

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26861773

研究課題名(和文)顎顔面発生におけるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of epigenetic mechanisms during craniofacial development

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：G9aの顎顔面での役割を解明するため、神経堤細胞由来の細胞のみG9aをノックアウトさせたマウスを用い、表現形解析を行った後、G9aの標的遺伝子を探索することを目的とした。その結果、神経堤細胞由来の細胞のみにG9aをノックダウンさせたマウスの前頭骨、上顎骨、下顎骨の低形成を確認した。また、G9aの阻害剤をマウス上顎突起・下顎突起由来の間葉細胞へ添加し、骨芽細胞分化を誘導した所、骨芽細胞の分化が抑制された。同様な条件で採取したRNAをqPCRにて定量的に解析した所、未分化の骨芽細胞に強く発現している遺伝子の発現が上昇しており、G9aの活性低下が骨芽細胞の分化を抑制している事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish the role of G9a during craniofacial development using conditionally knockout only in neural crest-derived cells and to find the target genes of G9a. Knocking G9a down only in neural crest-derived cells showed reduced bone formation in frontal bones, maxillary bones, and mandibular bones. Inhibiting G9a function in mesenchymal cells obtained from maxillary and mandible prominences also showed reduced osteoblastic differentiation. RNA was harvested from the cells that were treated as same as before, and the expression of the genes were quantified by qPCR, and showed that the gene which were found in undifferentiated osteoblast was upregulated. These data suggested that upregulation of target gene by inhibiting G9a activity turned out the reduced osteoblast differentiation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：エピジェネティック 顎顔面発生 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

顎顔面奇形は、先天異常患者の約7割に随伴して生じていると言われている。我が国では、先天性疾患に起因した咬合異常に対する歯科矯正治療の保険診療適応が拡大し、歯科医療分野の社会的ニーズが増加してきている。一方、先天的疾患の要因には、単一遺伝子、染色体異常等の病因が解明されているものから、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のように、いまだに発症要因が解明されていないものも多いのが現状である。したがって個々の疾患の病因・病態の解明が歯学において解決すべき重要課題となっている。

近年、がん化や代謝性疾患が、環境因子によるエピゲノム変化によって疾患が引き起こされているという報告が多数されている。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が修飾されることにより生じた、本来おきてはならない質的变化により、疾患が発症することがわかってきた。また、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変化により、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。すなわち、発生段階ではエピジェネティックな変化が頻繁に起きていると考えられ、より一層環境因子の暴露による影響を受けやすく、異常なエピジェネティックな変化により先天性疾患が発症しやすくなると考えられる。

エピジェネティックな変化には、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。中でもヒストンメチル化修飾は、ヒストン3蛋白のリジン基をメチル化することによって遺伝子発現を制御し、ヒストンメチル化修飾はヒストンメチル化酵素もしくはヒストン脱メチル化酵素によって可逆的に修飾されている。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報告がされている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、また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おり、

生体内でのヒストン修飾酵素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。

G9a は、ヒストンメチル化酵素の一つであり、ターゲット遺伝子のプロモーターやエクソン部分のヒストン H3 リジン9を次メチル化することにより、遺伝子発現を負に制御することが知られている。G9a コンベンショナルノックアウトマウスは、胎生10.5日前に致死となるため、各組織での役割は不明であり、その詳細なメカニズムの検討が望まれている。

2. 研究の目的

G9a の顎顔面での役割を解明するため、神経堤細胞由来の細胞のみ G9a をノックアウトさせたマウス(G9a CKO)を用い、その表現形解析、そして、G9a の標的遺伝子を探索する。特に骨芽細胞における G9a 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することにより、骨系統疾患を含む先天異常の発症原因の解明、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) G9a CKO の骨、軟骨染色、内在性アルカリリフォスファターゼ活性

E13.5 から E16.5 の各ステージの組織切片を用い、骨・軟骨染色を行った。また、内在性アルカリリフォスファターゼ活性を確認するため NBT-BCIP にて染色後、トルイジンブルーにて対比染色を行った。

(2) 上顎突起および下顎突起より採取した間葉細胞の micromass culture および骨軟骨染色

E10.5 のマウスより、顕微鏡下にて上顎突起および下顎突起を採取した。その後 Dispace 処理を行った後、間葉細胞のみを分離した。濃縮した細胞を一魂としてプレATINGし、骨芽細胞・軟骨芽細胞分化培地にて6日間培養を行った。ホルムアルデヒドにて固定後、骨軟骨染色を行い、ヘマトキシリン染色にて対比染色を行った。

(3) G9a 阻害剤 BIX01294 による骨・軟骨の分化の抑制

阻害剤の適正濃度を検討するため、各濃度の阻害剤を micromass culture に投与し、その影響を検討した。使用する濃度は、過去に報告されている論文を参考にした。

