

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04961

研究課題名(和文) 運動器疾患に対するエピジェネティック治療標的の探索

研究課題名(英文) Investigation of epigenetic therapeutic targets for musculoskeletal diseases

研究代表者

今井 祐記 (Yuuki, Imai)

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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：健康長寿の獲得が、超高齢社会を迎えたわが国における社会的課題である。そのためには要支援や要介護の原因を取り除く必要があり、骨粗鬆症、変形性関節症、筋肉減少症と行った運動器の疾患を克服する必要がある。これら運動器疾患の治療は、他の疾患と比較して明らかに選択肢が乏しい。その理由は疾患の詳細なメカニズムが解明されていないからである。我々は、疾患が遺伝的因子のみならず環境因子の影響も受けて発症、進展することを想定し、環境因子の一つといえるエピジェネティクスに着目して研究を実施した。その結果、Uhrf1という制御因子によるDNA維持メチル化が軟骨の正常発生に必須であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The physiological functions of Uhrf1 in skeletal tissues remain unclear. We show that limb mesenchymal cell-specific Uhrf1 conditional knockout mice (cKO) exhibit remarkably shortened long bones that have morphological deformities due to dysregulated chondrocyte differentiation and proliferation. Especially, Mmp13 expression was significantly increased in both mRNA and protein levels in cKO mice. Integrative analyses using RNA-seq and MBD-seq revealed that Uhrf1 deficiency decreased genome-wide DNA methylation and increased gene expression through reduced DNA methylation in the promoter regions of 28 genes, including Hspb1. Hspb1 knockdown in cKO chondrocytes can normalize abnormal expression of genes involved in chondrocyte differentiation such as Mmp13. These results indicate that Uhrf1 governs cell-type specific transcriptional regulation by controlling the genome-wide DNA methylation status and regulating consequent cell differentiation and skeletal maturation.

研究分野：整形外科

キーワード：エピジェネティクス 軟骨 ゲノムワイド解析

## 1. 研究開始当初の背景

本邦をはじめとする先進諸国では高齢化がますます進行し、わが国においては高齢化率が24%を上回る(平成25年度)など、多くは超高齢化社会へと突入しつつある。超高齢化社会において、高齢者が健やかに生活できることは、医療・介護の両面からきわめて重要であり、健康長寿の獲得は克服すべき大きな課題である。そのためには、最も問題といえる“寝たきり”にならないようにすることが重要である。なかでも、骨粗鬆症による骨折や関節炎などの運動器疾患が“寝たきり”の原因のおよそ20%を、またその前段階ともいえる“要支援”の原因のおよそ40%を占める(平成22年度厚生労働省国民生活基礎調査)ことから、運動器疾患をいかに予防/治療するかが焦点となる。

多様な疾患に対する新たな予防/治療方法の開発には、病態の詳細な分子メカニズムを明らかにすることがきわめて重要である。近年、ゲノムワイド関連解析(GWAS)の大きな進展にともない、単一遺伝子病に加えて、一塩基多型(SNPs)などの“ゲノム”情報解読によるさまざまなアプローチにより、運動器疾患の病態解明が進みつつある(Estrada et al. Nat Genet 2012など)。しかしながら、多くの運動器疾患は中高年期から進行することから、“ゲノム”に由来する遺伝的要因のみならず、いわゆる環境要素などの後天的要因との関連を考慮することが必須といえる。力学的負荷やホルモン欠乏など様々な後天的ストレス要素に曝露された生体では、“ゲノム”に変化はないものの多様な表現型としての疾患を発症する。このことから、病態の解明にはゲノム情報のみならず、ゲノムからの遺伝子発現を制御する“エピゲノム”を理解することが重要である。エピゲノムとは、ゲノムDNA塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する生物学的メカニズムであり、DNAやヒストン蛋白質の化学修飾・クロマチン構造変換などである。これまで、変形性関節症軟骨細胞におけるDNAメチル化修飾のプロファイルなどが報告されてはいるものの(Jeffries et al. Arthritis Rheumatol. 2014)、国内外を問わず、運動器疾患の発症や進展に関わる“エピゲノム制御因子”の同定、生体における恒常性維持や疾患制御への関与などの機能解析には至っていない。

