

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03836

研究課題名（和文）DNAメチル化制御による骨形成促進機構の解明と骨再生法への応用

研究課題名（英文）The mechanism of bone formation by DNA methylation and its application

研究代表者

波多 賢二（Hata, Kenji）

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：エピジェネティックな遺伝子発現調節機構の一つであるDNAメチル化は様々な生命現象に關与する。本研究では、骨芽細胞分化を制御するDNAメチル化機構を分子レベルで明らかにし、DNAメチル化制御による革新的な骨形成誘導法の開発を目的として研究を行った。最新のエピジェネティクス解析技術を用いて様々な間葉系細胞のDNAメチル化および遺伝子発現の統合解析を行い、骨芽細胞に特異的なDNAメチル化遺伝子を明らかにした。さらに、骨形成を促進するDNAメチル化阻害剤のスクリーニングにも成功した。本研究は、DNAメチル化を標的とした効率的な骨再生の技術開発とその社会実装に貢献すると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の高齢化社会の到来に伴い、歯周病や骨粗鬆症を代表とする骨代謝疾患の患者数が増大し社会的問題となっており、骨形成を促進する再生療法や治療薬の開発が望まれている。本研究では、遺伝子発現制御機構の一つであるDNAメチル化に着目し、最新の全ゲノム解析技術を用いて骨形成の分子メカニズム解明と骨再生への応用を検討した。その結果、骨形成に重要なDNAメチル化遺伝子を明らかにするとともに、DNAメチル化を阻害することで骨形成を促進する薬剤のスクリーニングに成功した。本研究結果の学術的意義は高く、科学的知見に基づいた骨再生法の開発に貢献すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：DNA methylation, one of the regulatory mechanisms of epigenetic gene expression, plays important roles in various biological phenomena. In this study, we aimed to elucidate the DNA methylation mechanism that regulates osteoblast differentiation at the molecular level and to develop an innovative method to induce bone formation. We performed integrated analysis of DNA methylation and gene expression in various mesenchymal cells and identified DNA methylation genes that regulate osteoblast differentiation. In addition, we successfully screened for DNA methylation inhibitors that promote bone formation. This study would contribute to the development of novel technology for efficient bone regeneration targeting DNA methylation and its social implementation.

研究分野：口腔生化学

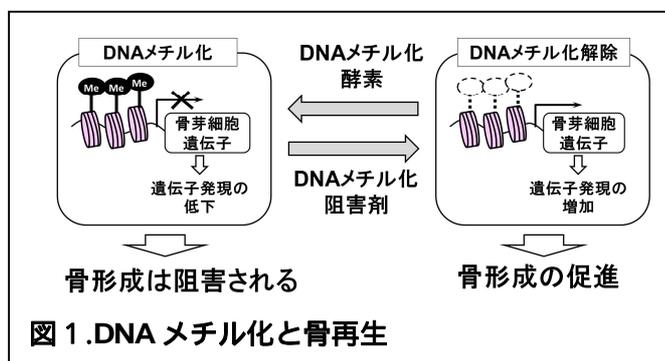
キーワード：骨形成 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会の到来に伴い、歯周病や骨粗鬆症を代表とする骨代謝疾患の患者数が増大し社会的問題となっている。歯周病の進行により失われた歯槽骨の再生は、歯科領域において古くから重要な臨床的課題であり、FGF2 による再生療法が保険収載されたが、重度に骨を欠損する歯周疾患に対する、より有効な歯槽骨再生療法の確立には至っていない。

効率的な骨組織再生には、足場（マトリックス）と増殖分化調節因子に加えて、骨芽細胞の起源となる「幹細胞」の存在が必須である。しかし、バイオマテリアル研究の分野で「足場」や「増殖分化調節因子」の改良が飛躍的に進んでいるにもかかわらず、幹細胞から誘導される骨芽細胞集団の不均一性や分化効率の低さが、「幹細胞」において解決すべき大きな問題として残されている。この問題解決のアプローチとして近年その重要性を増しているのが、DNA 塩基配列の異常を伴わない遺伝子発現制御機構、すなわち“エピジェネティクス”である。そして、様々なエピジェネティクス制御機構のなかでも、細胞の発生・分化・老化さらには疾患との深い関連性が示唆されているのが DNA メチル化である。

