

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689066

研究課題名(和文) エピゲノムを駆使した革新的骨・関節疾患治療戦略開発の基盤構築

研究課題名(英文) Basic approach for investigating epigenetic therapeutic strategies for bone and joint diseases

研究代表者

今井 祐記 (IMAI, YUUKI)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：10423873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,900,000円、(間接経費) 5,370,000円

研究成果の概要(和文)：骨関節疾患のエピゲノム制御機構解明のため、軟骨細胞分化過程における遺伝子発現マイクロアレイにより、Aireを同定した。Aireには、hypomethylated lysinを認識するPHDドメインがあり、Aireの軟骨分化における機能を解析したところ、Aireが軟骨分化を促進すること、その機能はBmp-2転写調節領域のH3K4me2の制御であることが明らかとなった。また、DNase-seqにより骨吸収を担う破骨細胞分化に過程におけるクロマチンの構造変換を捉え、開いたクロマチンの配列情報と遺伝子発現データから分化を制御する新規転写因子の同定に成功した(JBMR 2014 in press)。

研究成果の概要(英文)：To clarify regulatory mechanism on epigenetics in bone and joint diseases, we identified Aire as a novel regulator in chondrocyte differentiation using gene expression microarray. Aire possesses PHD domain, which recognizes hypomethylated lysine residues of histone proteins. As the results of analyses of molecular function, Aire can facilitate chondrocyte differentiation through regulating status of histone H3K4me2 in promoter region of Bmp-2 (Si et al BBRC 2013). In terms of osteoclasts, which resorb bone matrix, we tried to figure out dynamic chromatin remodeling during osteoclastogenesis using DNase-seq. Based on the combined information from gene expression and DNase-seq, we successfully identified novel transcription factors in osteoclastogenesis (Inoue et al. JBMR 2014 in press).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨関節疾患 エピゲノム 軟骨細胞 破骨細胞 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む先進諸国では、生命寿命のみならず、QOLを保ち、いわゆる健康寿命をも延ばしていくことが必須の克服課題である。健康長寿の獲得に向けて、重要な役割を担う骨関節をはじめとする運動器疾患の予防・治療は、近年大きな進歩を遂げてはいるものの、合併症の克服などの未だ解決すべき問題が多く残されている。予防・治療法の向上は病態解明の深さと比例しており、これらの問題を克服するためには、新たな骨関節疾患病態解明や発症メカニズムの理解が深まり、期待される革新的な予防・治療法の開発が必要である。

骨粗鬆症や変形性関節症をはじめとする骨関節疾患の大部分は、老化・ホルモン欠乏・メカニカルストレスなど様々な後天的要因により、発症や病態の進行を認める。これらの要因は、各個人が生まれながらに持っている遺伝子(ゲノム)情報自体を操作するわけではなく、遺伝子情報の引き出し方=転写調節に影響し、疾病の発症や進行を引き起こすと考えられる。新たな病態解明のためには、これらの要因による遺伝子発現調節メカニズムの詳細な分子機構の解明が必要であり、全てのゲノム情報が解読された現在、いわゆる遺伝子情報のみでは説明困難な生物現象が、第2の遺伝暗号とも言われるエピゲノム制御を理解することで解き明かされつつあり、注目を集めている。エピゲノム制御とは、ゲノムを構成する要素(DNAやヒストン蛋白など)が種々の酵素により修飾を受けた結果、クロマチン構造の変換により、遺伝子の発現レベルを調節するシステムである。すでに、欧米では、エピゲノム制御病態分子メカニズムの臨床応用として、主に癌に対するエピゲノム修飾調節による疾患治療への試みが開始され、一部は臨床試験にまで至っている(Karberg S, Cell 2009)。これはひとえに癌に対するエピゲノム制御の分子メカニズ

ムの解明がすすんだ結果であるが、骨・関節疾患におけるエピゲノム制御は未だほとんど解明されていない。そこで、骨・関節疾患の発症・進行に及ぼす種々の要因によるエピゲノム変化をとらえ、エピゲノム制御を中心とした新たな角度からの疾患病態が解明できれば、革新的治療戦略開発の基盤構築が可能となると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