## 2. 研究の目的

健康長寿獲得に必須である運動器疾患の予防/治療には、既存の治療法に加え、革新的な治療法開発のための斬新なアプローチによる治療標的の探索が必要である。我々は、運動器疾患研究における独創的な着眼点としてエピジェネティクス研究を展開してきた。これまでの先行研究結果から、エピゲノム制御因子Uhrf1が四肢形成・軟骨分化に重要な役割を果たしている事が推察されたた

め、軟骨分化異常により発症/進展する変形性関節症の独創的な治療標的になりうるかと考え、本研究の着想に至った。本研究では、遺伝子改変マウスおよびゲノムワイドデータの統合的解析を用いて、運動器の生理的状態および病態におけるUhrf1の分子機能を生体および細胞レベルで解明することにより、運動器疾患に対するエピジェネティック治療標的の探索を行う。

## 3. 研究の方法

- ・Uhrf1の運動器における生体内機能を、遺伝子改変マウスを用いて明らかにする。
- ・マウスおよび培養細胞を用いて、軟骨細胞分化におけるUhrf1の分子機能を明らかにし、変形性関節症病態のエピジェネティックな予防/治療標的としての分子基盤を明らかにする。

## 4. 研究成果

軟骨分化は様々な転写因子やホルモンにより細かく制御されており、長管骨の長軸成長を担う内軟骨性骨化において大変重要である。近年、細胞分裂の際のDNAメチル化維持制御因子であるUhrf1(Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1)が、癌細胞増殖などに機能を発揮することが報告されている。しかしながら、骨格組織においてはその役割は不明であったため、四肢間葉系細胞特異的Uhrf1KO(*Uhrf1<sup>Limb/Limb</sup>*)マウス(以下cKO)を作成し、骨格組織におけるUhrf1の働きについて解析した。

cKOマウスの外観は四肢長が明らかに短く、関節部位での変形を呈していた。軟X線ではcKO群の四肢長管骨長がControl群に比べ、約31~40%の短縮を認めた。また、組織学的解析ではcKO群の成長軟骨板細胞の柱状配列に乱れを認め、有意な増殖軟骨の面積の減少および肥大軟骨の幅の増加を認めた。さらに、初代培養軟骨細胞を用いた解析においてcKO由来の軟骨細胞では、細胞増殖能の低下とともに分化誘導した際の軟骨基質産生の著明な低下を認めた。軟骨分化マーカーは、Sox9の発現に差を認めないものの、cKO群では、比較的早期の分化マーカーであるCol2a1、Col11a1には発現低下傾向を認めた。一方で、後期分化マーカーであるCol10、Runx2には発現上昇傾向、さらにMmp13には有意な発現上昇がみられた。このことから、Uhrf1遺伝子欠損により軟骨細胞分化が促進され、成長軟骨板における肥大化が進行し、その結果、長管骨長の短縮を認めたと考えられた。さらにRNA-seqの結果からUhrf1KOの軟骨細胞とすでに報告がある造血幹細胞の遺伝子発現変動を比較すると、共通して発現上昇を示したのはわずかに13遺伝子のみであった。RNA-seqとMBD-seqを用いた統合解析を行ったところ、cKO群では発現上昇を認める28遺伝子のプロモーター領域におけるDNAメチル化の減少がみられた。中でもIL-1関連遺伝

子であり、軟骨細胞分化に影響を与えることが知られている Hspb1 に着目し、cKO の軟骨細胞に対し Hspb1 ノックダウンを行なったところ、Mmp13 などの軟骨細胞分化に関与する遺伝子発現異常が救済された。

今回骨格組織において Uhrf1 が細胞増殖のみならず軟骨細胞分化に重要な役割を果たしているという、非常に興味深い結果が得られた。同じ Uhrf1 のノックアウトでも軟骨細胞と造血幹細胞とでは大きな違いが見られ、この結果は Uhrf1 が細胞種特異的な転写調節を行なっていることを示唆している。Uhrf1 はゲノム全体の DNA メチル化状態を制御し、その結果、軟骨細胞においては Hspb1 などの細胞特異的な遺伝子の発現を調節することによって軟骨分化および骨格成熟を制御していると考えられた。今後は、Uhrf1 による DNA メチル化制御が如何に細胞種特異的な遺伝子発現制御に繋がるのかについての研究展開が期待される。

#### 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 12 件) 全て査読有

1. Uematsu A, Kido K, Manabe E, Takeda H, Takahashi H, Hayashi M, Imai Y, Sawasaki T.  
DANFIN functions as an inhibitor of transcription factor NF- $\kappa$ B and potentiates the antitumor effect of bortezomib in multiple myeloma.  
**Biochem Biophys Res Commun.** 2018;495(3):2289-2295  
doi:10.1016/j.bbrc.2017.12.142
2. Yamashita M, Inoue K, Saeki N, Ideta-Otsuka M, Yanagihara Y, Sawada Y, Sakakibara I, Lee JW, Ichikawa K, Kamei Y, Iimura T, Igarashi K, Takada Y and Imai Y.  
Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression.  
**Development.** 2018;145(1).pii: dev157412. doi:10.1242/dev.157412.
3. Lee JW, Hoshino A, Inoue K, Saitou T, Uehara S, Kobayashi Y, Ueha S, Matsushima K, Yamaguchi A, Imai Y, Iimura T.  
The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function.  
**Nat Commun.** 2017;8(1):2226  
doi:10.1038/s41467-017-02368-5.
4. Sakamoto Y, Yamamoto T, Sugano N, Takahashi D, Watanabe T, Atsumi T, Nakamura J, Hasegawa Y, Akashi K, Narita I, Miyamoto T, Takeuchi T, Ikari K, Amano K, Fujie A, Kubo T, Tada Y, Kaneuji A, Nakamura H, Miyamura T, Kabada T, Yamaji K, Okawa T, Sudo A, Ohzono K, Tanaka Y, Yasunaga Y, Matsuda S, Imai Y, Akiyama M, Kudo M, Kamatani Y, Iwamoto Y, Ikegawa S.  
Genome-wide Association Study of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head.  
**Sci Rep.** 2017;7(1):15035. doi: 10.1038/s41598-017-14778-y.
5. Sakaue T, Sakakibara I, Fujisaki A, Uesugi T, Nakashiro K, Hamakawa H, Kubota E, Joh T, Imai Y, Izutani H, Higashiyama S.  
The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells.  
**Sci Rep.** 2017;7:42845. doi: 10.1038/srep42845.
6. Mamoto K, Ohta Y, Ichikawa K, Imai Y, Minoda Y, Takaoka K, Nakamura H.  
Co-administration of Systemic Zoledronate Promotes Osteogenesis Induced by a Local Co-delivery of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and B-tricalcium Phosphate in the Bone Marrow of the Rabbit Femur.  
**J Musculoskelet Res.** 2017;19(3):1650015.  
doi: 10.1142/S0218957716500159
7. Ichikawa K, Ohta Y, Mamoto K, Mizokawa S, Minoda Y, Imai Y, Takaoka K, Nakamura H.  
Local co-application of zoledronate promotes long-term maintenance of newly formed bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2.  
**Biochem Biophys Res Commun.** 2016;480(3):314-320.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.034
8. Omata Y, Nakamura S, Koyama T, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Matsumoto T, Imai Y, Seo S, Kurokawa M, Tsutsumi S, Kadono Y, Morimoto C, Aburatani H, Miyamoto T, Tanaka S.  
Identification of Nedd9 as a TGF- $\beta$ -Smad2/3 Target Gene Involved in RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Comprehensive Analysis.  
**PLoS One.** 2016;11(6):e0157992. doi: 10.1371/journal.pone.0157992.

eCollection 2016.

9. Haraguchi R, Kitazawa R, Mori K, Tachibana R, Kiyonari H, Imai Y, Abe T, Kitazawa S.  
sFRP4-dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. **Sci Rep.** 2016;6:25198. doi: 10.1038/srep25198.
10. Ito R, Shimada H, Yazawa K, Sato I, Imai Y, Sugawara A, Yokoyama A.  
Hydroxylation of Methylated DNA by TET1 in Chondrocyte Differentiation of C3H10T1/2 Cells. **Biochem Biophys Rep.** 2016:134-140.
11. Inoue K and Imai Y.  
Fatostatin, an SREBP inhibitor, prevented RANKL-induced bone loss by suppression of osteoclast differentiation. **BBA-Molecular Basis of Disease.** 2015;1852(11):2432-41. doi:10.1016/j.bbadis.
12. Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Imai Y, Matsumoto T, Masuda H, Tokuyama N, Nakamura S, Tsutsumi S, Yasuda H, Okamoto K, Takayanagi H, Hikita A, Imamura T, Matsuo K, Saito T, Kadono Y, Aburatani H, Tanaka S.  
Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. **J Bone Miner Res.** 2015;30(5):869-77. doi: 10.1002/jbmr.2418.

〔学会発表〕(計9件)

Uhrf1 deficiency attenuates genome-wide DNA methylation and consequent specific gene expression in chondrocytes in vivo  
Michiko Yamashita, Noritaka Saeki, Yuta Yanagihara, Yuichiro Sawada, Jiwon Lee, Tadahiro Iimura, Yuuki Imai  
45th European Calcified Tissue Society Congress, 2018

エピゲノム制御因子 Uhrf1 による軟骨特異的遺伝子発現制御  
今井祐記  
第18回運動器科学研究会, 2017

骨格筋におけるエピゲノム制御因子 Uhrf1 の機能解析

沢田雄一郎, 榊原伊織, 小野悠介, 柳原裕太, 佐伯法学, 菊川志彦, 雑賀隆史, 今井祐記  
第3回日本筋学会学術集会, 2017

エピゲノム制御因子 Uhrf1 による DNA メチル化制御を介した軟骨分化・骨格形成  
山下美智子, 井上和樹, 佐伯法学, 榊原伊織, 李智媛, 大塚まき, 亀井義明, 五十嵐勝秀, 高田泰次, 飯村忠浩, 今井祐記  
第35回日本骨代謝学会学術集会, 2017

エピジェネティクス制御因子 Uhrf1 による骨格制御  
今井祐記  
第5回骨格筋生物学研究会, 2017

Epigenetic Regulator, Uhrf1, Controls not Only Cell Proliferation but Also Chondrocyte Differentiation During Limb Development.  
Michiko Yamashita, Kazuki Inoue, Iori Sakakibara, Yuuki Imai  
The American Society for Bone and Mineral Research 2016 Annual Meeting, 2016

エピゲノム制御因子 Uhrf1 は軟骨分化・骨格形成を制御する  
山下美智子, 今井祐記  
第34回日本骨代謝学会学術集会, 2016

骨格組織における Uhrf1 の機能解析  
山下美智子, 今井祐記  
第10回日本エピジェネティクス研究会, 2016

Epigenetic regulator, Uhrf1, is a positive regulator in chondrocyte differentiation.  
Michiko Yamashita, Kazuki Inoue, Iori Sakakibara, Akari Murakami, Yoshiaki Kamei, Yuuki Imai  
The 13th International Congress of Human Genetics, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imaib>  
<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/>

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

(3) 連携研究者

井上 和樹 (Inoue, Kazuki)  
愛媛大学・学術支援センター・助教  
研究者番号：60623725

榊原 伊織 (Iori, Sakakibara)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・  
助教  
研究者番号：50734662