

令和元年6月24日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11797

研究課題名(和文) 腱組織形成時におけるヒストンメチル化酵素G9aの役割

研究課題名(英文) The role of the histone methyltransferase G9a during tendon formation

研究代表者

和田 悟史 (Wada, Satoshi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20581119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腱組織形成時におけるヒストンメチル化酵素であるG9aの機能を調べるために、G9a conditional ノックアウト(cKO)マウスの解析を行った。G9a cKOマウスの腱組織はコントロールマウスと比較して形成不全を示した。免疫染色よりG9a cKOマウスの腱組織で1型コラーゲンの発現の減少が認められた。また、コントロールマウスと比較してG9a cKOマウスで増殖能が低下していることを確認した。これらの結果より、G9aが生体においても腱組織の発生過程で正常な増殖と分化において必須であ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

腱組織および歯根膜組織の細胞は共通のマーカー分子を多く発現しており、それらの遺伝子が過剰な石灰化を制御し、恒常性の維持を行っていると考えられる。本研究により、ヒストンメチル化酵素による腱関連遺伝子の制御機構を明らかにすることにより、腱組織の異所性石灰化や歯根膜組織の骨性癒着の原因および今まで困難であった腱・歯根膜組織の修復および再生機序が解明されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the functions of G9a in tendon development using G9a conditional knockout (cKO) mice. G9a cKO mice showed hypoplastic tendons compared with control mice. Immunohistochemical analysis revealed that expression of type I collagen was expressed lower in vertebral tendon tissue of G9a cKO mice than in that of control. BrdU labeling revealed that proliferation rates decreased in tenocytes of G9a cKO mice. These results indicate that G9a regulates proliferation and differentiation of tendon during tendon development.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：エピジェネティクス ヒストンメチル化 腱組織 発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腱組織は骨と筋肉を連結し、筋肉の収縮による力を骨に伝達させる。口腔内においても咀嚼時の筋運動および舌運動において、筋肉から生じる力は腱組織を介して顎骨に伝わり、口腔機能において重要な役割を担っている。腱組織の形成時、腱前駆細胞が成熟腱細胞に分化する過程で、Scleraxis(Scx)などの転写因子(Schweitzer et al, Development. 2001)、Tenomodulin(Tnmd)などの腱関連遺伝子を発現する(Docheva et al. Mol Cell Biol. 2005)。これらの遺伝子は歯根膜組織でも同様に発現することが報告されている(Takimoto et al, Development. 2015, Komiyama et al PLoS One 2013)。このように腱細胞と歯根膜細胞の共通の遺伝子発現が細胞分化に影響を与え、組織の恒常性の維持を行っていると考えられる。

近年、遺伝子発現制御にクロマチン構造の変化が重要な役割を果たすことが報告されている。クロマチン構造の変化にはDNAのメチル化およびヒストンのメチル化等の修飾が関与していることが知られており、細胞分化時の遺伝子発現制御に影響を与える。ヒストン修飾の中でヒストンH3に存在するヒストンテイルの9番目のリジン(H3K9)のメチル化は発生および細胞分化において重要であり、メチル化酵素が6種類知られている。その中の酵素であるG9aはH3K9me1およびH3K9me2のメチル化に関与しているが、G9a欠損マウスは発生初期で致死となり、発生期において重要な分子であると考えられている。また、脂肪細胞(Wang et al, EMBO J. 2007)、血球系細胞(Chen et al, Gene Dev. 2012)など様々な細胞において、G9aが細胞分化および発生に関与することが報告されている。以前はどのメチル化もヘテロクロマチンの形成と遺伝子発現の抑制に関与していると考えられていたが、最近ではH3K9me1およびH3K9me2については、ユークロマチン領域でもその局在が認められ、さらに遺伝子発現の活性化とも関係するといった報告もあることから、その機能は十分に明らかになってはいない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒストンメチル化酵素であるG9aが腱関連マーカー遺伝子発現を制御するという研究仮説に基づき、腱組織でG9aを欠損するマウスの解析を行い、腱細胞の機能および生体における腱組織形成を評価することで、G9aが腱細胞で発現している生理的な意義について明らかにする。

3. 研究の方法

ヒストンメチル化酵素であるG9aが、腱組織形成に重要な役割を示すことを調べるために、腱組織でG9aが欠損するコンディショナルノックアウトマウスを用いて解析を行った。Sox9は胎生期マウスにおいてアキレス腱などの腱組織で発現することが報告されていることから(Soeda et al, Genesis. 2010)、Sox9-Creマウスを使用し、CreリコンビナーゼによりG9aのヒストンメチル化酵素活性領域を失う、G9a^{flox/flox}マウスを使用した(Tachibana et al, EMBO J. 2007)。Sox9-CreマウスおよびG9a^{flox/flox}マウスを交配し、Sox9-Cre;G9a^{+/+}(野生型)、Sox9-Cre;G9a^{flox/+}(ヘテロ)、Sox9-Cre;/G9a^{flox/flox}(G9a欠損)の3遺伝子型のマウスが生まれるが、その中のSox9-Cre;G9a^{flox/flox}はG9aの酵素活性を失っており、このマウスをG9aノックアウトマウスとして解析を行った。

(1) 腱組織におけるSox9局在の確認

Sox9-Creマウスにおいて、Creリコンビナーゼが腱組織で機能しているかを調べるために、Sox9-CreマウスとRosa-LacZマウスの交配し、Sox9-Cre;Rosa-LacZマウスを作製し、切片作製のx-gal染色を行い、胎生期の腱組織におけるx-gal陽性細胞の発現および局在の確認を行った。

(2) 腱組織の形態的計測

G9a欠損マウスの腱組織について組織学的解析を用いて検討を行った。出生直後のマウス腱組織の切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、腱組織の状態について解析を行った。

(3) G9a欠損マウスの腱細胞分化マーカーの確認

免疫組織化学を用いて、G9a欠損マウスの腱組織のG9aおよびH3K9me2の発現および局在の変化を調べた。また、*in situ* hybridizationおよび免疫組織化学を用いて、腱関連マーカー分子であるI型コラーゲンおよびTenomodulinの発現変化を解析した。

(4) G9a欠損マウスの腱細胞の増殖およびアポトーシス

腱組織形成不全の原因の1つとして腱細胞の増殖の低下およびアポトーシスの可能性が考えられる。そこで、細胞分裂時のBrdUの取り込みにより細胞増殖の評価を行った。また、アポトーシスの評価としてTUNEL染色を行い、TUNEL陽性細胞数の相違を野生型と比較し

検討した。

4. 研究成果

(1) 腱組織における Sox9 局在の確認

発生期において Sox9 プロモーターの活性により腱組織で Cre リコンビナーゼが機能することを確認するために、Sox9-Cre; Rosa26-LacZ マウスの解析を行った。腱細胞において LacZ の局在が観察され、腱細胞が Sox9 陽性細胞由来であることを確認した。

(2) 腱組織の形態的計測

Sox9-Cre マウスと G9a flox/flox マウスの交配から G9a conditional ノックアウト(cKO)マウスを作出した。生後 3 週齢の G9a cKO マウスはコントロールマウスに比べ、腱組織の形成不全を示した。また、胎生 16.5 日齢の組織切片を用いてヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ、コントロールマウスと比較して G9a cKO マウスの腱組織の厚みの減少が認められた。このことより、G9a は腱組織の発生過程において重要であることが示唆された。

(3) G9a 欠損マウスの腱細胞分化マーカーの確認

免疫組織化学より、胎生 16.5 日齢の G9a cKO マウスではコントロールマウスに比較して、G9a の発現が著しく減少し、G9a の基質である H3K9me2 も G9a cKO マウスの腱組織で減少していることを確認した。腱の分子マーカーである I 型コラーゲンにおいては、コントロールマウスに比べて G9a cKO マウスの腱組織で発現の減少が認められた。さらに *in situ* hybridization より、コントロールマウスに比べて G9a cKO マウスの腱組織で I 型コラーゲンおよび Tenomodulin の発現減少が認められた。これらの結果より、G9a が腱分子マーカーの制御において重要である可能性が示唆された。

(4) G9a 欠損マウスの腱細胞の増殖およびアポトーシス

細胞増殖時の BrdU 取り込みにおいて、G9a cKO マウスで BrdU 陽性細胞数の減少が認められ、コントロールマウスと比較して増殖能が低下していることを確認した。一方、TUNEL 染色ではコントロールマウスと G9a cKO マウスに変化は見られなかった。これらの結果より、G9a が腱細胞の増殖において重要である可能性が示唆された。

以上の結果より、G9a が生体においても腱組織の発生過程で正常な増殖と分化において必須である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Katsumata Y, Kanzaki H, Honda Y, Tanaka T, Yamaguchi Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Narimiya T, Wada S, Nakamura Y. Single Local Injection of Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatin Attenuates Bone Resorption and Orthodontic Tooth Movement in Mice. *Polymers*, 2018,13;10(12). pii:E1384 査読有 DOI:10.3390/polym10121384.

Shimada A, Ideno H, Arai Y, Komatsu K, Wada S, Yamashita T, Amizuka N, Poschl E, Brachvogel B, Nakamura Y, Nakashima K, Mizukami H, Ezura Y, Nifuji A. Annexin A5 involvement in bone overgrowth at the Enthesis. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(8) 1532-1543. 査読有 DOI:10.1002/jbmr.3453.

Yamaguchi Y, Kanzaki H, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Narimiya T, Wada S, Nakamura Y. Dimethyl Fumarate inhibits osteoclasts via attenuation of ROS signaling by augmented antioxidation. *J Cell Mol Med*, 2018 22(2):1138-47. 査読有 DOI:10.1111/jcmm.13367.

Narimiya T, Wada S, Kanzaki H, Ishikawa M, Tsuge A, Yamaguchi Y, Nakamura Y. Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type IV collagen degradation by matrix metalloproteinase-12. *J Periodontol Res*, 2017 52(5) 842-852. 査読有 DOI:10.1111/jre.12453.

Miyamoto Y, Kanzaki H, Wada S, Tsuruoka S, Itohiya K, Kumagai K, Hamada Y, Nakamura Y. Asporin stably expressed in the surface layer of mandibular condylar cartilage and augmented in the deeper layer with age. *Bone Reports*, 2017 23;7:41-50. 査読有 DOI:10.1016/j.bonr.2017.07.002.

Kanzaki H, Wada S, Narimiya T, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Nakamura Y. Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis. 2017 30;8:351. 査読有 DOI:10.3389/fphys.2017.00351.

Wada S, Kanzaki H, Narimiya T, Nakamura Y. Novel device for application of continuous mechanical tensile strain to mammalian cells. *Biology Open*, 2017 6(4): 518-524. 査読有 DOI:10.1242/bio.023671.

Kanzaki H, Shinohara F, Itohiya K, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Matsuzawa M, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y. RANKL induces Bach1 nuclear import and attenuates Nrf2-mediated antioxidant enzymes, thereby augmenting intracellular reactive oxygen species signaling and osteoclastogenesis in mice. *FASEB J*, 2017 31(2): 781-792. 査読有 DOI:10.1096/fj.201600826R.

Kanzaki H, Shinohara F, Suzuki M, Wada S, Miyamoto Y, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Makihiro S, Kawai T, Taubman MA, Nakamura Y. A-Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 17 Enzymatically Degrades Interferon-gamma. *Sci Rep*, 2016 30;6:32259. 査読有 DOI:10.1038/srep32259.

Kanzaki H, Shinohara F, Kanako I, Yamaguchi Y, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y. Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes. *Redox Biol*, 2016 8:186-191. 査読有 DOI:10.1016/j.redox.2016.01.006.

Itohiya K, Kanzaki H, Ishikawa M, Wada S, Miyamoto Y, Narimiya T, Nakamura Y. Occlusal hypofunction mediates alveolar bone apposition via relative augmentation of TGF- signaling by decreased Asporin production in rats. *Dental, Oral and Craniofacial Research*, 2016 3:1-8. 査読有 DOI:10.15761/DOCR.1000192.

〔学会発表〕(計 2 件)

和田悟史, 出野尚, 島田明美, 上運天太一, 中村芳樹, 中島和久, 木村宏, 眞貝洋一, 立花誠, 二藤彰、腱組織形成におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能、第 39 回日本分子生物学会、2016 年

和田悟史, 出野尚, 島田明美, 上運天太一, 中村芳樹, 中島和久, 木村宏, 眞貝洋一, 立花誠, 二藤彰、ヒストンメチル化酵素 G9a は腱組織の正常な発生に必要なものである、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：二藤 彰

ローマ字氏名：Nifuji Akira

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00240747

研究分担者氏名：中村 芳樹

ローマ字氏名：Nakamura Yoshiki

所属研究機関名：鶴見大学

職名：名誉教授

研究者番号(8桁)：10097321

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。