

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659115

研究課題名(和文)破骨細胞を標的にしたエピゲノム創薬に資する分子基盤の確立

研究課題名(英文)Epigenetic regulation involved in osteoclast differentiation

研究代表者

西川 恵三(Nishikawa, Keizo)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：30516290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：骨吸収機能を介して骨の恒常性にかかわる破骨細胞は、マクロファージ系前駆細胞より分化する。この破骨細胞の分化制御を司る転写制御の研究は、これまで勢力的に取り組まれているが、エピジェネティクス制御の重要性は、ほとんど明らかにされていない。本研究は、破骨細胞分化に伴って発現上昇するメチル基転移酵素が、破骨細胞の形成に重要な役割を担うことを明らかにした。さらに、当該遺伝子に対する阻害剤を用いた解析によって、骨粗鬆症治療の重要な標的になることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Although transcriptional regulation involved in osteoclast differentiation has extensively studied, epigenetics in osteoclasts have poorly understood. Our studies have demonstrated that methyltransferase enzyme whose expression is increased during osteoclastogenesis play an important role in osteoclast differentiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：破骨細胞 エピジェネティクス 転写因子 転写制御 細胞内代謝 メタボライト SAM DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

これまでの破骨細胞の転写研究は、主に活性化型転写因子 (NFATc1 や NFkB など) による破骨細胞分化を正に制御する転写制御機構の解析が中心であった。近年、我々は、抑制型転写因子による抑制性転写制御が、破骨細胞の促進に重要な役割を担うことを見出した。即ち、Blimp1 が破骨細胞分化の抑制因子 (IRF8 や MafB など) を抑制することで、抑制性の転写制御機構が破骨細胞分化を促進することを報告した (PNAS 2010)。本成果によって、破骨細胞分化を司る転写制御機構には、活性化型転写調節と抑制型転写調節が複雑に関わり合う制御基盤があることが明らかとなった。我々は、さらに、抑制性の転写制御機構の詳細な解析を進めた結果、近年、抑制性のエピジェネティクス制御機構にかかわるいくつかの転写因子が、破骨細胞分化に重要な役割を担うことを見出した。

2. 研究の目的

関節リウマチや骨粗鬆症に伴う運動器障害は、高齢化社会を背景に重大な社会問題である。この病態発症には、骨吸収活性をもつ破骨細胞の分化促進が深く関係していることから、破骨細胞を標的にもつ骨吸収抑制剤の開発は重要である。従来、骨吸収抑制剤に見られるように、破骨細胞の生存に影響を与えるビスホスホネート系製剤であったり、破骨細胞の分化初期過程を阻害する抗 RANKL 抗体医薬や破骨細胞の骨吸収機能を阻害するカタ

プシン K 阻害剤など、異なる作用点をもつ薬の開発は重要な発展研究に位置づけられる。当然のことながら、我々が研究対象としている転写制御は、新たな創薬標的の可能性をもつが、核内受容体を除けば、核内の分子機構を標的とした創薬研究はほとんど例を見ない。しかし、近年、ヒストン修飾酵素などの阻害剤が抗癌剤として有効であることが示されていることから、核内のエピジェネティクス制御を標的とした創薬研究は黎明期にあるとも考えられる。そこで、本研究では、破骨細胞の分化・成熟過程にかかわるエピジェネティクス制御機構の解明に取り組むことで、『破骨細胞のエピゲノム創薬』に資する分子基盤の確立を目的とした。

3. 研究の方法

以下の3点の研究計画を実施した。

(1) 破骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスを作出することで、メチル基転移酵素の生体レベルでの重要性を、 μ CT や病理標本を用いることで、骨組織に対する形態学的影響を解析した。

(2) 遺伝子改変マウス由来の細胞を用いて、破骨細胞を分化誘導する初代培養を実施することで、メチル基転移酵素の重要性を細胞レベルで検証した。

(3) 卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症マウスを作出し、メチル基転移酵素の阻害剤を長期投与することで、病態改善効果を、 μ CT や病理標本を用いることで解析した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスの解析。

破骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスを作出するために、メチル基転移酵素の flox マウスと破骨細胞特異的に Cre を発現する系統であるカテプシン K-Cre マウスとの交配を行った。作出した破骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスの骨表現型を解析した結果、顕著な骨量増加を観察した(図 1)。さらに、骨形態計測の結果から、有為な破骨細胞数の減少が見られた。これらの結果は、メチル基転移酵素が破骨細胞の分化に生体レベルで重要であることを示している。

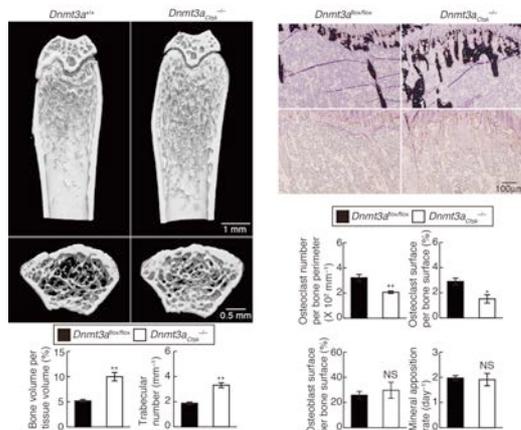


図1 破骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスの骨表現型

(2) 破骨細胞分化における、メチル基転移酵素の重要性の検証。

メチル基転移酵素の細胞自律的な重要性を明らかにするために、破骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスから骨髄細胞を採取し、破骨細胞の分化誘導実験を行った。その結果、メチル基転移酵素の欠損によって、破骨細胞の分化が阻害されることが明らかとなった(図 2)。一方、破骨前駆細胞の増殖や生存には、影響が見られなかった。以上の結果から、メチル基転移酵素が、破骨細胞の分化に重要な役割を担うことが示唆される。

(3) メチル基転移酵素を標的とした閉経後骨粗鬆症の治療実験。

メチル基転移酵素特異的な阻害剤である TF3 を用いた治療実験を試みた。卵巣を摘出したマウスは、有為な骨量減少を呈する。一方で、TF3 を投与したマウス群においては、

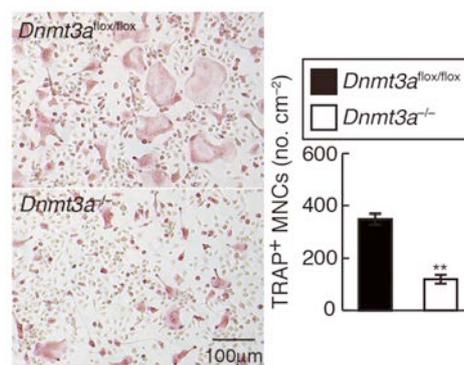


図2 破骨細胞分化に対するメチル基転移酵素の役割
骨量減少に対して抵抗性を示した(図 3)。これらの結果は、TF3 が骨粗鬆症の有効な治療薬候補となることが推察される。

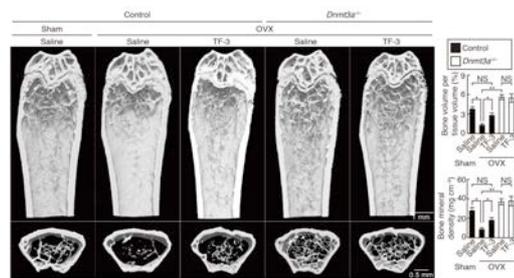


図3 メチル基転移酵素阻害剤を用いた閉経後骨粗鬆症マウスの治療実験

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 4 件)

- ① 西川 恵三、老人性骨粗鬆症に関する分子機構の解明と創薬応用、日本老年医学会雑誌 49, 314-317, 2012
- ② 西川 恵三、遺伝子操作を用いた新規レポーターマウスの作出方法、実験医学別冊 202-211, 2013
- ③ Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, Mimori K, Naito Y, Ishii T, Okuzaki D, Nishida N, Maeda S, Naito A, Kikuta J, Nishikawa K, Nishimura J, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Matsuda M, Kikuchi A, Mori M, Ishii M, Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. PLoS one 30, e83629, 2013

- ④ Nishikawa K, Iwamoto Y, Ishii M,
Development of an *in vitro* culture
method for stepwise differentiation of
mouse embryonic stem cells and induced
pluripotent stem cell into mature
osteoclasts. *Journal of Bone and
Mineral Metabolism* in press.

[学会発表] (計9件)

- ① 西川 恵三、破骨細胞のエピジェネティック制御機構の解明、アステラス病態代謝研究報告会 東京 2012年10月20日
- ② 西川 恵三、骨生物学の分子基盤の解明と創薬応用、奈良先端未来開拓コロキウム 奈良 2012年12月7日
- ③ 西川 恵三、岩本 依子、石井優、胚性幹細胞・誘導多能性幹細胞から破骨細胞を分化誘導する培養法の開発、第35回日本分子生物学会 福岡 2012年12月12日
- ④ 西川 恵三、骨生物学の分子基盤の解明と創薬応用、奈良先端未来開拓コロキウム 奈良 2012年12月7日
- ⑤ 西川 恵三、破骨細胞分化にかかわる細胞内エネルギー代謝調節の分子機構と生理的意義の理解、若手ワークショップ@鬼怒川 栃木 2013年1月25日
- ⑥ 西川 恵三、抑制性転写制御から理解する破骨細胞分化の制御機構、第4回新医学領域創生セミナー 宮城 2013年5月23日
- ⑦ 西川 恵三、岩本 依子、石井優、胚性幹細胞・誘導多能性幹細胞から破骨細胞を分化誘導する培養法の開発、第86回日本生化学会年会 神奈川 2013年9月12日
- ⑧ 西川 恵三、Dnmt3a as a novel nexus coordinating metabolism and epigenetics in osteoclasts、13th IFRc Colloquium 大阪 2013年12月18日

- ⑨ 西川 恵三、岩本 依子、石井優、
Development of an *in vitro* culture
method for stepwise differentiation of
mouse embryonic stem cells and induced
pluripotent stem cell into mature
osteoclasts.、第87回日本薬理学会年会
宮城 2014年3月20日

[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

西川 恵三 (NISHIKAWA KEIZO)

大阪大学・免疫学フロンティアケンキュウ
センター・特任助教

研究者番号: 30516290

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし