

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18066

研究課題名（和文）エピゲノムを標的とした骨粗鬆症に対する新規治療標的分子の探索

研究課題名（英文）Investigation of novel therapeutic targets for osteoporosis targeting the epigenome

研究代表者

柳原 裕太（Yanagihara, Yuta）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・特定助教

研究者番号：20865703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまで、DNAメチル化維持機構がどのように軟骨細胞分化・骨格形成を制御しているのか、不明であった。そこで、DNA維持メチル基転移酵素であるDnmt1に注目し、四肢特異的Dnmt1欠損（Dnmt1^{Prx1}）マウスを用い、研究を展開した。その結果、DNAメチル化維持機構は、軟骨細胞のエネルギー代謝を遺伝子発現制御及び代謝産物制御の双方を介して成長軟骨板の石灰化による骨格形成を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症の発症者数は加齢に伴い増加し、我が国の40歳以上の有病率は男性で43%、女性では62%と超高齢社会の現代において罹患率の高い疾患である（Yoshimura, et al. JBMM. 2009）。現時点でのOA治療は治療効果が限定的であるヒアルロン酸関節内注射や手術療法がほとんどであり、健康寿命の延伸のためにも関節軟骨機能を維持・再生する有効な予防・治療法の開発が強く望まれている。本研究において軟骨細胞内のエネルギー代謝を制御することで、軟骨細胞の機能を調節できることを示した。この成果は、OA等の軟骨変性を呈する疾患の予防法の開発基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：It is unclear whether the effect on chondrocyte differentiation is mediated with Uhrf1-specific or Dnmt1. Therefore, in this study, we analyzed the function of Dnmt1 in chondrocytes using limbs specific Dnmt1 deficient (Dnmt1^{Prx1}) mice with the aim of clarifying the roles of Uhrf1 and Dnmt1 in chondrocyte differentiation. Through this study, we found that Dnmt1-mediated appropriate maintenance of DNA methylation governs chondrocyte mineralization by regulating energy metabolism through both gene expression and metabolite supply. These findings suggested that DNA methylation maintenance mechanism plays a critical role in normal limb development.

研究分野：骨・軟骨

キーワード：Dnmt1 軟骨細胞 エピジェネティクス エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

日本をはじめ先進国では平均寿命は延長しているものの、健康寿命との差は縮まっておらず、高齢者（65歳以上）の5人に1人は介護が必要な状況となっている。超高齢社会において、高齢者が健やかに生活できることは、医療・介護の両面から極めて重要であり、健康寿命の延伸は大きな課題である。健康寿命を損なう原因として「関節疾患」、「骨折・転倒」が33%を占めており（平成28年厚生労働省国民生活基礎調査）、関節疾患及び骨折の大きなリスク要因である骨粗鬆症の予防及び治療は健康寿命の延伸に必要不可欠である。これらの疾患の治療は飛躍的に進歩しているものの、加齢に伴う骨関連細胞の分子メカニズムの変化は未だ不明な点が多く残っている。この分子メカニズムの解明は、新規治療標的を探索するためにも極めて重要である。

加齢に伴う疾患の多くは、ゲノムDNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の制御機構である“エピゲノム”の異常に関わることが報告されている（Sangita Pal, et al. *Sci. Adv.*, 2016）。このことから、加齢による運動機能低下メカニズムの解明にはゲノム情報のみならず、エピゲノムを理解することが必要である。

2. 研究の目的

申請者の研究室では、運動器疾患モデルを用いたゲノムワイド遺伝子発現解析から、DNAのメチル化維持機構を担う Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1 (Uhrf1) が最も大きな発現変動を示すことを明らかにした。Uhrf1 は DNA 複製時にヘミメチル化 DNA を認識し、DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) をメチル化が必要な DNA 上に集積する働きを担っている。Uhrf1 を四肢の間葉系細胞特異的に欠損させたマウスの解析により、四肢の骨異形成が認められ、細胞・組織の表現型として、軟骨分化に著名な異常を呈することを見出した（Yamashita M, et al. *Development*, 2018）。加えて、この四肢特異的 Uhrf1 遺伝子欠損マウスでは、骨密度の低下も認められた。しかしながら、Uhrf1 が骨代謝に及ぼす詳細なメカニズムについては全く不明であった。また、Uhrf1 と共役し、実際に DNA をメチル化する酵素である Dnmt1 の骨代謝への影響も明らかとなっていない。そこで、本研究では骨代謝における Uhrf1 及び Dnmt1 の機能を明らかにし、骨粗鬆症の新規治療標的分子の同定することを当初の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、DNA のメチル化維持機構が骨関連細胞へ及ぼす影響の解明を以下の手順で試みた。

実験 (1) 細胞種特異的遺伝子欠損マウスの作出及び解析

Uhrf1 と Dnmt1 は骨芽細胞、破骨細胞及び軟骨細胞の分化に伴い発現が低下することを確認しており、発現の高い分化初期に重要な役割を担っていることが示唆された。そこで、分化段階の初期に Cre を発現するマウス(下記参照)と Uhrf1 及び Dnmt1 flox マウスとの交配により、各細胞種特異的 Uhrf1 及び Dnmt1 遺伝子欠損マウスを作出する。各マウスから採取した長管骨の骨構造解析を実施し、Uhrf1 及び Dnmt1 の骨代謝機能への作用を評価する。

Prx1-Cre (Limb mesenchymal stem cell)、
Osx-Cre (Pre-osteoblast)
Col1-Cre (Osteoblast)
LysM-Cre (Monocyte and macrophage)

実験 (2) 初代培養細胞の分化及び機能の解析

(1)の実験で骨表現型に差が認められたマウスの細胞の分化及び機能を解析する。

分化能はマウスから単離した初代培養細胞に分化を誘導し、経時的な分化マーカー遺伝子の発現量を RT-qPCR を用いて測定し、評価する。また、細胞の機能は骨芽細胞及び軟骨細胞においてはアリザリンレッド染色により石灰化能を評価、破骨細胞においては酒石酸ナトリウム活性を測定し細胞活性度を評価する。

実験 (3) 初代培養細胞を用いた遺伝子発現及びメチル化 DNA の網羅的解析

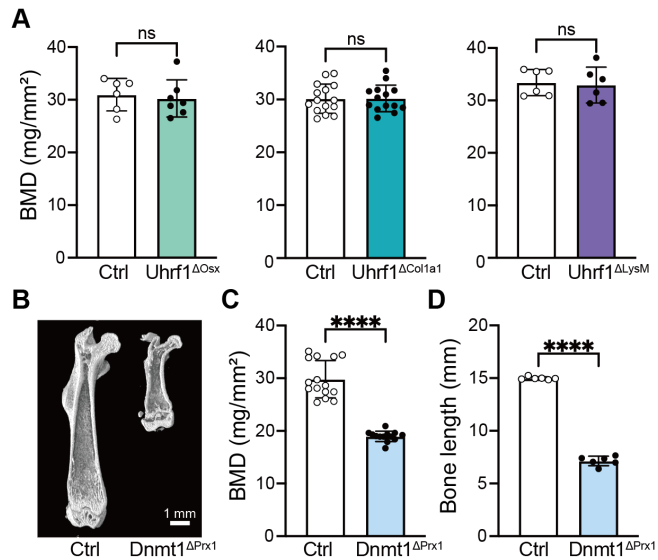
(2)の実験から採取したマウスの細胞から、RNA 及びメチル化 DNA を抽出し、RNA-Seq 及び MBD-Seq を実施することで、骨関連細胞における Uhrf1 または Dnmt1 の機能ならびに直接的なメチル化標的遺伝子を明らかにする。このメチル化標的遺伝子が、骨関連疾患の治療標的となることが推察されるため、更なる解析を実施する

4. 研究成果

Uhrf1 flox マウス及び Dnmt1 flox マウスを実験 (1) で示した各 Cre マウスと交配した結果、Osx-Cre、Coll1-Cre、LysM-Cre との交配では、コントロール (Ctrl) マウスと細胞種特異的 KO マウス間の骨密度に差は認められなかった (右図 1 A)。一方で、Prx1-Cre を用いた四肢間葉系細胞特異的 Uhrf1 または Dnmt1 欠損 (*Uhrf1^{ΔPrx1}*, *Dnmt1^{ΔPrx1}*) マウスは、Ctrl マウスと比較し、骨長が著しく短縮し、骨密度も有意に低値を示す表現型が確認された (右図 2B, C, D)。*Uhrf1^{ΔPrx1}* マウスにおいて、この表現型はすでに報告しているものの、Uhrf1 と共役する Dnmt1 を介した事象であるのか定かではない。そこで、本研究では骨格形成期における Dnmt1 の詳細な分子メカニズムを解明すべく、*Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスを解析することとした。

