

博士学位論文審査報告書

大学名	早稲田大学		
研究科名	人間科学研究科		
申請者氏名	出野 尚		
学位の種類	博士 (人間科学)		
論文題目	Immunohistochemical detection of methylated histone H3 lysine 9 and histone methyltransferases and implication of their roles during skeletal cell differentiation 免疫組織染色法によるヒストンH3リジン9の修飾とヒストンメチル化酵素の検出および骨格系細胞分化過程におけるそれらの局在変化		
論文審査員	主査	早稲田大学教授	今泉 和彦 医学博士 (大阪大学)
	副査	早稲田大学教授	榊原 伸一 博士 (医学) (東京大学)
	副査	早稲田大学准教授	千葉 卓哉 博士 (医学) (京都大学)
	副査	鶴見大学歯学部教授	二藤 彰 博士 (歯学) (東京医科歯科大学)

【本研究の背景と目的】 超高齢化社会にある日本で高齢者がより健康で自立した生活を送り続けるためには筋骨格系組織の機能を維持することが不可欠である。特に骨の損傷は日常生活に多大な支障を来すことから、骨の健康維持は高齢者のQOL向上に繋がる。骨は形成と吸収によるリモデリングが生涯を通して続く代謝が活発な器官であり、この形成と吸収のバランスが崩れると骨粗鬆症などの骨関連疾患を発症する。骨形成過程ではたらく骨芽細胞は、内軟骨性骨化と膜性骨化の2つの経路を経て間葉系細胞から分化することが知られている。主に長管骨でみられる内軟骨性骨化は、間葉系細胞が軟骨細胞、増殖軟骨細胞、前肥大軟骨細胞、肥大軟骨細胞へと分化が進み、最終的に骨芽細胞に置き換えられ骨化に至る。間葉系細胞は転写因子 (Sox9) の発現によって軟骨細胞の分化を開始する。その後、分化段階に特異的な遺伝子 (Ihh, Runx2など) の制御を受け、肥大軟骨細胞へと分化が進む。このような緻密な分化制御遺伝子の発現には転写因子とその機能を維持あるいは調節するゲノムDNAのメチル化やヒストンの修飾による制御が重要であると現在考えられている。ヒストン修飾の一つであるヒストンH3リジン9 (H3K9) はメチル化、アセチル化の修飾を受けるが、その修飾によりクロマチン構造が変化し、遺伝子の発現制御に関わっている。また、H3K9を基質とする既知のメチル化酵素は複数存在し、それらが胎生期の発生で重要な機能を担っていることから、ヒストン修飾酵素やヒストン修飾と細胞分化との関連が注目されている。この関連を明確にすることは、骨形成における遺伝子の発現制御を解明することに加え、骨関連疾患の発症機構を解明する上でも極めて重要である。そこで本研究では、細胞分化におけるヒストン修飾の役割を明らかにするため、これら核内タンパク質の局在を明らかにするための免疫組織染色法の至適条件をしらべた。その結果に基づいた条件の下で内軟骨性骨化におけるH3K9の修飾とその修飾酵素の発現局在を検討した。

【方法】 ①免疫組織染色による解析：胎生12.5日、14.5日、16.5日のマウス上腕骨、生後2週齢のマウス精巣のパラフィン包埋切片を作成した。H3K9の修飾 (me1, me2, me3, ac)、H3K9

メチル化酵素 (G9a, Glp, Setdb1, Prdm2, Suv39h1, Suv39h2)、軟骨分化マーカー (Col2a1, Col10a1)、核内タンパク質 (Pcna) に対する抗体を用いた。抗原賦活化はクエン酸 (80°C、20分) にて実施した。②mRNA発現による解析: 実体顕微鏡下にて胎生16.5日マウス上腕骨から増殖軟骨層、前肥大軟骨層、肥大軟骨層、骨稜部を含む200µmのスライスを作成し、各々のRNAを抽出した。リアルタイムPCR法にてH3K9メチル化酵素 (G9a, Glp, Setdb1, Prdm2, Suv39h1, Suv39h2) および軟骨分化マーカー (Col2a1, Col10a1, Ihh, Pth1r) の発現をしらべた。③タンパク質発現による解析: mRNA解析と同様に作成した骨スライスよりタンパク質を抽出した。western blot 法によってH3K9の修飾 (me1, me3) の量とH3K9メチル化酵素 (G9a, Glp) の発現をしらべた。

【結果】 免疫組織染色法によって、胎生レベル12.5日マウス上腕骨ではH3K9メチル化酵素の発現とH3K9の修飾は極めて低レベルであった。内軟骨性骨化の進行により前肥大軟骨細胞形成が始まる胎生14.5日マウス上腕骨では、前肥大軟骨細胞から肥大軟骨細胞にかけてH3K9メチル化酵素の発現と、H3K9のメチル化、特にH3K9me1 H3K9me2の局在が増えた。胎生16.5日の上腕骨においても同様の結果を得た。さらに、リアルタイムPCR法やwestern blot 法により、H3K9メチル化酵素の発現とH3K9メチル化が前肥大軟骨細胞以降で増加することがmRNAレベルとタンパク質レベルで確認された。成長板で得られた免疫組織染色の結果は抗原賦活化の有無に関係なく同様であった。精巣では抗原賦活化を実施しない場合、H3K9me2とH3K9acのシグナルのみが認められ、他は極めて低いレベルにあった。抗原賦活化を実施した場合、すべてのH3K9の修飾、メチル化酵素の発現、核内タンパク質のシグナルが認められた。

【結論】 以上の結果より、内軟骨性骨化過程で様々な転写因子による発現調節が知られている前肥大軟骨細胞以降でH3K9のメチルとそのメチル化酵素の発現が顕著に認められることが明らかとなった。これらの結果は内軟骨性骨化の緻密な分化制御遺伝子の発現にH3K9の修飾が関与する可能性を示唆している。また、精細胞と軟骨細胞の免疫組織染色法によって得られたシグナルが抗原賦活化の有無によって大きく異なったことから、H3K9の修飾とそのメチル化酵素の組織内、細胞内局在を免疫組織染色法にて観察する場合、異なる核構造を考慮し、細胞種ごとに抗原賦活化や組織固定時間などを検討する必要性が強く示唆された。

なお、本論文 (一部を含む) が掲載された主な学術論文は以下のとおりである。

- [1] Ideno H, Takanabe R, Shimada A, Imaizumi K, Araki R, Abe M and Nifuji A.: Protein related to DAN and cerberus (PRDC) inhibits osteoblastic differentiation and its suppression promotes osteogenesis *in vitro*. *Experimental Cell Research*, Vol. 315, Issue 3, pp.474-484 (2009)
- [2] Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K and Nifuji A.: Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse plate cartilage. *Gene Expression Patterns*, Vol. 13, Issue 3-4, pp.84-90 (2013)

以上の研究成果は、2編ともElsevier社から出版されている権威ある国際学術雑誌 (いずれも査読付き) に掲載されており、専門家から高い評価を得ている。以上のことから、出野尚氏の本論文は、博士 (人間科学) の学位を授与するに十分値するものと認める。

以 上