

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10882

研究課題名(和文) DNAメチル化を介した軟骨基質破壊機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating mechanisms of cartilage matrix destruction via DNA methylation

研究代表者

橋本 功 (Hashimoto, Ko)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00718497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腿骨頸部骨折(非OA群)と二次性変形性股関節症(OA群)に対する手術で摘出した骨頭から軟骨片を採取して軟骨細胞からtotal RNAを抽出し、網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ)により、約24500種の遺伝子発現パターンを網羅的に解析した。日本人の股関節OA軟骨細胞で著明な発現上昇を示した新規遺伝子として、DPT, IGFBP7, FOXO1, KLF2が同定された。またOAで発現が亢進している遺伝子のうち、欧米人と共通しているものは10%のみであり、OAで同様の病態を示しながら、欧米人と日本人ではその軟骨細胞における遺伝子発現パターンが異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、従来報告があった欧米人のOAにおける軟骨細胞の形質と、日本人のOAにおける形質が異なることが示された。また日本人のOA軟骨細胞に特異的と考えられる遺伝子発現パターンが見つかり、今後日本人に特化したOAの病態解明や治療ターゲットとなり得る遺伝子群を発見することができた。今回新たに発見された遺伝子群の機能解析を進めることで、日本人におけるOAの発症や病態進行のメカニズムを解明する一助となる可能性がある。またこれらの遺伝子群が発現するタンパクの機能解析の結果如何によっては、従来不可能であったOAに対する根拠的・根本的な治療介入への可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：In this study, exhaustive gene expression analysis of approximately 24,500 genes were conducted of human cartilage pieces from femoral heads harvested from surgeries for patients with femoral neck fracture (non-osteoarthritic: non-OA group) and secondary osteoarthritis (OA group). DPT, IGFBP7, FOXO1 and KLF2 were the genes identified as the new OA-related genes as they were highly expressed in chondrocytes of Japanese hip OA compared to non-OA. Out of overexpressed genes in OA, only 10% of the genes were common between Japanese and western population. Our study elucidated the difference in gene expression patterns of OA chondrocytes between Japanese and western population although the phenotype of OA is similar between different ethnic origins.

研究分野：軟骨代謝・脊椎外科

キーワード：変形性関節症 軟骨基質破壊 網羅的遺伝子解析

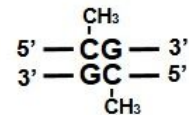
1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis: OA) は関節軟骨の破壊により関節痛や運動制限を生じる疾患で、こと患者の移動能力を奪い、健康寿命の短縮の大きな要因となっている。またその進行は不可逆的である。日本国内において、OA の潜在的な患者数は 2000 万人と推定されている。高齢化社会の到来により OA の有病者数は増加する一方であるが、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。

《OA と DNA メチル化》

OA の発症と進展には、関節軟骨細胞内での、軟骨の破壊に関わる軟骨基質分解酵素や炎症性サイトカイン、および軟骨の維持に関わる軟骨基質成分の発現バランス異常が重要な役割を果たす。近年、申請者の元共同研究者の故 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、その機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、重要な役割を果たすという仮説を立てた。そして世界で初めて、実際の OA 軟骨細胞において、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。以後 OA に関与する遺伝子群の DNA メチル化異常が、世界中で活発に研究されている。

申請者らは、ヒト関節軟骨細胞内の軟骨基質分解酵素、炎症性サイトカインおよび軟骨基質成分の遺伝子において、そのメチル化状態と遺伝子発現の関係を、エピゲノム解析手法により解明してきた。そして OA 軟骨細胞内でのこれらの遺伝子発現変化が、遺伝子プロモーター領域上の CpG サイト (右図) と呼ばれる配列部位でのメチル化状態の変化と関連することを示した。



2. 研究の目的

以上をふまえ、OA で軟骨基質破壊に関わる遺伝子群の DNA メチル化による発現調節機構を網羅的に解析し、現在進行中の、IL1B 遺伝子の CpG メチル化機構による発現調節の解明を進め、OA の病態解明と根治への手がかりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

研究課題 1. OA の発症・進展に関わる遺伝子群の DNA メチル化を介した発現調節の網羅的解析

実験 1-a. 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

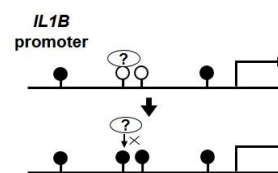
健常および OA のヒト関節軟骨細胞から RNA と DNA を同時抽出する。遺伝子発現マイクロアレイシステム 3D-Gene® (東レ) を用い、OA 軟骨細胞で健常軟骨細胞より多く発現される遺伝子を網羅的に解析する。さらに DNA メチル化アレイ Infinium® Human Methylation 450 BeadChip (Illumina) を用い、OA-健常細胞間でメチル化状態の網羅的に定量解析する。この 2 つのアレイシステムの結果を統合し、OA における DNA メチル化による遺伝子発現制御機構を網羅的に解析する。

実験 1-b. 培養軟骨細胞のサイトカイン刺激による、DNA メチル化状態の変化の網羅的解析

ヒト培養軟骨細胞を脱メチル化試薬や炎症性サイトカインで刺激した場合に、どの遺伝子のどの CpG サイトのメチル化状態が変化し、それが遺伝子発現と関連するかを、上記のアレイシステムの組み合わせにより網羅的に定量解析する。

研究課題 2-1. 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、主たる転写因子の同定 (右図)

申請者が以前示した(業績 3,7) 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 2-1-a. 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

申請者が以前英国でおこなったヒト OA 軟骨細胞での遺伝子発現パターンの解析結果に反し、日本人の OA 軟骨細胞では、IL1B 遺伝子の過剰発現が見られなかった。このため実験 1-a に示したとおり、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し、日本人の OA 軟骨細胞における遺伝子発現パターンを網羅的に解析した。さらに欧米人の網羅的解析データ(文献)と比較した。日本人の股関節 OA 軟骨細胞で特異的に発現上昇を示す新規遺伝子として、DPT, IGFBP7, FOXO1, KLF2 が同定された。さらには、OA で発現が亢進している遺伝子群のうち、欧米人の OA と共通しているものは 10%のみであり、OA で同様の病態を示しながら、欧米人と日本人ではその軟骨細胞における遺伝子発現パターンが異なることがわかった。本研究の成果は、2018 年に英文誌 PLoS One に題名「A whole-genome transcriptome analysis of articular chondrocytes in secondary osteoarthritis of the hip」として論文発表された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Aki, Ko Hashimoto, Masanori Ogasawara, Eiji Itoi	4. 巻 13
2. 論文標題 A whole-genome transcriptome analysis of articular chondrocytes in secondary osteoarthritis of the hip	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0199734	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takashi Aki, Ko Hashimoto, Masanori Ogasawara, Eiji Itoi
2. 発表標題 A microarray analysis of gene expression in secondary osteoarthritis of the hip in Japanese
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋貴史 橋本 功 小笠原将教 高橋敦 井樋栄二
2. 発表標題 日本人二次性変形性股関節症の関節軟骨細胞における遺伝子発現の網羅的解析 -欧米人データとの比較-
3. 学会等名 第32回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Aki, Ko Hashimoto, Atsushi Takahashi, Masanori Ogasawara, Eiji Itoi
2. 発表標題 Searching potential transcription factors regulating MMP13 overexpression in human osteoarthritic chondrocytes - A microarray screening -
3. 学会等名 World Congress on Osteoarthritis 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Aki, Ko Hashimoto, Masanori Ogasawara, Eiji Itoi
2. 発表標題 A microarray analysis of gene expression in secondary osteoarthritis of the hip in Japanese
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Aki
2. 発表標題 Searching potential transcription factors regulating MMP13 overexpression in human osteoarthritic chondrocytes: A microarray screening
3. 学会等名 World Congress on Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masanori Ogasawara
2. 発表標題 Exhaustive gene expression analysis in chondrocytes of osteoarthritis of the hip in Japanese
3. 学会等名 World Congress on Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小笠原将教
2. 発表標題 日本人の変形性股関節症に関わる遺伝子発現パターンの網羅的解析
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 秋貴史
2. 発表標題 ヒト関節軟骨におけるMMP13, IL1B 遺伝子発現に関わる転写因子の網羅的解析
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----