Dnmt1^{ΔPrx1} マウスの長管骨の骨長は Ctrl マウスの 45-60% 程度であり、*Uhrf1^{ΔPrx1}* マウスよりも顕著な長管骨の短縮を示した。長軸方向への骨の伸長には、成長板軟骨が寄与していることから、長管骨の組織学的解析を実施した。その結果、1 週齢の *Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスにおいては Ctrl マウスと比較し、骨幹端の増殖軟骨層の菲薄化、肥大軟骨層の増大および石灰化の促進を認めた。これらの結果から、*Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスでは軟骨細胞の増殖能は低下し、軟骨細胞分化が加速していることが示唆された。一方、6 週齢の *Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスにおいては、海綿骨が消失しており、このことが骨密度の低下の要因であると考えられた。そこで、海綿骨の消失以前 (2 週齢) の長管骨で骨代謝に関連する骨芽細胞及び破骨細胞の局在を組織学的に評価した。骨表面積あたりの骨芽細胞面積に *Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスと Ctrl マウス間での差は認められなかったが、破骨細胞面積は *Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスが高値を示した。以上の結果から、Dnmt1 は主に軟骨細胞分化過程において重要な役割を担い、骨格形成を制御している可能性が示唆された。次に、Dnmt1 によって発現制御され、軟骨細胞分化に影響を及ぼす遺伝子を同定するため、マウス膝関節から単離した軟骨細胞を用い、RNA-Seq とメチル化 DNA 領域のシーケンスとの統合解析により、Dnmt1 欠損に伴う DNA メチル化の減少によって発現が増加した遺伝子を絞り込んだ。その結果、DNA メチル化低減により発現上昇した遺伝子群はエネルギー代謝に関連していることが明らかとなった。そこで、軟骨細胞内のエネルギー代謝産物の挙動を網羅的に把握すべく、メタボローム解析を実施した結果、*Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスの軟骨細胞において石灰化に重要な役割を担う ATP をはじめ、TCA サイクル及び解糖系の代謝産物量のほとんどが高値を示すことが明らかとなった。これらのことから、Dnmt1 欠損に伴うエネルギー代謝関連遺伝子の発現上昇に加え、グローバルな DNA メチル化低減により、メチル化・脱メチル化基質の消費が限定されたことを起点とした細胞内のエネルギー代謝変化との統合的な亢進であることが明らかとなった。

さらに、*in vitro* においてグルコースおよびグルタミンの濃度依存的に石灰化が更新すること、並びに各種エネルギー代謝経路の阻害剤により *Dnmt1^{ΔPrx1}* マウスの軟骨細胞において亢進している石灰化が抑制されることを明らかにした。この結果は、エネルギー代謝制御により軟骨細胞の石灰化をコントロールできることを示している。以上のことから、関節軟骨の細胞内エネルギー代謝を制御することで、OA における関節軟骨の変性を制御できる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柳原 裕太、今井 祐記
2. 発表標題 Dnmt1は成長板軟骨細胞の正常分化に必須である
3. 学会等名 第7回骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Yanagihara, Yuuki Imai
2. 発表標題 Dnmt1 maintains normal differentiation of growth plate chondrocytes
3. 学会等名 Herbert Fleisch Workshop 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳原 裕太、今井 祐記
2. 発表標題 Dnmt1は軟骨細胞の正常分化に必須である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳原裕太
2. 発表標題 Dnmt1は成長板軟骨細胞の増殖・分化を制御し四肢の発達を正常に維持する
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳原裕太
2. 発表標題 Dnmt1は成長軟骨の正常発達に必須である
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳原裕太
2. 発表標題 Dnmt1はエネルギー代謝を介して軟骨細胞分化を制御する
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuta Yanagihara, Masatomo Takahashi, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Yuuki Imai
2. 発表標題 DNA methylation determines bone length through growth plate mineralization by regulating chondrocyte energy metabolism
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------