DNA メチル化は DNA の塩基配列を変化させずに遺伝子発現のオン・オフを調節するメカニズムである。遺伝子領域またはその近傍には CpG が密集した領域（CpG アイランド）が存在し、DNA メチル化酵素（DNAmethyltransferase：DNMT）によりメチル化されると遺伝子発現が抑制される（図



1 参照)。実際、皮膚線維芽細胞では骨芽細胞特異的の基質であるオステオカルシン遺伝子の DNA メチル化が亢進している。そして、筋肉細胞や脂肪細胞において DNA の脱メチル化を誘導すれば特定の細胞へと分化誘導することが可能であることも明らかとなっている(Cell 1997)。

したがって、効率的な骨再生法を確立するためには、骨芽細胞分化に特異的な DNA メチル化機構を分子レベルで理解したうえで DNA メチル化酵素を阻害し、DNA メチル化を解除することにより骨形成を促進させるアプローチが有効となる（図 1 参照）。

しかし、骨芽細胞分化における DNA メチル化の機能的役割は不明であり、また骨再生を効率的に誘導する DNA メチル化阻害剤の検索や臨床応用への展開に関しても検討すべき課題が多いのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、「骨形成を制御する DNA メチル化の分子メカニズムは何か？また、その知見をどのように骨再生へと応用するか」を研究課題の核心をなす「問い」に設定し、分子メカニズムを基盤とした骨再生を目指す。そのための研究アプローチとして、まず骨芽細胞分化に関与する DNA メチル化機構の詳細を分子レベルで明らかにする。次に得られた知見に基づき、骨形成を促進する DNA メチル化阻害剤または DNA メチル化制御因子を決定する。最終的には、DNA メチル化を標的とした効率的な骨再生の技術開発の社会実装に貢献することを最大の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 骨芽細胞分化における DNA メチル化の解析

CpG リッチ領域を濃縮し CpG 領域に絞り込んだ解析を行うことで、効率よく個々のシトシン塩基のメチル化状態を解析することが可能な RRBS (Reduced representation of bisulfite sequencing) を用いて、骨芽細胞における DNA メチル化領域の解析を行う。

生後 0 日齢マウスの頭蓋骨より初代培養骨芽細胞、肋軟骨より初代培養軟骨細胞、さらに初代培養皮膚線維芽細胞を採取する。骨芽細胞、軟骨細胞および皮膚線維芽細胞からゲノム DNA を精製した後、制限酵素 MspI を用いてゲノム DNA の断片化、ならびにプロモーター領域と CpG アイランドの濃縮を行う。その後、メチル化されていないシトシンを脱アミノ化しウラシルに変換するバイサルファイト処理を行い、イルミナ NGS プラットフォームを利用してバイサルファイトシーケンシングを行う。

得られたシーケンスデータはバイサルファイト処理後の配列をマッピングするためのツールである Bismark を用いて解析する。

#### 骨芽細胞分化の遺伝子発現解析

骨芽細胞、軟骨細胞および皮膚線維芽細胞から RNA を採取し、細胞内で発現する全ての転写物の配列情報を読み取り定量化する RNA-seq により遺伝子発現の網羅的解析を行う。

#### 統合解析による DNA メチル化機構の解明

と の統合解析から、他の細胞に比較して骨芽細胞で発現が高く DNA メチル化が低い遺伝子群を同定する。これらの遺伝子群を骨芽細胞分化に関与する DNA メチル化変動遺伝子として抽出する。

#### 骨形成を促進する DNA メチル化阻害剤のスクリーニング

骨芽細胞分化に対する様々な DNA メチル化阻害剤の効果を検討し DNA メチル化阻害剤を網羅的に選別する。具体的には、骨芽細胞への分化能を有する間葉系細胞 ST2 細胞を現在入手可能なすべての DNA メチル化阻害剤で処理し、骨芽細胞分化培地で培養する。その後 AlP 染色、Von Kossa 染色さらに RT-qPCR 法で骨芽細胞分化マーカーを評価し、最も骨芽細胞分化誘導能の高い DNA メチル化阻害剤をスクリーニングする。

### 4. 研究成果

#### 骨芽細胞の DNA メチル化プロファイリング

初代培養骨芽細胞、初代培養軟骨細胞および初代培養皮膚線維芽細胞からゲノム DNA を採取し RRBS 法により DNA メチル化領域の解析を行った。シーケンスデータをマッピングした後、DNA メチル化部位の抽出を行った。次に methyKkit を用いて各細胞における DNA メチル化率の算出とヒストグラムの可視化を行った結果、いずれの細胞においてもメチル化部位が問題なく抽出されていることを確認した (図 2)。

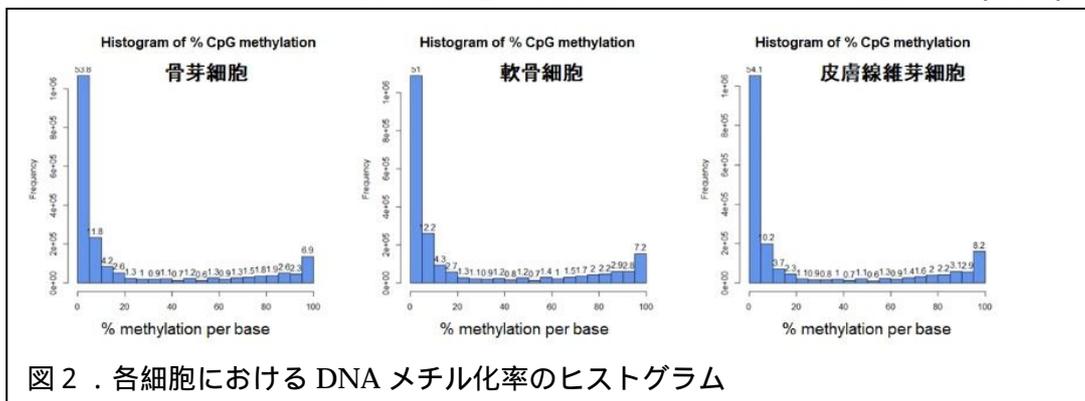


図 2 . 各細胞における DNA メチル化率のヒストグラム

次に、骨芽細胞と軟骨細胞、または骨芽細胞と皮膚線維芽細胞の2つのサンプル間でDNAメチル化がどのように変化しているかの解析を行った。DNAメチル化変動領域の分布を全ゲノムで検討した結果、DNAメチル化が変動した領域の約10%はプロモーター領域に存在することが明らかとなった(図3)。

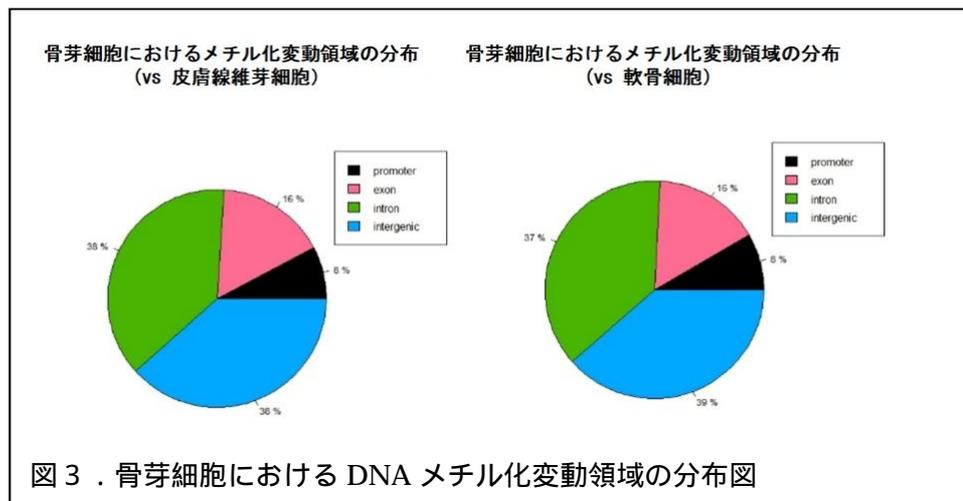


図3. 骨芽細胞におけるDNAメチル化変動領域の分布図

皮膚線維芽細胞に比較して骨芽細胞においてDNAメチル化率が低い遺伝子群として515個の遺伝子を、また骨芽細胞においてDNAメチル化率が高い遺伝子群として376個の遺伝子を同定した。同様の解析を軟骨細胞と骨芽細胞で行った結果、骨芽細胞においてDNAメチル化率が低い遺伝子群として487個の遺伝子を、また骨芽細胞においてDNAメチル化率が高い遺伝子群として560個の遺伝子を同定した。

