

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792278

研究課題名(和文) エピゲノムからみた顎顔面領域の先天性疾患～ヒストンメチル化酵素の役割～

研究課題名(英文) Craniofacial congenital anomaly in epigenome: the role of histone methyltransferase

研究代表者

東堀 紀尚 (Higashihori, Norihisa)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンメチル化酵素SETDB1の顎顔面領域での役割を解析するため、Wnt1-Cre LoxPシステムを用い神経堤細胞特異的にSETDB1をノックダウンさせ、その表現型そしてSETDB1の標的となる遺伝子の特定を目指した。SETDB1fl/fl /Wnt1-Creマウスは、高頻度で認められる先天性疾患である口蓋裂を発症していた。細胞増殖能の検討を行った所、SETDB1fl/fl /Wnt1-Creマウスの増殖能に低下が認められたことより、細胞増殖の異常が口蓋裂を発症させた要因の一つと考えられる。現在、遺伝子発現のプロファイリングを行う準備をしているところである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the role of histone methyltransferase SETDB1 during craniofacial development. I used Wnt1-Cre LoxP system to only knockdown SETDB1 in neural crest-derived cells and analyzed the phenotype and the downstream target of SETDB1. SETDB1fl/fl /Wnt1-Cre mouse exhibited embryonic lethality and showed cleft in palate. Palatal process was smaller than control, but had no defect of palatal elevation. The ability of proliferation was decreased in mutant mouse suggesting less proliferation of neural crest-derived cells may be a reason for cleft palate. Now I am in the middle of RNA sequencing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正 口唇口蓋裂 エピジェネティック ヒストン メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患の約7割に顎顔面領域に何らかの表現型がでるため、矯正歯科臨床では数多くの先天性疾患に接する機会がある。先天性疾患には、単一遺伝子、染色体異常等の原因がわかっているものから、非症候群性の口唇裂・口蓋裂に代表される遺伝的要因と環境要因との相互作用によって発症する多因子疾患がある。最も多い先天性疾患の一つである口唇裂・口蓋裂(日本人:1/500人)を例にとってみると、一卵性双生児は同一遺伝子をもつにもかかわらず、必ずしも両方共に口唇裂・口蓋裂を発症せず、環境因子の重要性も示されている。これらの事象は、環境因子が何らかの形で細胞内の状態を変化させ異常をきたすトリガーとなることが考えられる。近年、がん化や代謝性疾患が環境因子によるエピジェネティックな変化により、疾患が引き起こされているという報告がされている。すなわち、環境因子によって健全な細胞が持つエピゲノムの情報が修飾されることにより起きてはならない質的变化により、疾患が引き起こされることがわかってきた。発生というダイナミックな質的变化が生じる生命現象では、複雑なネットワークによるエピジェネティックな修飾により、同一ゲノムをもつ細胞が段階を踏んで組織特異的な遺伝子発現のパターンを生じさせ、それぞれがアイデンティティーを持った個体を形成する。発生段階ではエピゲノムの情報の修飾が頻繁に起きていると考えられるため、より一層環境因子の暴露による影響を受けやすく、異常な修飾反応による先天性疾患が発症しやすくなると考えられる。

エピゲノムの修飾には、DNAのメチル化同様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。ヒストン修復には、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細胞の多様性を生み出

している。細胞内には、ヒストン修復を制御する酵素が多数存在し、酵素によって修飾されたヒストンがクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現のon/offを制御している。近年、ヒストン修飾酵素と疾患との関係が見つかっている。例えば、白血病の原因遺伝子として、ヒストン修飾酵素遺伝子が見つかり、ヒストン修飾不全のため白血病を発症していることがわかっている。また、ヒストンメチル化酵素であるMMSETのノックアウトマウスは、心奇形などの異常の他に口蓋裂を発症しており、発生時にヒストン修飾が大きく影響していることが示された。また、ヒストン脱メチル化酵素であるJmjd2Aが神経堤細胞の分化のスイッチであることが示された。以上のことより、ヒストン修飾酵素が発生を始めとした生命現象で重要な働きが示され、その生体内での機能を解析することは新たな疾患の仕組みの解明につながると考えられる。また、環境因子である栄養素、化学物質等は、これらの代謝物がヒストン修飾酵素の補酵素として働くことが知られており、ヒストン修飾酵素・環境因子と疾患との関連が強く示唆される。

ヒストンメチル化酵素であるSETDB1は、ヒストン3の9番目のリジンを特異的にメチル化し、遺伝子発現を抑制する働きを持っている。SETDB1のノックアウトマウスは、3.5-5.5 dpcに胎生致死となるため、顎顔面領域のSETDB1の機能については全くわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではSETDB1の顎顔面領域の役割を解析するため、Wnt1-Cre LoxPシステムを用い、神経堤細胞特異的にSETDB1をノックダウンさせ、その表現型そしてSETDB1の標的となる遺伝子の特定を目指すこととする。

## 3. 研究の方法

SETDB1の顎顔面領域の役割について調べる

ために、Cre-LoxP システムを用い、神経堤細胞由来の細胞のみ SETDB1 をノックアウトさせ、その影響をみる。

上記の学術的背景より、本研究では神経堤細胞におけるヒストン修飾酵素 SETDB1 の役割を解明するため、SETDB1<sup>fl/fl</sup> マウスと Wnt1-Cre LoxP システムを用いた基礎的研究を行い、顎顔面領域における先天異常疾患の病因、治療法への基盤となる研究を行う。次に示すことを明らかにする

- (1) SETDB1<sup>fl/fl</sup> /Wnt1-Cre マウスの表現型解析  
SETDB1<sup>fl/+</sup> /Wnt1-Cre と SETDB1<sup>fl/fl</sup> との掛け合わせを行い胎生致死かどうかの確認を行う。胎生致死の場合、各ステージの胎児にて死亡する時期を同定する。また、表現型が出始めるかの時期を各ステージの組織切片にて確認する。胎生致死ではない場合は、コントロールとの比較を X 線 CT, Alzarin Red, Alcian Blue 染色を行い、硬組織の異常等を検討する。
- (2) SETDB1<sup>fl/fl</sup> /Wnt1-Cre の細胞の分化・増殖能の検討  
屠殺する 1 時間前に BrdU を腹腔内投与し、屠殺しそのマウスを固定しワックスに包埋後、組織切片を作成する。抗 BrdU 抗体を用い増殖能を、分化マーカーに対する抗体を用い分化能を免疫組織化学染色法を用い検討する。
- (3) SETDB1 の標的遺伝子の特定  
ROSA26 (Cre が発現した場合のみ EGFP が発現する), Wnt1-Cre と交配した SETDB1<sup>fl/fl</sup> とコントロールマウスから EGFP 陽性の細胞を FACS にてソーティングする。使用するステージは、表現型が出始める直前のステージを選ぶ予定である。ソーティングされた細胞から mRNA を抽出し、RNA sequencing を行い遺伝子発現の強弱をコントロールと比較、同定する。変化があった遺伝

子を qPCR (既に機能するプローブとプライマーの配列は確認済み) もしくは in situ hybridization 法 (機能する数多くの RNA プローブが本研究室にある) にて確認する。

#### 4. 研究成果

- (1) SETDB1<sup>fl/fl</sup> /Wnt1-Cre マウスの表現型  
本コンディショナルノックアウト (CKO) マウスは、胎生致死である。そのため、CKO マウスの表現型を確認するため、E12.5, E13.5, E14.5 の各胎児を採取し、ワックスに包埋し、組織切片を作成した。Toluidine blue 染色より、本来ならば E15.5 には口蓋が癒合する時期にも関わらず、CKO マウスでは口蓋の癒合が認められなく口蓋裂を発症していた (100%)。口蓋突起は、野生型に比べ明らかに小さかったが、口蓋突起の elevation には異常がみとめられなかった。骨、軟骨、歯胚の形成に関しては、若干小さいものの形態には異常が認められなかった。
- (2) SETDB1 CKO マウスの増殖能  
採取する 1 時間前に BrdU を腹腔内投与し、採取したサンプルの切片を蛍光免疫染色法を用いて確認した所、有意に CKO マウスの増殖能が減少していた。
- (3) SETDB1<sup>fl/fl</sup> マウスから MEF の採取  
間葉細胞での SETDB1 の機能解析を行うため SETDB1<sup>fl/fl</sup> マウスから mouse embryonic fibroblast (MEF) を採取した。
- (4) RNA sequence 用サンプル調製  
RNA の発現プロファイリングを行うため、E13.5 の CKO マウス口蓋突起を採取し、total RNA を抽出した後、mRNA のみ単離した。

#### 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 1 件)

- (1) 富永直子、川元龍夫、東堀紀尚、福岡裕樹、森山啓司、開咬を伴う骨格性下顎前突症例に対する下顎枝矢状分割術後の長期安定性について、日本顎変形症学会誌、査読有、22 巻、2012、255-263

[学会発表](計 12 件)

- (1) 植野智子、東堀紀尚、福岡裕樹、鈴木聖一、森山啓司。下顎頭変形を伴う II 級不正咬合に対し上顎前歯部歯槽骨切りによる外科的矯正治療を行った一症例。第 72 回日本矯正歯科学会大会、平成 25 年 10 月 7-9 日、松本
- (2) 片岡恵一、東堀紀尚、小川卓也、佐藤豊、原田清、森山啓司。Le Fort I 型骨切り術により顎裂閉鎖と上顎骨延長を行い咬合の改善を図った片側性口唇口蓋裂の一症例。第 72 回日本矯正歯科学会学術集会、平成 25 年 10 月 7-9 日、松本
- (3) 片柳みなみ、高田潤一、東堀紀尚、池田安紀津、Tsasan Tumurkhuu、志賀百年、辻美千子、森山啓司。非症候性部分性無歯症の臨床的特徴について-家族歴、欠如部位および歯冠形態に関する検討-。第 72 回日本矯正歯科学会大会、平成 25 年 10 月 7-9 日、松本
- (4) 高橋由記、東堀紀尚、高田潤一、幸田直己、森下真紀、志賀百年、辻美千子、森山啓司。非症候性部分性無歯症の臨床的特徴について-顎顔面形態に関する検討-第 72 回日本矯正歯科学会大会、平成 25 年 10 月 7-9 日、松本
- (5) 松本静、東堀紀尚、高田潤一、八尋浩平、志賀百年、辻美千子、森山啓司。非症候性部分性無歯症の臨床的特徴について-当科における患者動向に関する実態調査-第 72 回日本矯正歯科学会大会、平成 25 年 10 月 7-9 日、松本

- (6) 松本力、東堀紀尚、川元龍夫、鈴木聖一、森山啓司。顔面非対称を伴う骨格性下顎前突症患者における中顔面部の三次元形態解析。第 47 回日本口腔科学会関東地方部会、平成 25 年 9 月 28 日、東京
- (7) Kamata H, Fukuoka H, Shiga M, Higashihori N, Kawamoto T, Moriyama K. Three-dimensional analysis of mandibular morphology in patients with facial asymmetry and mandibular prognathism. 45th Annual Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists, November 1-3, 2012, Seoul, Korea,
- (8) 中山友美子、川元龍夫、福岡裕樹、東堀紀尚、森山啓司。下顎枝矢状分割術を施行した骨格性下顎前突症例の長期術後経過からみた咬合安定性の検討。第 71 回日本矯正歯科学会大会、平成 24 年 9 月 26-28 日、盛岡
- (9) Higashihori N, Nakayama Y, Fukuoka H, Kawamoto T, Moriyama K. Long-term stability of occlusion after sagittal split ramus osteotomy for mandibular prognathism. 14th International Symposium on Dentofacial Development and Function, September 19-23, 2012, Beijing, China,
- (10) Mikami T, Higashihori N, Fukuoka H, Kawamoto T, Moriyama K. Soft tissue profile changes following anterior segmental maxillary osteotomy in mandibular retrognathia patients. 14th International Symposium on Dentofacial Development and Function, September 19-23, 2012, Beijing, China
- (11) Kataoka K, Ogawa T, Haruyama N, Kobayashi Y, Higashihori N, Moriyama K. Post operative stability of

maxillary intraoral distraction osteogenesis in cleft lip and palate patients. 14th International Symposium on Dentofacial Development and Function. September 19-23, 2012, Beijing, China

- (12) 片岡恵一、小川卓也、春山直人、小林起穂、阿彦希、大宅彩、東堀紀尚、森山啓司。創内型装置を用いて上顎骨延長法を行った口唇裂・口蓋裂症例における術後変化。第36回日本口蓋裂学会総会・学術集会、平成24年5月24-25日、京都

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 編著 後藤繁巳、清水典佳、森山啓司、宮澤健、榎宏太郎、石川博之。著者 東堀紀尚他，医歯薬出版株式会社，安心・安全 歯科矯正用アンカースクリュー - この症例にこの方法，2013，375

〔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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東堀 紀尚 (Higashihori, Norihisa)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号：50585221

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：