

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870031

研究課題名(和文) ヒト関節軟骨細胞におけるIL1B遺伝子発現に関わるDNAメチル化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the function of promoter DNA methylation status on IL1B gene regulation in human articular chondrocytes

研究代表者

橋本 功 (Hashimoto, Ko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00718497

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)：変形性関節症(OA)と非OAのヒト大腿骨頭から関節軟骨を採取し、その軟骨細胞から発現している遺伝子を、網羅的(24,460遺伝子)に解析・比較した。以前申請者が欧米人検体で得たデータと異なり、日本人ではOAにおいてIL1Bの発現の亢進はなかった。また日本人で以前報告されたOA関連3遺伝子に加え、新たに未報告の19遺伝子が、日本人のOA関連遺伝子である可能性が示された。さらにOA軟骨細胞での遺伝子発現パターンは、日本人と欧米人で異なる可能性が示唆された。

OA発症に関わるMMP13のDNAメチル化を介した発現調節に関係する転写因子として、FOS、LEF1、CREB3L4が候補に挙げられた。

研究成果の概要(英文)：The gene expression of chondrocytes was exhaustively analyzed (24,460 genes), and compared between osteoarthritic (OA) and non-OA human femoral heads. In contrast to our previous study conducted with caucasian samples, the expression level of IL1B was not upregulated in Japanese OA chondrocytes. In addition to the previously reported 3 OA-related genes in Japanese population, our research newly revealed 19 potential OA-related genes. Moreover, the gene expression patterns of OA chondrocytes were assumed to be different between Japanese and caucasian populations.

The transcription factors, FOS, LEF1 and CREB3L4 were found to be potential transcriptional regulators of MMP13, a key factor of OA pathogenesis, via DNA methylation of its promoter.

研究分野：関節軟骨の分子生物学

キーワード：変形性関節症 遺伝子発現 転写因子 網羅的解析

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis: OA) は関節軟骨の破壊に伴い関節痛や可動域制限を生じる疾患で、一度発症すると進行は不可逆的である。その発症や増悪の機序には未知な点が多く、疾患を根本から予防・治療する方法は未だない。近年、申請者の共同研究者であった故 Roach らは、OA 軟骨細胞が健常細胞と異なり、細胞分裂能と軟骨基質分解酵素の産生能を獲得する傍ら、その産生能が細胞継代を越えて維持されることに着目した。その原因として、細胞継代を越えて維持される DNA メチル化状態の変化が、重要な役割を果たしているという仮説を立てた。そして実際、OA 軟骨細胞での軟骨基質分解酵素の異常発現と DNA メチル化が関連することを示した。これは OA における DNA メチル化の関与を示した世界初の報告であり、以後これを皮切りに OA に関与する種々の遺伝子の DNA メチル化異常について、世界中で活発に研究されている。

以上に続く申請者らの研究により、軟骨基質の破壊に寄与することが明らかとされた種々の軟骨基質分解酵素や炎症性サイトカインの過剰発現が、OA 軟骨細胞内の遺伝子プロモーター領域上の特定配列におけるシトシンの脱メチル化と相関することが明らかとなった。さらに申請者らはエピジェネティクス解析の手法を用い、ヒト関節軟骨細胞内の軟骨基質分解酵素 MMP13 と炎症性サイトカイン IL1B の遺伝子プロモーター領域で、CpG サイトのメチル化状態と遺伝子発現の関係を解析してきた。申請者はこれまで、次のような研究成果を得ている。

- (1) ヒト OA 軟骨細胞での MMP13 と IL1B の過剰発現が、各々のプロモーター領域内の特定の CpG 脱メチル化と相関することを定量的に示した。
- (2) ヒト培養軟骨細胞を炎症性サイトカイ

ンで刺激すると、IL1B プロモーター上で、特定の CpG サイトの脱メチル化を伴って発現が亢進することを明らかにした。

- (3) MMP13、IL1B プロモーター領域の特定の CpG サイトをメチル化すると、各々のプロモーター活性が減弱することを明らかにした。
- (4) ヒト培養軟骨細胞において、IL-1b 添加培養によって起こる IL1B プロモーター-CpG 脱メチル化が、転写因子 NFκB の阻害剤を添加することで緩和されることを明らかにした。
- (5) ヒト軟骨細胞において、MMP13 の転写活性化には転写因子 HIF-2a が重要な役割を果たす。その主たる結合配列に含まれる CpG サイトのメチル化により HIF-2 a の結合が阻害され、MMP13 のプロモーター活性が減弱することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