#### 統合解析による骨芽細胞におけるDNAメチル化機構の解明

骨芽細胞における遺伝子発現とDNAメチル化の関連性を明らかにするために、骨芽細胞、軟骨細胞および皮膚線維芽細胞からRNAを採取し、RNA-seqを行った。その結果、皮膚線維芽細胞に比較して骨芽細胞で2倍以上に発現が増加した遺伝子を1657個、軟骨細胞に比較して骨芽細胞で2倍以上に発現が増加した遺伝子を1728個同定した。これらRNA-seqにより変動がみられた遺伝子群と、DNAメチル化率が変化した遺伝子の統合解析を行った結果、DNAメチル化により発現増加する骨芽細胞の遺伝子として45個(vs 皮膚線維芽細胞)および47個(vs 軟骨細胞)の遺伝子を同定することに成功した(図4)。

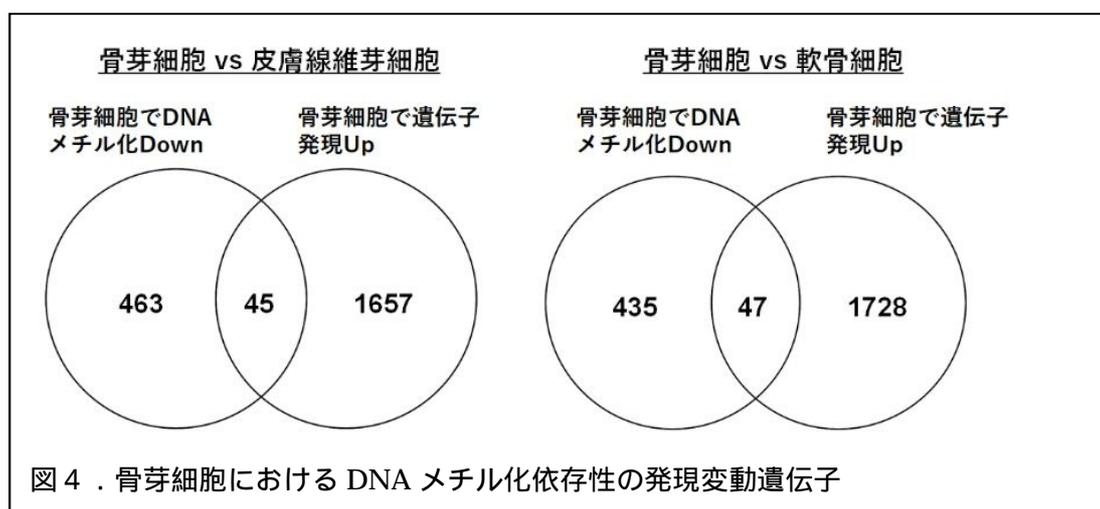


図4. 骨芽細胞におけるDNAメチル化依存性の発現変動遺伝子

骨形成を促進するDNAメチル化阻害剤のスクリーニング

薬剤を用いて DNA メチル化酵素を阻害することで骨芽細胞に重要な遺伝子の転写を促進し骨形成を促進する方法の探索を行った。そのためのアプローチとして、7種類の DNA メチル化酵素阻害剤 (RG108, 5-Aza2', 5-Aza, Hydralazine hydrochloride, Procinamide, Procaine, Zebularine)を入手し骨芽細胞分化に対する効果を検討した。まず、がん細胞を用いて行っている先行研究を参考に細胞毒性を誘導しない使用濃度を決定した。MC3T3E1 細胞を、上記の DNA メチル化酵素阻害剤で 2 日間処理した後、BMP2 を添加し 4 日間培養した後 RNA を採取し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子(Alpl, Runx2, Sp7 および Ocn)の発現を RT-qPCR により検討した。その結果、5 $\mu$ M RG108 および 0.5mM Procaine の 2 種類の DNA メチル化酵素阻害剤が BMP2 誘導性の骨芽細胞分化を増強させることを見出した(図 5)。