(4) micromass culture の骨軟骨染色計測

骨軟骨染色によって染色された骨および軟骨を撮影し、フォトショップ上でそれぞれ骨軟骨染色で染まった部分の直径を計測し

た。

(5) mRNA の抽出、cDNA 合成、qPCR

処理した細胞より mRNA を抽出した後、逆転写酵素によりその cDNA を作成した。得られたサンプルを、サイバークリーンを用いた qPCR 法にて定量的に遺伝子発現量を評価した。既知の骨芽細胞・軟骨芽細胞分化マーカー遺伝子のプライマーを用いた。

(6) クロマチン免疫沈降

G9a の作用を阻害後 3 日目の細胞をホルムアルデヒドにて固定を行った。固定した細胞はスクレーパーにて回収後、800bp 以下の長さの DNA にするため、酵素処理、超音波裁断を行った。その後、抗 H3K9me2 抗体を用い免疫沈降を行った後、得られたサンプルをターゲット遺伝子のプロモーター領域を挟んだプライマーにて qPCR を行った。Negative control として GAPDH を標的とするプライマーを用いた。

4. 研究成果

(1) G9a CKO の表現形

G9a CKO の E13.5 から E16.5 における組織切片より、神経堤細胞由来である前頭骨、口蓋骨、下顎骨の低形成が確認できた。アルカリフォスファターゼの活性も G9a CKO では減少していた。また、メッケル軟骨も低形成が認められた。口蓋や歯胚の形成も若干遅れはあるものの、胎生期におけるそれらの形成には異常を認めなかった。

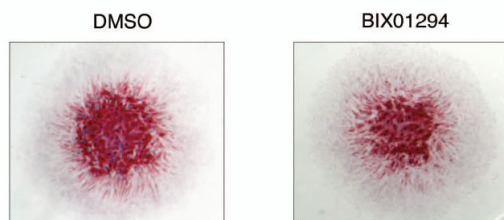
(2) G9a 阻害剤

BIX01294 による

骨芽細胞、軟骨芽細胞の分化への影響

BIX01294 の適正濃度は、 $2\mu\text{M}$ であったため、以降の実験ではこの濃度を用いることとした。E10.5 の上顎突起、下顎突起より採取した間葉細胞を micromass culture にて培養すると同時に阻害剤を添加した。骨軟骨染色した micromass culture の骨で染まった部分および軟骨で染まった部分の直径を計測した所、阻害剤を添加したものでは、その直径が小さいことより、阻害剤存在下では、骨、軟骨の分化が抑制されていた。これは、G9a CKO マウスと同様な結果であった。

(3) G9a の作用を阻害することによる分化マ



ーカーの変化

b) で用いた系を使用し骨芽細胞・軟骨芽細胞の分化マーカー遺伝子発現を qPCR にて確認した。未分化骨芽細胞に発現する遺伝子の上昇、骨芽細胞分化マーカー、軟骨芽細胞分化マーカーの減少が認められた。

(4) ターゲット遺伝子プロモーター領域と G9a の結合について

未分化細胞に発現する遺伝子が G9a の作用を阻害することによって上昇したことより、正常時には G9a がそのターゲット遺伝子に結合し遺伝子抑制を行っていると考えられたため、ターゲット遺伝子プロモーター領域に G9a が結合しているかどうかを検討するため、クロマチン免疫沈降を行った。クロマチン免疫沈降用の抗 G9a 抗体が存在しないため、代わりに G9a が特異的にメチル化する場所を認識する抗体、抗 H3K9me2 抗体を用いて行ったところ、ターゲット遺伝子プロモーター領域に抗 H3K9me2 抗体が占める割合が G9a を阻害することによって減少していた。Negative control である GAPDH を認識するプライマーでは大きな変化は認められなかった。

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)

Liu S, Higashihori N, Yahiro K, Moriyama K. Retinoic acid inhibits histone methyltransferase Whsc1 during palatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 458(3):525-530, 2015

〔学会発表〕(計 2 件)

東堀紀尚、劉世穎、八尋浩平、森山啓司。ヒストンメチル化酵素 Whsc1 はレチノイン酸による口蓋裂発症に関与する 第 55 回日本先天異常学会。2015 年 7 月 25-27 日。パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

八尋浩平、東堀紀尚、森山啓司。ヒストンメチル化酵素 SETDB1 が顎顔面発生過程に及ぼす影響 第 80 回口腔病学会学術大会。2015 年 12 月 25、26 日。東京医科歯科大学(東京都・文京区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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・大学院医歯学総合研究
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：