骨・関節疾患におけるエピゲノム制御因子およびそのメカニズムの解明をめざし、骨粗鬆症/変形性関節症/関節リウマチの3疾患を対象に研究をすすめる。前述の如く、これらの疾患におけるエピゲノム制御はほぼ不明と言ってよいため、まずは各疾患において発症・進行に最も関連すると考えられるエピゲノム制御因子の同定とエピゲノム修飾プロファイルを明らかにすることを第一の目的とする。そのためには、各疾患における主要な細胞種、軟骨細胞と破骨細胞に注目した。これらの細胞は、それぞれ間葉系幹細胞および造血幹細胞から分化する事が明らかとなっているが、これらを制御するエピゲノム機構は不明であるため、これ同定、解析する。

3. 研究の方法

軟骨細胞については、C3H10T1/2細胞を用いたペレット培養法により、骨形成因子(BMP-2)による分化誘導培養細胞レベルでの間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化過程に沿った遺伝子発現プロファイルの解明を遺伝子発現マイクロアレイを用いて行う。得られたデータをバイオインフォマティクスを用いて解析し、転写および転写関連因子に属する候補遺伝子を抽出し、real time RT-PCRにより再現の検討を行う。さらに、特にヒストン修飾についてエピゲノム修飾変動を標的遺伝子について評価する。

また、破骨細胞については、マクロファ-

ジ系細胞株 RAW264 細胞を用いて、RANKL 刺激による分化培養系を利用する。細胞分化における遺伝子発現制御機構の一つにクロマチン構造変換があるが、破骨細胞分化におけるクロマチンの動的な構造変換は明らかにされていないため、広がったクロマチン領域の塩基配列を解析可能な DNase-seq を行い、同定する。得られた情報を元に、エピゲノム制御および分化に関連する転写因子の同定を行い、その細胞レベルでの重要性を遺伝子ノックダウン実験により解析する。

4. 研究成果

C3H10T1/2 細胞を用いたペレット培養法にて rhBMP-2 による分化誘導系を応用して、遺伝子発現マイクロアレイにより、遺伝子発現変動する転写制御因子の同定を行い、各因子を qRT-PCR にて検証した結果と各タンパクのドメイン構造から、Aire を同定した。Aire には、hypomethylated lysin を認識する PHD ドメインがあることや Aire 遺伝子変異患者では、骨端軟骨異形成症を来す事が報告されている。Aire の軟骨分化における機能を解析したところ、Aire が軟骨分化を促進すること、その機能は Bmp-2 転写調節領域のヒストン H3K4me2 の制御であることが明らかとなった (Si et al BBRC 2013)。また、骨吸収をになう破骨細胞分化に過程におけるクロマチンの構造変換を捉え、開いたクロマチンの配列情報と遺伝子発現データから分化を制御する転写因子の同定に成功した (Inoue et al. JBMR 2014 in press)。

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 16 件)

1. Inoue K and Imai Y.

Identification of Novel Transcription Factors in Osteoclast Differentiation using Genome-wide Analysis of Open

Chromatin Determined by DNase-seq.

J Bone Miner Res. 2014 Mar 28. doi: 10.1002/jbmr.2229. [Epub ahead of print] (査読有)

2. Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi J, Kanno J, Bonewald L, Imai Y.

Estrogen receptor in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice.

Bone. 2014 Mar;60:68-77. doi: 10.1016/j.bone.2013.12.005. (査読有)

3. Okuno Y, Inoue K, Imai Y.

Novel insights into histone modifiers in Adipogenesis.

Adipocyte. 2013 Oct 1;2(4):285-8. doi: 10.4161/adip.25731. (査読有)

4. Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y.

Autoimmune regulator, Aire, is a novel regulator of chondrocyte differentiation.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 Aug 9;437(4):579-84. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.001. (査読有)

5. Imai Y., Youn MY, Inoue K, Takada I, Kouzmenko A, Kato S

Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases

Physiol Rev. 2013 Apr;93(2):481-523. doi: 10.1152/physrev.00008.2012. (査読有)

6. Inoue K, Inoue E, Imai Y.

Female sex hormones ameliorate arthritis in SKG mice

Biochem Biophys Res Commun. 2013 May 17;434(4):740-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.111. (査読有)

7. Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Shirole-Fukuda Y, Yu T, Sekine K, Sato T, Kawano H, Aihara K, Nakamichi Y, Watanabe T, Shindo M, Inoue K, Inoue E, Tsuji N, Hoshino M, Karsenty G, Metzger D, Chambon P, Kato S, [Imai Y](#). Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control **Endocrinology**. 2013 Mar;154(3):1008-20. doi: 10.1210/en.2012-1542. (査読有)
8. Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, [Imai Y](#). Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase **Diabetes**. 2013 May;62(5):1426-34. doi: 10.2337/db12-0628. (査読有)
9. Youn MY, Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Ohtake F, Minehata KI, Yasuda H, Suzuki T, Kato S, [Imai Y](#). JMJD5, a JmjC-domain-containing protein, negatively regulates osteoclastogenesis by facilitating NFATc1 protein degradation. **J Biol Chem**. 2012 Apr 13;287(16):12994-3004. doi: 10.1074/jbc.M111.323105. (査読有)
10. Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, [Imai Y](#), Kim JH, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder R, Brown M, Kato S. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination **Nature**. 2011 Nov 27;480(7378):557-60. doi: 10.1038/nature10656. (査読有)
11. Manaka T, Suzuki A, Takayama K, [Imai Y](#), Nakamura H, Takaoka K. Local delivery of siRNA using a biodegradable polymer application to enhance BMP-induced bone formation. **Biomaterials**. 2011 Dec;32(36):9642-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.026. (査読有)
12. Okamoto M, Murai J, [Imai Y](#), Ikegami D, Kamiya N, Kato S, Mishina Y, Yoshikawa H, Tsumaki N. Conditional deletion of Bmpr1a in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice. **J Bone Miner Res**. 2011 Oct;26(10):2511-22. doi: 10.1002/jbmr.477. (査読有)
13. [Imai Y](#), Kouzmenko A, Kato S. Targeting Fas/FasL signaling, a new strategy for maintaining bone health **Expert Opin Ther Targets** 2011 Oct;15(10):1143-5. doi: 10.1517/14728222.2011.600690. (査読有)
14. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, [Imai Y](#), Rimm DL, Liu XS, Brown M. Targeting Androgen Receptor in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer **Cancer Cell** 2011 Jul 12;20(1):119-31. doi: 10.1016/j.ccr.2011.05.026. (査読有)
15. Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, [Imai Y](#), Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S. PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. **Nat Cell Biol**. 2011 Jun;13(6):668-75. doi: 10.1038/ncb2228. (査読有)

16. Yasuda T, Kometani K, Takahashi N, Imai Y, Aiba Y, Kurosaki T.
ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation.
Sci Signal. 2011 Apr 19;4(169):ra25.
doi: 10.1126/scisignal.2001592.
(査読有)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 今井祐記、井上和樹、骨疾患におけるエピジェネティック制御、第 40 回日本毒性学会学術年会、2013.6.17、千葉
2. 今井祐記、性ホルモン欠乏による骨粗鬆症の分子基盤、第 12 回日本抗加齢医学会総会、2012.6.23、横浜
3. 今井祐記、SERM による骨代謝制御、第 31 回日本骨代謝学会学術集会、2013.5.30、神戸
4. 今井祐記、骨代謝制御における性ホルモン受容体の生体内機能解明、第 85 回日本生化学会、2012.12.16、福岡
5. 今井祐記、Estrogen Exerts Osteoprotective Function through Facilitating Bone Formation via ER in Osteocytes、15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer、2012.11.16、金沢
6. 今井祐記、軟骨代謝制御における性ホルモン受容体の機能解析、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012.10.26、名古屋
7. 今井祐記、Osteoblastic Androgen Receptor mediates androgenic

anabolic actions in Bone remodeling、骨細胞における ERα の高次機能解析、第 30 回日本骨代謝学会学術集会、2012.7.19-21、東京

8. 今井祐記、破骨細胞分化におけるエピジェネティック制御、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012.7.17、仙台
9. 今井祐記、性ホルモン受容体による骨代謝調節、第 54 回日本老年医学会学術集会、2012.6.27、東京

〔その他〕
ホームページ等
愛媛大学 プロテオサイエンスセンター病態生理解析部門 / 大学院医学系研究科病態生理学講座ホームページ
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imailab>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
今井 祐記 (IMAI Yuuki)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授
研究者番号：10423873
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし