

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17223

研究課題名（和文）TNF-による破骨細胞分化および歯の移動時のエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the epigenetics regulation mechanism during osteoclast differentiation and orthodontic tooth movement by TNF- α

研究代表者

野口 隆弘 (Noguchi, Takahiro)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20907430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、TNF-による破骨細胞分化におけるSET7/9の役割と分子機構を明らかにすることを目的として解析を行った。その結果、TNF-により亢進する破骨細胞前駆細胞上のRANK発現にNF- β およびSET7/9が関与することが明らかになった。また、NF- β とSET7/9は、TNF-、RANKLの相乗作用による破骨細胞形成に関与していることが示唆された。さらに、SET7/9はNF- β のサブユニットであるp65と相互作用し、TNF-によりその複合体は核内に移行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

国内外の破骨細胞形成のエピジェネティクス制御に関する研究は未だ少なく、特にTNF-が関与する破骨細胞形成に対するヒストン修飾酵素の影響についての報告は皆無である。本研究において、ヒストン修飾酵素SET7/9は破骨細胞前駆細胞に発現し、NF- β と相互作用し、TNF-で亢進するRANK発現に影響していることが推測された。病的骨疾患に対するヒストン修飾酵素阻害薬としてSET7/9が重要なターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the role and molecular mechanism of SET7/9 in TNF- α -induced osteoclast differentiation. The results revealed that NF- β and SET7/9 is involved in RANK expression on osteoclast precursor, which is upregulated by TNF- α . The results also suggest that NF- β and SET7/9 are involved in osteoclastogenesis through the synergistic effects of TNF- α and RANKL. Furthermore, it was suggested that SET7/9 interacts with p65, a subunit of NF- β , and that the complex may be translocated into the nucleus by TNF- α .

研究分野：矯正歯科

キーワード：破骨細胞 矯正学的歯の移動

z 様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リウマチや感染などによる病的骨吸収を伴う疾患において、TNF- α の関与する破骨細胞形成を阻害する特異性を発揮出来る創薬の開発が望まれている。近年では抗 TNF- α 抗体がリウマチ性関節炎の治療に使用されているが、TNF- α の機能である免疫促進作用も抑制されるので、より高い特異性を有する薬剤の開発が望まれている。そこで免疫細胞ではなく破骨細胞前駆細胞に特異的に TNF- α の作用を抑制できる薬剤の開発を目的にしている。また、高い特異性を得るのに細胞特異的な転写制御機構に着目している。近年、ヒストン修飾酵素などの阻害剤が、様々な疾患に有効であることが報告されてきている。生体における遺伝子発現の制御には、エピジェネティクスな要素が大きな役割をはたしている。ヒストン H3 リジン 4 のメチル化 (H3K4me) は遺伝子発現の活性化に、ヒストン H3 リジン 27 のメチル化 (H3K27me) は抑制に関与することが知られている。これらのことから核内のエピジェネティクスの制御を目的とした創薬の開発は有効であると考えられる。

近年、RANKL による破骨細胞形成のエピジェネティクスな制御機構の報告が出てきた (Yasui et al. 2011 J Bone Miner Res)。また、RANKL による破骨細胞形成においてヒストンメチル化を制御する新たな分子として Protocadherin-7 (Pcdh7) が同定され、RANKL による破骨細胞形成はエピジェネティクスな制御機構があるという報告が出てきた (Nakamura et al. BBRC. 2014)。しかしながら、TNF- α による破骨細胞形成のエピジェネティクスな制御機構については未だ明らかにされていない。また、TNF- α は矯正学的歯の移動にも重要な役割を果たすことが知られている (Kitaura et al. J Dent Res. 2008) が、その詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

破骨細胞形成の際に RANKL と TNF- α が相乗的に作用することが報告されている (Lam et al. J Clin Invest. 2000)。また、TNF- α は免疫反応で重要な転写因子 NF- κ B を活性化させることで RANK 発現を促進することが知られている (Noguchi et al. Arch Oral Biol. 2020)。一方、単球を TNF- α で刺激した際に、NF- κ B はヒストンメチル化酵素である SET7/9 と結合して核内に移行し、ヒストン H3K4 のメチル化を起こすことでヘテロクロマチンからユークロマチンへの移行を促し、炎症に関連する遺伝子の転写の活性化を行っていることが報告されている (Li et al. J Biol Chem. 2008)。また、脾細胞においても TNF- α を含むサイトカイン刺激により NF- κ B と SET7/9 の複合体が核内に移行することで iNOS の発現および脾島の炎症に関与しているという報告も出てきた (Fujimaki et al, J Biol Chem. 2015)。そこで、本研究では SET7/9 によるヒストン修飾に注目し、TNF- α による破骨細胞分化および矯正学的歯の移動への影響を解明する。

2. 研究の目的

現在まで様々なヒストンメチル化酵素が同定されているが、今回代表者は炎症性サイトカインとの関連についていくつか報告されているヒストン H3K4 のメチル化酵素 SET7/9 について着目した。これまで SET7/9 は癌や糖尿病等の疾患の制御について重要であると考えられてきた (Ogihara et al. Islets. 2009) (Batista et al. Signal Transduct Target Ther. 2018) が、炎症性サイトカインの刺激により SET7/9 の働きを介して炎症関連遺伝子の発現を促進するという報告を考慮すると、この SET7/9 は同じく炎症性サイトカインの影響を大きく受ける破骨細胞形成にも重要な役割を果たすことが予想される。破骨細胞分化や矯正学的歯の移動における SET7/9 の影響を明らかにした報告は皆無であり、これらの関連を調べることは重要である。本研究では、TNF- α により亢進する破骨細胞前駆細胞の RANK 発現に対して SET7/9 が及ぼす影響や細胞内での動態を解析することを目的とする。また、矯正学的歯の移動時の骨リモデリング現象の分子生物学的機序をエピジェネティクス制御の視点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

破骨細胞前駆細胞への TNF- α 刺激時の NF- κ B 活性阻害による RANK 遺伝子への影響の解明

マウス (Wild type、C57BL6/J、8 週齢雄) の大腿骨および脛骨より骨髓細胞を採取し、骨髓細胞を M-CSF を加え 3 日間培養し、付着細胞を破骨細胞前駆細胞として集める。培地から M-CSF を除いて serum-free medium で培養後、TNF- α および NF- κ B 阻害剤 Bay11-7082 を加え、real-time PCR にて RANK mRNA 量を定量、解析する。

破骨細胞前駆細胞に対する TNF- α 刺激時の SET7/9 の RANK 遺伝子発現への影響の解明

SET7/9 の RANK 遺伝子発現への影響を調べるため、SET7/9 Silencer Select siRNA (thermoFisher) を用いて、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (thermoFisher) により破骨細胞前駆細胞へトランスフェクションを行い、SET7/9 のノックダウンの後 TNF- α を作用させリアルタイム PCR にて RANK mRNA 量を定量、解析する。

SET7/9 が破骨細胞形成へ及ぼす影響の解明

破骨細胞前駆細胞に siRNA による SET7/9 のノックダウンを行った後、TNF- α による前処置を行う。培地を PBS で洗浄後に、前処置を行った破骨細胞前駆細胞に M-CSF および RANKL を加え

て4日間培養し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP 染色) により TNF- α の前処置により亢進される RANKL 誘導性破骨細胞形成への影響を解析する。

NF- κ B および SET7/9 のタンパク質間相互結合の解明 (近接ライゲーションアッセイ)

NF- κ B のサブユニットである p65 と SET7/9 のタンパク質間相互作用は Duolink In Situ PLA system (Sigma) を用いて解析する。培養した破骨細胞前駆細胞を固定・透過処理し、ブロッキング後、抗 p65 抗体および抗 SET7/9 抗体で処理する。次に、PLA プローブ溶液で処理した後、ライゲーションリガーゼ溶液、ポリメラーゼ溶液の順で処理する。DAPI を加えた後、蛍光顕微鏡 (BX-800, KEYENCE) にて蛍光 PLA シグナルを検出する。

4. 研究成果

破骨細胞前駆細胞における NF- κ B および SET7/9 が RANK 発現に及ぼす影響について

TNF- α により促進される RANK 発現は NF- κ B 阻害剤により抑制された。また、破骨細胞前駆細胞において、off-target 効果を回避するため2種類の siRNA を用いてトランスフェクションを行ったが、ともに SET7/9 の発現が抑制され、ノックダウン効果を確認した。TNF- α により促進される RANK 発現は、2種類の siRNA を用いた SET7/9 のノックダウンそれぞれで抑制された。

SET7/9 が破骨細胞形成へ及ぼす影響について

TNF- α の前処置により RANKL 誘導性破骨細胞形成は増加したが、これは SET7/9 のノックダウンにより抑制された。以上より NF- κ B および SET7/9 は、TNF- α により促進する破骨細胞前駆細胞の RANK 発現および TNF- α 、RANKL の相乗作用による破骨細胞形成に関与していることが推測される。

p65 と SET7/9 の相互作用について

近接ライゲーションアッセイの結果、破骨細胞前駆細胞内において主に細胞質に P65-SET7/9 複合体シグナルが認められた。また、TNF- α 刺激により複合体シグナルの核内への移行を認めるものがあつた。以上より SET7/9 と NF- κ B はタンパク質間相互作用し、TNF- α によりその複合体は核内へ移行することが推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ma Jinghan, Kitaura Hideki, Ogawa Saika, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Pramusita Adya, Kinjo Ria, Kanou Kayoko, Kishikawa Akiko, Ichimura Atsuhiko, Mizoguchi Itaru	4. 巻 13
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid inhibits TNF- α -induced osteoclast formation and orthodontic tooth movement through GPR120	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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） 10.3389/fimmu.2022.929690	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 Ito Arata, Kitaura Hideki, Noguchi Takahiro, Ohori Fumitoshi, Mizoguchi Itaru	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of Coating Loss from Coated Stainless Steel Orthodontic Wire	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 9497 ~ 9497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12199497	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 Noguchi Takahiro, Kitaura Hideki, Marahleh Aseel, Agista Afifah Zahra, Ohsaki Yusuke, Shirakawa Hitoshi, Mizoguchi Itaru	4. 巻 15
2. 論文標題 Fermented Rice Bran Supplementation Inhibits LPS-Induced Osteoclast Formation and Bone Resorption in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3044 ~ 3044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu15133044	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 Yamamoto Yu, Fujihara Chiharu, Nantakeeratipat Teerachate, Matsumoto Masahiro, Noguchi Takahiro, Kitagawa Masae, Yamada Satoru, Takata Takashi, Kitaura Hideki, Murakami Shinya	4. 巻 58
2. 論文標題 <sc>CD40 CD40</sc> ligand interaction between periodontal ligament cells and cementoblasts enhances periodontal tissue remodeling in response to mechanical stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.13182	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 Fan Ziqiu, Kitaura Hideki, Ren Jiayi, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Ma Jinghan, Kanou Kayoko, Miura Mariko, Narita Kohei, Lin Angyi, Mizoguchi Itaru	4. 巻 14
2. 論文標題 Azilsartan inhibits inflammation-triggered bone resorption and osteoclastogenesis in vivo via suppression of TNF- expression in macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	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) 10.3389/fendo.2023.1207502	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 Kanou Kayoko, Kitaura Hideki, Noguchi Takahiro, Ohori Fumitoshi, Marahleh Aseel, Kinjo Ria, Ma Jinghan, Ren Jiayi, Ogasawara Kouetsu, Mizoguchi Itaru	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of age on orthodontic tooth movement in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 828 ~ 836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2023.09.016	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 Ma Jinghan, Kitaura Hideki, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Kinjo Ria, Kanou Kayoko, Ren Jiayi, Miura Mariko, Narita Kohei, Mizoguchi Itaru	4. 巻 24
2. 論文標題 Generating Bone Marrow Chimeric Mouse Using GPR120 Deficient Mouse for the Study of DHA Inhibitory Effect on Osteoclast Formation and Bone Resorption	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17000 ~ 17000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242317000	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野口隆弘、北浦英樹、大堀文俊、Marahleh Aseel、Ma Jinghan、加納佳与子、三浦まり子、成田昂平、溝口到
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素SET7/9が破骨細胞分化に及ぼす影響について
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------