

## 免疫組織染色法によるヒストンH3リジン9の修飾と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

### Immunohistochemical detection of methylated histone H3 lysine 9 and histone methyltransferases and implication of their roles during skeletal cell differentiation

出野 尚 (Hisashi Ideno) 指導：今泉 和彦

#### 【研究の背景と目的】

超高齢社会にある日本で高齢者が健康で自立した生活を続けるためには筋骨格系組織の機能維持が重要である。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生活の質 (Quality of life: QOL) 向上に繋がる。骨は形成と吸収によるリモデリングが一生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<sup>1)</sup>。

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。主に長管骨で見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 (SRY (sex determining region Y) -box 9) の発現によって軟骨細胞分化を開始し、その後Ihh (Indian hedgehog)、Runx2 (runt related transcription factor 2) など分化段階特異的な遺伝子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<sup>2)</sup>。

ヒストン修飾の一つ、ヒストンH3の9番目のリジン残基 (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。この関連を明らかにすることは、骨形成における遺伝子の発現制御の解明に限らず、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、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、さらに、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<sup>3)</sup>。

#### 【方法】

##### 免疫組織染色法

胎生12.5日、14.5日、16.5日のマウス上腕骨、生後2週のマウス精巣をPFA (paraformaldehyde) による固定の後、5 $\mu$ mのパラフィン包埋切片を作成した。H3K9のメチル化 (-me1, -me2, -me3) とアセチル化 (-ac)、H3K9メチル化酵素のG9a, GLP (G9a-like protein), SETDB1 (SET domain, bifurcated 1), PRDM2 (PR domain containing 2, with ZNF domain), SUV39H1 (suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)), SUV39H2 (suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila))、軟骨分化マーカーのCOL2A1 (collagen, type II, alpha 1, COL10A1 (collagen, type X, alpha 1)、核内タンパク質のPCNA (proliferating cell nuclear antigen) に対する抗体を用いた。抗原賦活化はクエン酸バッファーによる加熱 (80 $^{\circ}$ C、20分) にて実施した。

##### mRNA発現解析

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200 $\mu$ mの組織スライスを作成し各々から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)、軟骨分化マーカー (Col2a1, Col10a1, Ihh, Pth1r) の発現をしらべた。

##### タンパク質発現解析

mRNA解析と同様に胎生16.5日マウス上腕骨から作成した組織スライスよりタンパク質を抽出した。western blot法にて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 (G9a,

Glp, Setdb1, Prdm2, Suv39h1, Suv39h2) の発現と、H3K9のメチル化、特にH3K9-me1、H3K9-me2の局在が増え、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、western blot法により、H3K9メチル化酵素の発現とH3K9の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わらず同様であった。

一方、精巣では抗原賦活化を実施しない場合、H3K9me2、H3K9acのシグナルのみが認められ、他は非常に低いシグナルレベルにあった。抗原賦活化を実施した場合、全ての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】

以上より、内軟骨性骨化過程でIhhやRunx2など様々な転写因子による発現制御が知られている前肥大軟骨細胞以降でH3K9のメチル化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、細胞種ごとに異なる細胞質構造、核構造を考慮し、抗原賦活化や組織固定時間などの条件を検討する必要性が強く示唆された。

#### 【参考文献】

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*, 315 (3) : 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 growth plate cartilage development. *Gene Expression Patterns*, 13(3-4) : 84-90 (2013).

3) Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Imaizumi K, Nakamura Y, Kimura H, Araki R, Abe M, Nakashima K and Nifuji A: Search for conditions to detect epigenetic marks and nuclear proteins in immunostaining of the testis and cartilage. *Journal of Histology*, 2014: Article ID 658293, 1-8 (2014).