以上をふまえ、本研究では、変形性関節症の軟骨基質破壊に関与する IL1B 遺伝子の、CpG メチル化機構による発現調節の詳細を解明し、OA の病態解明と根治戦力への手がかりを得ることを目的とした。

**研究課題 (1)** IL1B プロモーター上で、CpG 脱メチル化を介した発現調節に作用する、主たる転写因子を同定する。

**研究課題 (2)** ヒト培養軟骨細胞を IL-1b で刺激することで生じる、IL1B プロモーター上の CpG 脱メチル化に、どのシグナル伝達経路のタンパク群が影響しているかを検索する。さらに CpG 脱メチル化が、どのタンパク群の影響によるかを確認する。

## 3. 研究の方法

実験 (1) OA における DNA メチル化による遺伝子発現制御機構の網羅的解析  
健常および OA のヒト関節軟骨細胞から

RNA を同時抽出する。遺伝子発現マイクロアレイシステム 3D-Gene®(東レ)を用い、OA 軟骨細胞で健常軟骨細胞より多く発現される遺伝子を網羅的に解析する。

実験 (2) IL1B プロモーター上で、CpG 脱メチル化を介した発現調節に作用する、主たる転写因子の同定

申請者が以前示した、ヒト軟骨細胞の IL1B プロモーター上の特定 CpG サイトでの転写調節について、そこに作用する未解明の転写因子を、以下の手順で同定する。

実験 候補となる転写因子の選定  
健常および OA のヒト関節軟骨細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて OA - 健常軟骨細胞の間で発現量が変化する転写因子を網羅的に解析する。さらに、発現量が変化する転写因子が関わる細胞内伝達経路を、パスウェイ解析により同定する。以上により、OA 軟骨細胞で IL1B 遺伝子の発現調節に関与する細胞内伝達経路を網羅的に推定する。

ヒト軟骨細胞は、東北大学とその関連病院で、それぞれ大腿骨頸部骨折(健常)および股関節 OA に対する手術で摘出・廃棄する大腿骨頭の軟骨片から単離して用いる。

#### 4. 研究成果

変形性関節症(OA)と非 OA の大腿骨頭から関節軟骨を採取し、その軟骨細胞から純度の高い RNA を抽出した。OA 9 症例と非 OA 6 症例由来の RNA を、遺伝子発現解析チップ 3D-Gene(東レ)を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行い、2 群間の比較解析を行った。解析した全 24,460 遺伝子中、非 OA 群と比較して OA 群で 917 遺伝子で発現亢進が、773 遺伝子で発現低下がみられた。以前申請者が英国で欧米人検体から得たデータと異なり、日本人では OA での IL1B の発現亢進はみられなかった。

さらに OA 検体と非 OA 検体のクラスター解析を、総当り式に 54 通り(9x6 検体)の組み合わせで行った。その結果、54 通り

全てにおいて OA で発現が亢進していたものは 116 遺伝子、低下したものが 36 遺伝子であった。また日本人で以前報告された OA 関連 3 遺伝子を含む 48 遺伝子からなるクラスターを解析すると、うち 19 遺伝子は未報告の OA 関連遺伝子であることが示唆された。

過去に OA 関連遺伝子と報告されたものは、日本人で 3 遺伝子、欧米人で 50 遺伝子ある。本研究では、日本人の上記 3 遺伝子全てで 2 群間での発現量に有意差がみられた。一方欧米人の OA 関連 50 遺伝子のうち、2 群間で発現に有意差があったものはわずか 16 遺伝子であった。OA 軟骨細胞での遺伝子発現パターンは、日本人と欧米人で異なる可能性が示唆された。日本人と欧米人での OA 軟骨細胞における形質の違

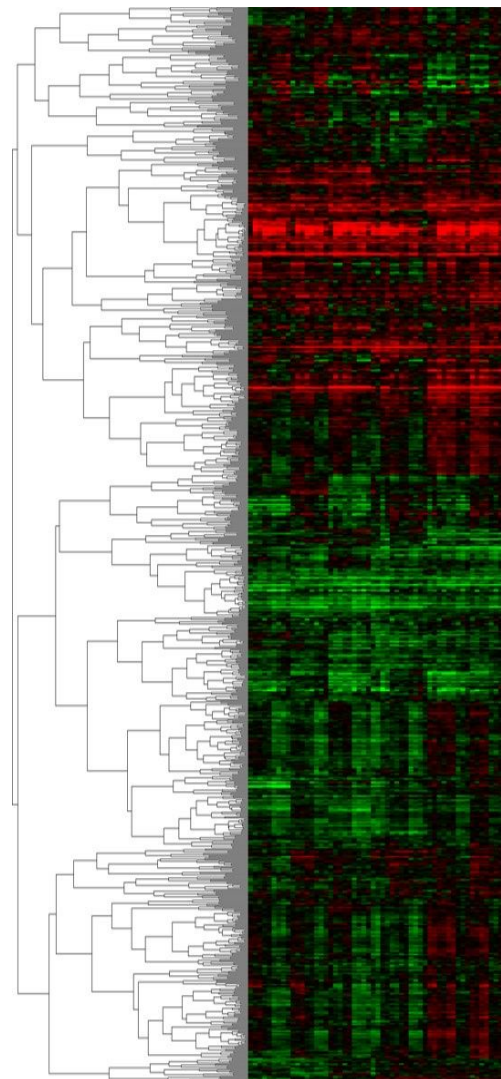


図1 OA と非 OA の 9x6 総当り比較 MMP13 と発現傾向が類似している遺伝子のクラスター解析

いを比較した報告は過去になく、重要な知見である。

一方本研究で使用した日本人 OA 検体では、欧米人同様に MMP13 の発現が亢進していた。その発現調節に関わり、かつプロモーター領域の DNA メチル化によりその機能が変化する可能性がある転写因子を網羅的に解析した(図 1)。その結果、OA 検体では発現が亢進する転写因子として FOS と LEF1 が、低下する転写因子として CREB3L4 が同定された(図 2, 3)。

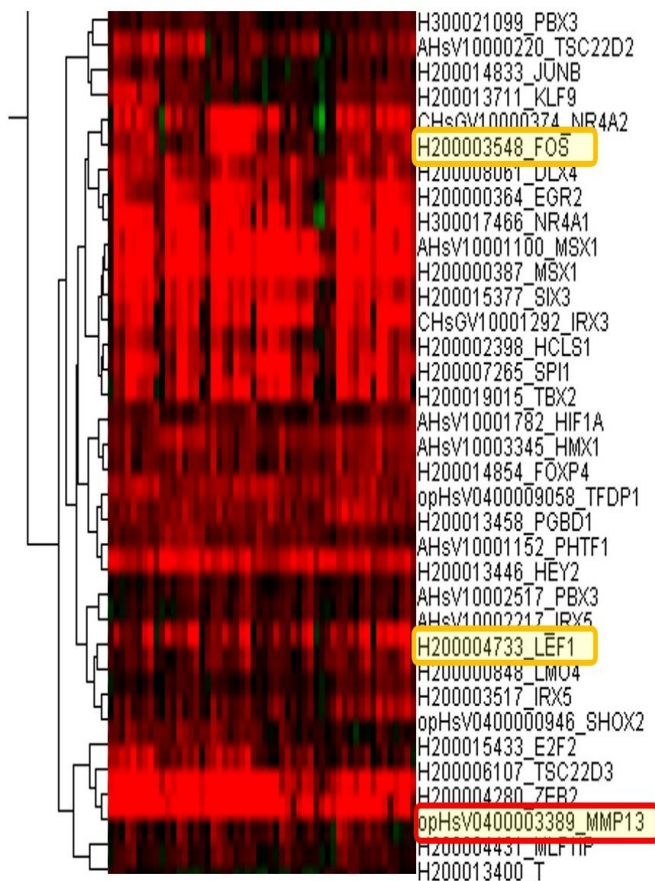


図 2 OA と非 OA の 9x6 総当り比較  
MMP13 と発現傾向が類似している転写因子のクラスター解析

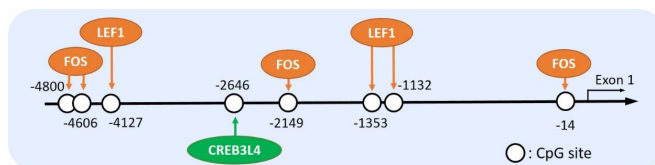


図 3 MMP13 プロモーター領域上の CpG サイトと今回候補に挙げた転写因子の作用部位の関係

## 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)

[学会発表](計 1 件)

Aki T, Hashimoto K, Takahashi A, Ogasawara M, Itoi E. Searching potential transcription factors regulating MMP13 overexpression via promoter CpG methylation status in human osteoarthritic chondrocytes: A microarray screening. World Congress on Osteoarthritis, Amsterdam, Holland, Mar 30-Apr 3, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

橋本 功 (HASHIMOTO, Ko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号 : 00718497

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

( )

### (4)研究協力者

秋 貴史 (AKI, Takashi)

小笠原 将教 (OGASAWARA, Masanori)