

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20075

研究課題名(和文) NGSを用いたOA関連遺伝子の網羅的解析と、5-hmC変動が解き明かす病態機序

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of OA-related gene using NGS and pathophysiological mechanism revealed by 5-hmC status change

研究代表者

長谷井 嬢 (Hasei, Joe)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：40636213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：次世代RNAシーケンスでTWIST1はヒトOA軟骨で高発現している事が示唆され、OA軟骨組織では正常軟骨組織と比較して約10倍にTWIST1が発現上昇していた。TWIST1をヒト軟骨細胞に過剰発現させることでMMP1、MMP3が発現上昇していた。ヒト不死化軟骨細胞株にTWIST1を過剰発現させると、MMP3プロモーターにおける5hmCステータス上昇が確認できた。TWIST1をTC28に恒常的に高発現させると、TET1発現が上昇し、TET triple KO fibroblastにTWIST1を発現誘導させると、TET triple KO 細胞ではMMP3の発現誘導が抑制された。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that TWIST1 is highly expressed in human OA cartilage in the next generation RNA sequence, and expression of TWIST1 increased 10-fold in OA cartilage tissue as compared with normal cartilage tissue. Expression of MMP1 and MMP3 was elevated by overexpressing TWIST1 in human chondrocytes. Overexpression of TWIST1 in a human immortalized chondrocyte cell line confirmed a 5hmC status increase in the MMP3 promoter. When TWIST1 was constitutively overexpressed in TC28, TET1 expression increased and TWIST1 expression was induced in TET triple KO fibroblast, the induction of MMP3 expression was suppressed in TET triple KO cells.

研究分野：骨軟部腫瘍 軟骨代謝

キーワード：TWIST1 5hmC 軟骨 OA MMPs

1. 研究開始当初の背景

本邦における変形膝関節症(膝 OA)の患者数は1,200万人に達すると言われ、人口の高齢化と共に増加の一途を辿っており、QOLの低下だけでなく、その医療費もまた膨大であり新規薬剤の開発が期待されている領域である。薬剤開発、また再生医療分野での研究発展の為に、OA病態に係わり異化作用を誘導するマスター遺伝子の同定と、そのエピジェネティクスの解明が必須である。これら遺伝子探索には、ヒト軟骨組織を用いた次世代シーケンサー等での網羅的な解析が最も有効であるが、本邦においては倫理委員会の承認などの問題も多く、正常軟骨の入手が困難である事も重なり、研究進展の律速段階となっている。

5-hmcは“第6の塩基”とも呼ばれ、近年発見された修飾塩基であり、DNA脱メチル化経路において中間体としての役割を担っている(5-メチルシトシン(5-mC)から5-hmCに変換される)が、5-hmC自体が塩基としてエピジェネティックな調節を行っていると考えられており、現在最も注目されている分野の一つであるがOAにおける役割については未解明の領域である。本研究は、マスター遺伝子の探索と共に、軟骨代謝や異化作用にかかわる遺伝子の発現制御機構を5-hmcを介した経路に着目して行う。

2. 研究の目的

申請者らは、米国スクリプス研究所において、新規治療標的分子同定の為にヒト軟骨組織を用いた次世代RNAシーケンスを施行し、TWIST1がOA軟骨で約10倍に発現上昇している事を見出した。また、ヒト軟骨細胞にTWIST1を過剰発現させる事で、軟骨破壊に直接的にかかわるMMP3の発現が著しく上昇する事をも新たに見出した。この現象は、3ドナーのヒト軟骨細胞を用いて、再現性を有する事も確認済みである。この際、TWIST1がMMP3プロモーターのCpG領域の一部で5-hmc statusを上昇させている事も確認した。つまりMMP3のプロモーター領域の脱メチル化を促進して発現誘導した可能性がある。TWIST1が5-hmc statusに影響を与えるのなら、マスター遺伝子としてMMP3以外のgeneも変動させている可能性があり、5-hmc抗体でのChIPと次世代シーケンスや、micro arrayを組み合わせる事で、generalな現象を捉えられる。この全く新しいアプローチによる治療ターゲット探索が、薬剤開発へと繋がる可能性がある。本研究では、NGS解析から導かれたTWIST1の、MMP等の異化作用にかかわる遺伝子発現調節機序を5-hmCに着目し解明を行う。本研究の5-hmCという新規着眼点からの結果は次期薬剤開発への礎となる事が期待される。

3. 研究の方法

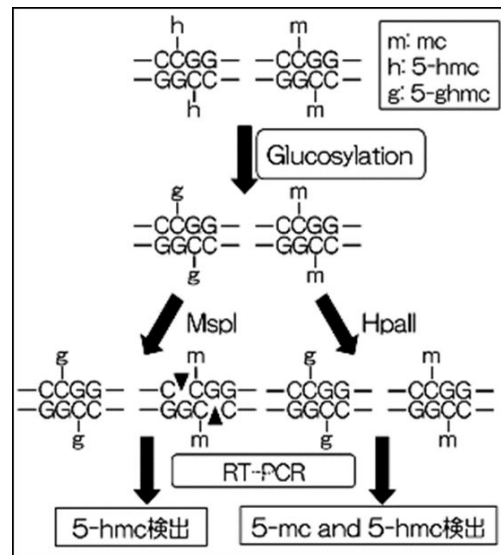
In Vitroでの、軟骨細胞へ与えるTWIST1の

異化作用誘導メカニズムを解明する。OAでTWIST1が発現上昇している事からIL-1刺激下でのTWIST1発現変動と、IL-1刺激下でのTWIST1抑制によるMMPの変動を確認する。24well plateに5x10⁴ cellsのヒト軟骨細胞を播種し、24時間後に無血清培地に変更しIL-1を1ng/ml加える。処理時間は6時間、12時間で回収を行い、qRT-PCR, western blotでTWIST1, MMPファミリーの変動を調べた。

MMP3プロモーターはTWIST1結合サイトを4カ所有し、MMP3プロモーター領域をpE-Luc-testベクターに組み込みルシフェラーゼレポーターアッセイを行う。Luc活性に変動があった場合は結合サイトのmutationベクターを作製し、活性変動を確認する。TWIST1過剰発現ベクターのDNA結合領域を欠損させたpcDNA3.1-TWIST1ベクターを作製し、MMP3発現の変化も確認した。

正常・OAヒト軟骨組織、マウスOAモデル膝を用いてTWIST1, MMP3, 5-hmcの免疫染色を行う。本実験は米国スクリプス研究所のMartin Lotz教授協力の下遂行する。マウスOAモデル作成法も経験豊富なLotz labの手法に準じて行い、術後2週、4週、8週の組織を用いて免疫染色を行った。

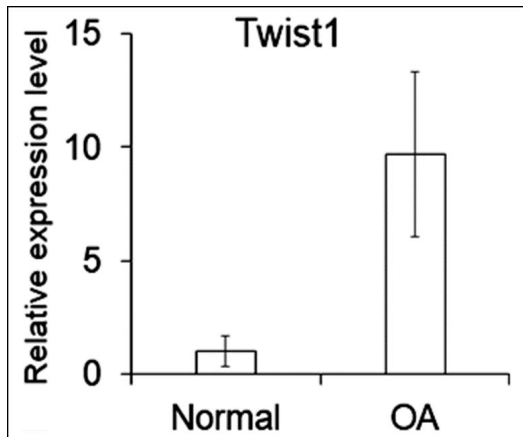
TC28へのTWIST1過剰発現後DNA抽出を行い、Beta-GT glucosylate処理後、メチル化感受性の異なる制限酵素MspIとHpaIIでDNA切断し、target siteのプライマーを用いてRT-PCRで検出を行った。本手法により5-mc, 5-hmcの発現レベルと5-hmc単独の発現レベル検出が可能である。



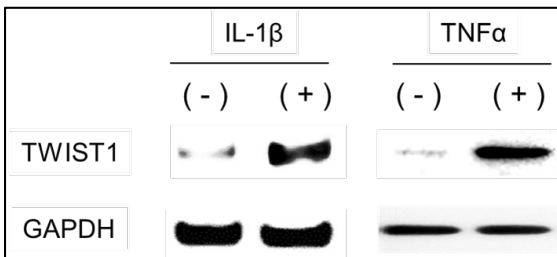
TWIST1が5-hmcを介してMMP3発現を増加させているならば、TETタンパク非存在下では誘導効果を有さない事が予測される。TET tripke KO ES細胞から線維芽細胞を誘導しTWIST1を強制発現させて遺伝子変化をqRT-PCR, western blotで確認する。

4. 研究成果

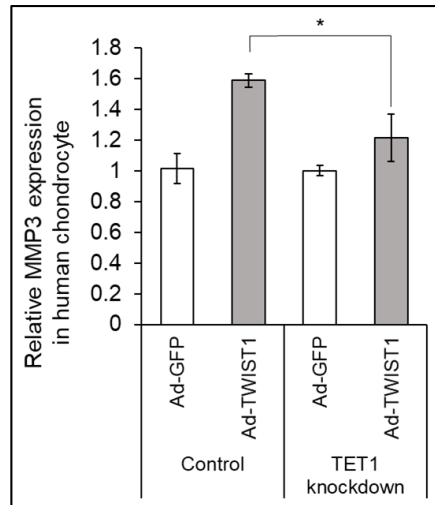
次世代 RNA シークエンスで TWIST1 はヒト OA 軟骨で高発現している事が示唆されたが、OA 軟骨組織では実際正常軟骨組織と比較して約 10 倍に発現上昇していることが qRT-PCR で検出された。



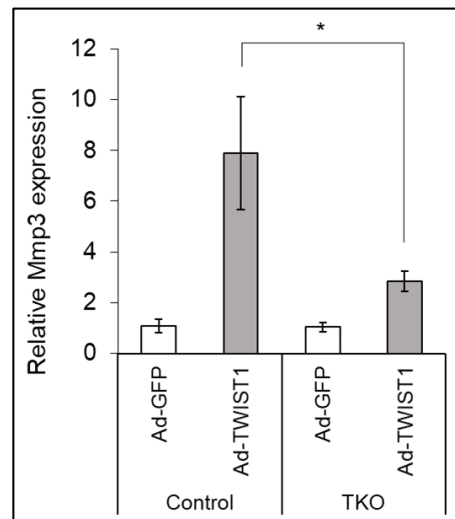
ヒト軟骨細胞に IL-1 β , TNF α のサイトカイン刺激をすることで TWIST1 発現の上昇が qRT-PCR, western blot の両方で確認できた。



TWIST1 をヒト軟骨細胞に過剰発現させることで、幅広く MMPs の発現が誘導されたが、中でも MMP1, MMP3 が効率に発現上昇していた。MMP1, MMP3 プロモーターへの影響をルシフェラーゼアッセイで確認したところ、TWIST1 は MMP1 プロモーターへ結合し活性上昇させていることが明らかとなったが、MMP3 プロモーターへの影響は観察されなかった。ヒト軟骨組織を用いた免疫染色では OA 軟骨では正常と比較して 5hmC ステータスの増加が見られたことから、ヒト不死化軟骨細胞株 (TC28) にアデノウイルスを用いて TWIST1 を過剰発現させると、MMP3 プロモーターにおける 5hmC ステータスの上昇が確認できた。またヒト軟骨細胞では TWIST1 過剰発現させることで TET1, TET3 の発現が上昇していた。TWIST1 を TC28 に恒常的に高発現させると、TET1 の発現が著しく上昇する事が明らかになった。TET1, 2, 3 triple KO ES 細胞から fibroblast を誘導し、TWIST1 を、アデノウイルスを用いて発現誘導させると、TET triple KO 細胞では MMP3 の発現誘導が抑制された。



また、軟骨細胞で siTET1 使用下で TWIST1-アデノウイルスを感染させた場合も、MMP3 の発現誘導が抑制された。



今後は TWIST1 が 5-hmC を介して変動させる遺伝子を網羅的に解析する事で、新たなエピジェネティクスの解明を行う予定である。

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)

Hasei J, Teramura T, Takehara T et al. (その他 8 人)、TWIST1 induces MMP3 expression through up-regulating DNA hydroxymethylation and promotes catabolic responses in human chondrocytes, Sci Rep., 査読有、2017、doi: 10.1038/srep42990.

〔学会発表〕(計 2 件)

長谷井 嬢、TWIST1 による 5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)ステータス変動が引き起こす OA における新規エピジェネティクスの解明、日本整形外科学会基礎学術集会、平成 28 年 10 月 13 日-14 日、福岡国際会議場(福岡)。

長谷井 嬢、TWIST1 による 5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)ステータス変動を介した新規 OA 発症エビジェネティクスの解明、日本整形外科学会基礎学術集会、平成 29 年 10 月 26-27 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

〔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

長谷井 嬢 (HASEI, Joe)
岡山大学病院整形外科・医員
研究者番号：40636213

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()