

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593104

研究課題名(和文)食品成分誘導エピジェネティック制御による歯周炎予防法の開発

研究課題名(英文)Development of periodontitis-preventive methods using epigenetically controlling food ingredient

研究代表者

津田 啓方(TSUDA, Hiromasa)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60325470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック調節による破骨細胞分化抑制法を開発する目的で、H3K9メチルトランスフェラーゼG9aおよびSuv39h1の特異的阻害剤であるBIX01294とchaetocinが破骨細胞分化に及ぼす影響を調べた。両阻害剤はRANKL刺激により誘導される破骨細胞分化を濃度依存的に抑制した。また、両阻害剤は破骨細胞分化抑制遺伝子の発現を濃度依存的に増加させた。しかしながら、siRNAによる実験でBIX01294の分化抑制効果はG9aの抑制効果ではないことが解った。また、chaetocinによる分化抑制は分化抑制因子の発現抑制に関わるblimp1の発現を抑制することにより起こる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To establish preventive methods against periodontitis-derived bone resorption, we first examine the effects of BIX01294 and chaetocin, which are inhibitors of H3K9 methyltransferase, on RANKL-induced osteoclast differentiation. Both inhibitors dose-dependently inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation of preosteoclast-like Raw264.7 cells. BIX01294 and chaetocin rescues RANKL-induced downregulation of osteoclast-differentiation-inhibitory gene expressions in a dose-dependent manner. However, siRNA for G9a did not inhibit RANKL-induced osteoclast differentiation, suggesting that the effects of BIX01294 on osteoclast differentiation are not derived from G9a inhibition. In addition, chaetocin dose dependently inhibited RANKL-induced downregulation of blimp1 expression, which is reportedly inhibits osteoclast differentiation inhibitory genes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エピジェネティクス 骨吸収 歯周炎 予防法

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は自覚症状の現れた時には歯を支える歯槽骨の高度かつ不可逆的破壊が起こる病気であり、日本国民の約3分の1が高度な歯槽骨破壊を伴う歯周炎に罹患している。歯槽骨破壊の起こった歯では歯垢除去困難になるため、病態の進行と治療後の再発が起こりやすくなる。よって、歯槽骨破壊の抑制が歯の寿命を決定する最も重要な因子の一つであると考えられ、歯周炎による歯槽骨破壊の抑制法の開発が望まれる。

アセチル化やメチル化等のヒストンの翻訳後修飾は、細胞分化調節を始め様々な遺伝子のエピジェネティックな転写調節に関与している。破骨細胞分化におけるエピジェネティック調節に関しては、ヒストンアセチル化が破骨細胞分化調節に関わっている事を示唆する報告があり、また、ヒストンメチル化に影響を及ぼす因子である G9a の阻害剤である BIX01294 が RANKL 誘導による破骨細胞形成を抑制する事象を我々はすでに発見していた (2009-2010 科研費補助金成果)。しかしながら、それらの作用メカニズムは不明であった。

さらに、食品に含まれる成分の中にはこれらヒストンの翻訳後修飾に影響する成分も存在する。

### 2. 研究の目的

上記の背景から、破骨細胞分化もエピジェネティックな転写調節を受けており、それを食品成分等の摂取や塗布によりコントロール出来れば良いのではないかと考えた。そこで、第1の目的として、エピジェネティックな破骨細胞分化制御の分子機構の解明を試みることにした。また、エピジェネティックな転写調節に関与すると報告されている食品中に含まれる成分の中で破骨細胞分化を抑制するものを探索する事を第2の目的とした。これらの目的の達成により、食品成分誘導エピジェネティック制御による歯周炎予防法の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

まずは、どのようなエピジェネティック制御が破骨細胞分化に影響を及ぼすかを調べた。マウス、マクロファージ様 Raw264.7 細胞にリコンビナント RANKL を作用させ、破骨細胞分化を誘導させる系を構築し、そこにヒストン修飾に影響を及ぼす分子の阻害剤を作用させ、破骨細胞分化を酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性染色法で評価した。また、破骨細胞分化マーカーとなる、炭酸脱水酵素、カテプシン K、及び、マスター転写因子の NFATc1 のタンパク質産生量をウエスタンブロットにより半定量した。その間の細胞増殖を SYTOX-green を用いた細胞増殖アッセイにより調べた。ついで、阻害剤の代わりに siRNA を用いて、同様の実験を試みた。

次に、破骨細胞分化を抑制した阻害剤が破

骨細胞分化を抑制したメカニズムを調べるために、まず、破骨細胞分化抑制遺伝子として報告されているものを文献情報から抽出し、それらの発現量をリアルタイム RT-PCR 法により調べた。

### 4. 研究成果

マウスマクロファージ様 Raw264.7 細胞にリコンビナント RANKL とヒストン修飾の調節に関わる分子の阻害剤を作用させ、その条件下での破骨細胞分化を調べたところ、ヒストン H3 の Lys9 (H3K9) メチル化に関与する分子である G9a および Suv39h1 の特異的阻害剤と報告されている BIX01294 および chaetocin が RANKL 誘導破骨細胞分化を濃度依存的に抑制した(図1)。

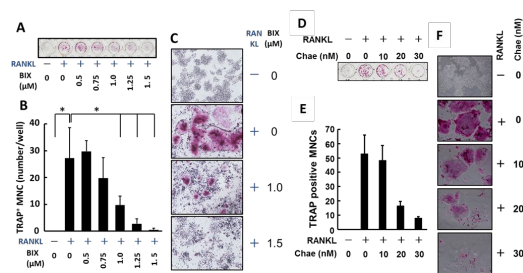


図1

ついで、破骨細胞分化マーカーである carbonic anhydrase II、cathepsin K、及び、マスター転写因子の NFATc1 のタンパク質産生量をウエスタンブロットにより半定量したところ、RANKL で産生誘導された上記因子のタンパク質産生量は BIX01294 および chaetocin により濃度依存的に抑制された(図2)。

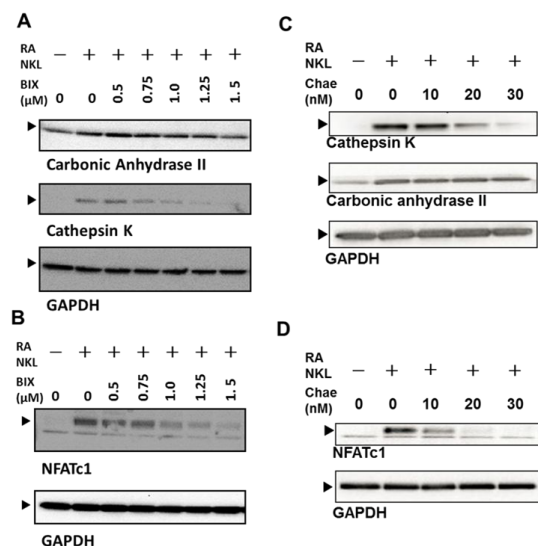


図2

BIX01294 および chaetocin の細胞増殖に及ぼす影響も合わせて調べたところ、RANKL 刺激により促進された細胞増殖は BIX01294 により大きく影響を受けなかったが (2009-2010 科研費補助金成果) chaetocin

を作用させると RANKL 誘導細胞増殖は濃度依存的に抑制された (図 3)。

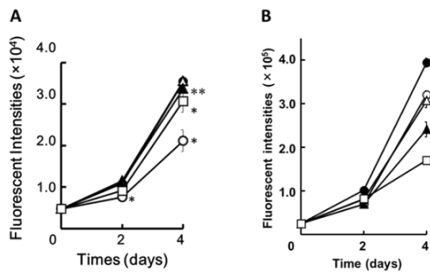


図 3

H3K9 のメチル化には G9a および Suv39h1 が関与しており、脱メチル化には LSD1 および JMJD1/2 が関与している。また、H3K9 の非メチル化時には転写活性は active でメチル化時の転写活性は silent である。このことから考えると、BIX01294 および chaetocin は H3K9 メチル化を促進する G9a および Suv39h1 を阻害するので、これらの阻害剤の影響により H3K9 は脱メチル化し、転写活性が active な状態になると推定される (図 4)。転写活性が active な状態で破骨細胞分化が抑制されるということは、破骨細胞分化抑制遺伝子の転写が active になっていると考えられた (図 4)。

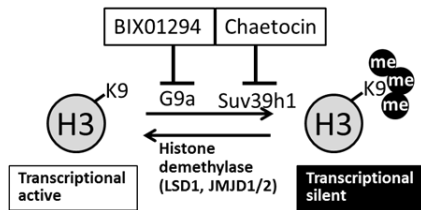


図 4

そこで、文献情報から破骨細胞分化抑制因子として報告されている *id1*, *id2*, *id3*, *mafB*, *irf8*, *bcl6* の遺伝子発現を調べてみたところ、RANKL 刺激ではこれらの遺伝子発現はコントロールに比べて大きく低下しており、BIX01294 により *id3*, *mafB*, *irf8* の発現が、chaetocin により *id1*, *id3*, *mafB*, *irf8* の発現がそれぞれ阻害剤濃度依存的に増加していった (図 5)。

ところが、G9a に対する siRNA を作用させてみたところ、破骨細胞分化を抑制する事が出来なかったため、BIX01294 の RANKL 誘導破骨細胞分化抑制は BIX01294 の G9a に対する効果ではなく、side effect である可能性が示唆された (図 6)。

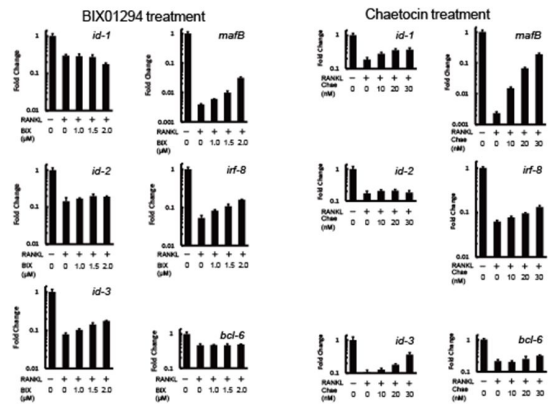


図 5

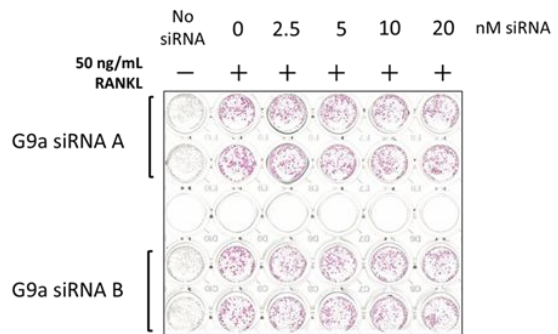


図 6

ついで、Suv39h1 の効果的な siRNA を得ることができなかったため、chaetocin の H3K9 のメチル化へ及ぼす影響を抗 H3K9 のトリメチル化抗体を使用してウエスタンブロットによって調べたところ、予想に反して、chaetocin は H3K9 のトリメチル化を亢進して

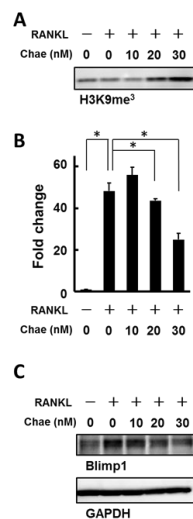


図 7

い事が示唆された。

いた (図 7)。そこで、*blimp1* 遺伝子産物が *irf8* や *id3* の発現を抑制する因子として報告されているので、*blimp1* の発現を調べてみたところ、chaetocin は RANKL による *blimp1* 遺伝子の発現亢進とその産物の産生亢進を濃度依存的に抑制した (図 7)。これらの結果から、chaetocin の破骨細胞分化誘導阻害は chaetocin の H3K9 メチル化阻害によるものではない

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Tsuda H, Ning Z, Imai K, Ochiai K, Yang P, Suzuki N (2013)

BIX01294 suppresses osteoclast differentiation on mouse macrophage-like Raw264.7 cells. *Bosn J Basic Med Sci* 13, 271-275 査読あり  
<http://www.bjbms.org/archives/2013-4/11-Tsuda.pdf>

Tsuda H, Ning Z, Yamaguchi Y, Suzuki N (2012)

Programmed cell death and its possible relationship with periodontal disease. *J Oral Sci*, 54,137-149 査読あり  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/josnusd/54/2/54\\_137/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/josnusd/54/2/54_137/_article)

Ogata H, Hayashi M, Tsuda H, Suzuki N, Masao M, Sugawara A, Ogiso B (2012)  
Effects of a calcium phosphate cement on mineralized nodule formation compared with endodontic cements. *Dent Materials Journal*, 31, 92-97 査読あり  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/31/1/31\\_2011-151/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/31/1/31_2011-151/_article)

Mikami Y, Suzuki N, Takahashi T, Otsuka K, Tsuda H (2011)

Bacitracin upregulates *mbrAB* transcription via *mbrCD* to confer bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*.  
*J Pharmacol Sci.*, 117, 204-207 査読あり  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/117/3/117\\_11052SC/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/117/3/117_11052SC/_article)

Mikami Y, Somei M, Tsuda H (2011)  
SSH-BM-I, a tryptamine derivative, stimulates mineralization in terminal osteoblast differentiation but inhibits osteogenesis of pre-committed progenitor cells. *J Pharmacol Sci.* 116, 63-72 査読あり

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/116/1/116\\_10329FP/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/116/1/116_10329FP/_article)

[学会発表](計7件)

HIROMASA TSUDA, TAKAHISA MUROFUSHI, AND NAOTO SUZUKI

Chaetocin inhibits osteoclast differentiation through reduction of Blimp1  
93rd General Session & Exhibition of the IADR, Boston, MA, USA  
March 11-14, 2015

津田啓方、室伏貴久、鈴木直人、Foxp3 抑制発現は Ca9-22 細胞の増殖能、遊走能及び MMP9 の分泌を抑制する

第 56 回歯科基礎医学会、福岡、2014 年 9 月 25 日 27 日

室伏貴久、津田啓方、鈴木直人、Sirt1 活性は歯肉上皮癌 Ca9-22 細胞の増殖と遊走を抑制する

第 56 回歯科基礎医学会、福岡、2014 年 9 月 25 日 27 日

津田啓方、鈴木直人、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤はマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞の RANKL 誘導破骨細胞分化を抑制する 第 68 回 NPO 法人口腔科学会学術集会、東京、2014 年 5 月 7 日 5 月 9 日

HIROMASA TSUDA, ZHAO NING, AND NAOTO SUZUKI

Two histone methyltransferase inhibitors suppress osteoclast differentiation of Raw264.7 cells  
43<sup>rd</sup> Annual Meeting & Exhibition of the AADR, Charlotte NC, USA  
Mar 19-22, 2014

山口洋子、津田啓方、大木秀郎、大塚吉兵衛、鈴木直人、成長因子受容体キナーゼ阻害剤による非外科的顎嚢胞治療法開発のための基礎的研究

第 54 回歯科基礎医学会、郡山、2012 年 9 月 14 日 16 日

津田啓方、今井健一、落合邦康、鈴木直人、BIX01294 は RAW264.7 細胞の RANKL 誘導破骨細胞分化を抑制する

第 53 回歯科基礎医学会 岐阜、2011 年 9 月 30 - 10 月 2 日

[図書](計1件)

Tsuda H and Mikami Y (2012)  
Chapter 5. Autophagy in periodontal disease ed) Nikolai Gorbunov  
Autophagy: Principles, Regulation and Roles in Disease  
Nova Science Publishers, Hauppauge NY USA, p85-96

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：Streptococcus pneumoniae の検出方法、  
検出用プライマーセット及び検出用キット

発明者：関みつ子、津田啓方、鳥越博貴

権利者：学校法人 日本大学

種類：特許

番号：5051574

取得年月日：2012 年 8 月 3 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

津田 啓方 (TSUDA, Hiromasa)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60325470