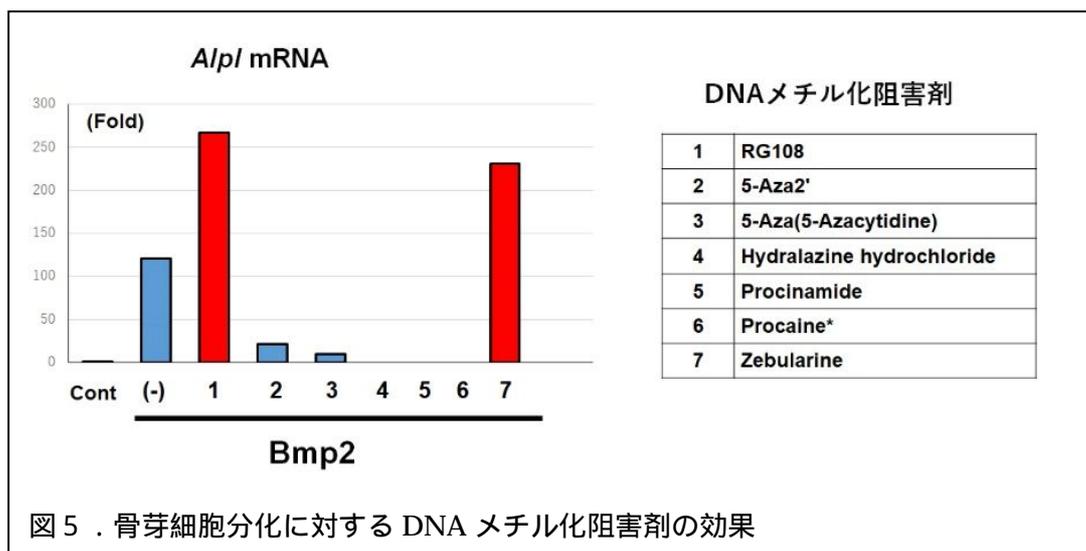


図 5 . 骨芽細胞分化に対する DNA メチル化阻害剤の効果

これら DNA メチル化酵素阻害剤による骨芽細胞分化の促進作用に細胞増殖が関与するか否かを検討するために、WST1 アッセイにより骨芽細胞の細胞増殖に対する効果を検討した。その結果、RG108 は骨芽細胞の細胞増殖に影響を及ぼさないことが明らかとなった。以上の結果は、RG108 はエピジェネティックにサイレンシングされた骨芽細胞遺伝子を脱メチル化により再活性化することにより骨形成を促進していることが明らかとなった。

さらに、骨量減少を引き起こす骨粗しょう症において骨芽細胞が減少する一方で脂肪細胞が増加していることに着目した。そして、脂肪細胞においてDNAメチル化により遺伝子発現が阻害されている骨芽細胞遺伝子のDNAメチル化を解除することで、骨形成が回復するか否かを検討した。その結果、骨芽細胞および脂肪細胞の両方の細胞への分化能を有する未分化間葉系細胞ST2および前駆脂肪細胞3T3-L1細胞において、RG108はRunx2,ALPase,オステオカルシンおよびSp7といった骨芽細胞分化のマーカー遺伝子の発現を増加させることを見出した。以上の結果より、RG108は脂肪細胞ならびに未分化間葉系細胞の骨芽細胞分化能を増進することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nishimura R, Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nakamura E, Ohkawa M, Ruengsinpinya L               | 4. 巻<br>21              |
| 2. 論文標題<br>Role of Signal Transduction Pathways and Transcription Factors in Cartilage and Joint Diseases. | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Int J Mol Sci.   | 6. 最初と最後の頁<br>1340-1356 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms21041340  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Ono Koichiro, Hata Kenji, Nakamura Eriko, Ishihara Shota, Kobayashi Sachi, Nakanishi Masako, Yoshida Michiko, Takahata Yoshifumi, Murakami Tomohiko, Takenoshita Seiichi, Komori Toshihisa, Nishimura Riko, Yoneda Toshiyuki | 4. 巻<br>4             |
| 2. 論文標題<br>Dmrt2 promotes transition of endochondral bone formation by linking Sox9 and Runx2  | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>326-336 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-021-01848-1  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する          |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>波多賢二               |
| 2. 発表標題<br>軟骨細胞分化のエピジェネティクス機構 |
| 3. 学会等名<br>日本軟骨代謝学会（招待講演）     |
| 4. 発表年<br>2020年               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kenji Hata   |
| 2. 発表標題<br>Epigenetic Regulation of Chondrocyte Differentiation |
| 3. 学会等名<br>Japan Bone Academy（招待講演）                             |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>K. Hata, K. Ono, E. Nakamura, S. Kobayashi, Y. Takahata, T. Murakami, R. Nishimura. |
| 2. 発表標題<br>Dmrt2 promotes transition of endochondral ossification by linking Sox9 and Runx2    |
| 3. 学会等名<br>2021 ECTS Digital Congress (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |