNA を用いて G9a をノックダウンした BMMs から分化した破骨細胞の解析

siRNA を用いたノックダウンに RAW 細胞が不向きであったため、si-G9a または si-Negative control を導入した BMMs を MCSF+RANKL にて分化誘導し破骨細胞を作成した。誘導後 2 日で RNA およびクロマチンを回収し、RNA-seq 解析、抗 Nfatc1 抗体を用いた ChIP-PCR、抗 H3K9me2 抗体を用いた ChIP-seq 解析をおこなった。また、誘導後 3 日でタンパク質を回収し H3K9me2 修飾レベルの解析と TRAP 染色をおこなった。

4. 研究成果

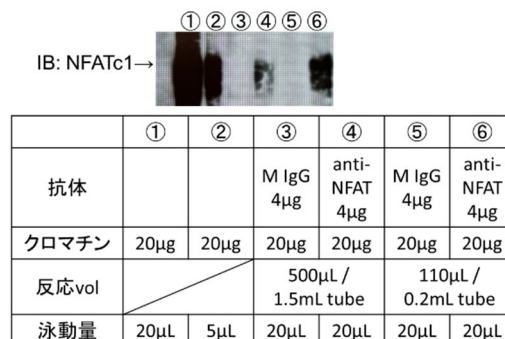
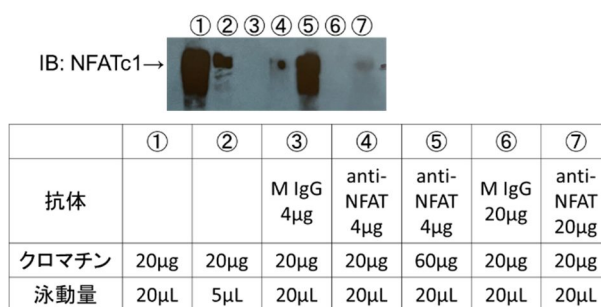
【実験 1】

様々な培養面積で破骨細胞分化をおこなったところ、6cm ディッシュ、10cm ディッシュでは、TRAP 陽性細胞の多核細胞の出現がディッシュ内でもバラつきが認められた。均一に効率よく TRAP 陽性細胞の多核細胞が観察されたのは 48 ウェルプレート、24 ウェルプレート、12 ウェルプレート、6 ウェルプレートであった。

【実験 2】

抗体 クロマチンの複合体形成には、クロマチン、抗 Nfatc1 抗体、Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG、を用いておこなった。各条件で抗体 クロマチン複合体を作成し、ウエスタンブロットのバンドにて Nfatc1 が含まれる量を比較した。その結果、抗体量を増やすよりも、反応に持ち込むクロマチン量の増量が効果的であった。さらに、抗体 クロマチン複合体を作成する反応系を 1.5mL チューブにて 500 μ L から 0.2mL チューブにて 110 μ L とスケールダウンが効果的であった。

以上の結果から、抗 Nfatc1 抗体を用いた ChIP は 0.5mL チューブにて 250 μ L を反応系の基本とした。



【実験 3】

Nfatc1 と G9a を co-transfection した 293 細胞から抽出した細胞質ならびに核内タンパク質画分に対して、抗 Nfatc1 抗体による cp-IP および 抗 G9a 抗体による co-IP で得たタンパク質複合体を SDS-PAGE にて解析した。得たタンパク質複合体には G9a が、得たタンパク質複合体には Nfatc1 が認められなかった。このことから、Nfatc1 と G9a は近接し直接的な複合体を形成していない事が示唆された。

【実験 4】

G9a のメチル化酵素機能の阻害化合物 (BIX-01294、UNC0638、UNC0642) を処理した MC3T3-E1 細胞、10T1/2 細胞から抽出したタンパク質を用いてウエスタンブロットで H3K9me2 レベルを調べたところ、阻害化合物で処理したにもかかわらず減少が認められなかった。阻害化合物をがん細胞、ES 細胞に使った先行論文では H3K9me2 レベルが顕著に減少しており、細胞種によって G9a 機能阻害効果に差がある事を見出した。

【実験 5】

我々の予備検討では、予備検討では、G9a^{flox/flox} BMMs に Cre 発現アデノウイルス (Ad/Cre) を感染させた G9a 欠損によって H3K9me2 レベルが減少し TRAP 染色陽性の多核細胞数が増加していた。G9a のメチル化酵素機能の阻害化合物 (BIX-01294、UNC0638、UNC0642) を処理した BMMs から MCSF+RANKL にて分化誘導した破骨細胞から抽出したタンパク質を用いてウエスタンブロットで H3K9me2 レベルを調べたところ、阻害化合物の処理によって減少が認められた。また、TRAP 染色陽性の多核細胞数が減少した。この結果は、予備検討で我々が想定した結果とは異なるものであった。

【実験6】

si-G9a または si-nega を導入した RAW 細胞から RANKL にて分化誘導した破骨細胞から抽出したタンパク質を用いてウエスタンブロットで H3K9me2 レベルを調べたところ、G9a ノックダウンによって減少が認められた。また、TRAP 染色陽性の多核細胞数が減少した。この結果は、予備検討で我々が想定した結果とは異なるものであった。詳細に観察したところ、si-nega を導入した RAW 細胞、さらには siRNA の transfection 試薬 (jetPRIME、PolyPlus-transfection SAS) のみを処理した RAW 細胞でも TRAP 染色陽性の多核細胞数が減少していた。

【実験7】

si-G9a または si-nega を導入した BMMs から MCSF+RANKL にて分化誘導した破骨細胞から抽出したタンパク質を用いてウエスタンブロットで H3K9me2 レベルを調べたところ、G9a ノックダウンによって減少が認められた。また、TRAP 染色陽性の多核細胞数が増加した。この結果は、予備検討で我々が想定した結果と同じものであった。RNA-seq 解析では G9a ノックダウンによって、G9a の発現は約 3 分の 1 に抑えられており、Nfatc1 の発現は変わらなかった。Nfatc1 の制御下にある Cathepsin K (CtsK) の発現が亢進していた。増殖に関連する遺伝子群の発現は分からなかった。また、抗 Nfatc1 抗体を用いた ChIP-PCR では、G9a ノックダウンによって CtsK プロモーターへの Nfatc1 の集積が亢進した。抗 H3K9me2 抗体を用いた ChIP-seq は G9a の発現抑制の低さが影響して、有意な変化を見出すには至っていない。

これらの結果をまとめると、核内分子 G9a は、破骨細胞前駆細胞の増殖には影響せず、分化のステップでマスター遺伝子 Nfatc1 の機能を間接的に分化を抑制する調節因子である可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koichiro Komatsu, Hisashi Ideno, Kazuhisa Nakashima, Nobuyuki Udagawa, Yasuhiro Kobayashi, Hiroshi Kimura, Makoto Tachibana, Teruhito Yamashita, Akira Nifuji	4. 巻 -
2. 論文標題 The G9a histone methyltransferase represses osteoclastogenesis and bone resorption by regulating NFATc1 function	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ideno Hisashi, Nakashima Kazuhisa, Komatsu Koichiro, Kimura Hiroshi, Shinkai Yoichi, Tachibana Makoto, Nifuji Akira	4. 巻 66
2. 論文標題 Epigenetic modifier G9a is involved in regulation of mouse tongue development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 35～40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2023.12.007	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 Komatsu Koichiro, Ideno Hisashi, Shibata Tatsuya, Nakashima Kazuhisa, Nifuji Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Platelet-derived growth factor-BB regenerates functional periodontal ligament in the tooth replantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06865-6	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 0件）

1. 発表者名 小松浩一郎, 出野 尚, 中島和久, 小林泰浩, 宇田川信之, 山下照仁, 二藤 彰
2. 発表標題 エピジェネティック制御因子G9aによる破骨細胞分化・機能制御
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出野 尚、和田 悟史、中島 和久、小松 浩一郎、二藤 彰
2. 発表標題 G9a regulates mouse tongue development
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	二藤 彰 (Nifuji Akira) (00240747)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究分担者	小松 浩一郎 (Komatsu Koichiro) (60153665)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	
研究分担者	中島 和久 (Nakashima Kazuhisa) (90252692)	鶴見大学・歯学部・准教授 (32710)	

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