

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10889

研究課題名(和文) ヒストン修飾変化により発現制御される遺伝子Vopp1の破骨細胞における作用の解明

研究課題名(英文) The role of Vopp1 in osteoclast regulated by histone modification.

研究代表者

中村 春彦 (NAKAMURA, Haruhiko)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60755677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞の分化にともないヒストン修飾が活性化型に変化する遺伝子を解析し、Vopp1を同定した。破骨細胞を分化させる実験系においてVopp1の Realtime PCRを実施して破骨細胞様細胞の分化にともないVopp1の発現量が増加していることを確認した。shRNAによりVopp1をノックダウンして、破骨細胞分化、機能について解析したが、対照群と比較して有意な変化は確認できなかった。同様の系で対照群よりも破骨細胞分化後の生存期間が短縮することが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会において骨粗鬆症の患者は増加しており、その一因として破骨細胞による骨吸収の亢進が知られている。破骨細胞による骨吸収は破骨細胞への分化、機能(骨吸収能)、生存(寿命)により変化するが、その背景にあるメカニズムについては不明な点も多い。本研究においては、Vopp1による破骨細胞の寿命の制御が関与している可能性が示唆され、破骨細胞による骨吸収について新たな知見が得られ、今後の骨粗鬆症の治療法の進歩の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified Vopp1 by chromatin immunoprecipitation (ChIP) as gene whose histone modification has activated in osteoclastogenesis. Quantitative RT-PCR analysis revealed the expression of Vopp1 had increased in osteoclast differentiation. The knockdown of Vopp1 did not change osteoclast differentiation and bone resorption, but shorten osteoclast life span.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的に、特に OECD 加盟諸国などの先進国では高齢化が問題となっているが、その中でも日本は最も高齢化が進行している。高齢社会においては、健康で社会的な生活を営める健康寿命をいかに伸ばすかが、高齢者当人のみならず社会全体としても非常に重要である。健康寿命を損なう原因は様々なものがあるが、特に、骨折による歩行困難は大きな割合を占めている。

高齢者の骨折の特徴として、骨脆弱性を背景とした低エネルギーの外傷、もしくは「いつの間にか骨折」とも称される受傷起点の不明な骨折が多いことが挙げられる。手関節や脊椎の椎体、大腿骨頸部などが好発部位であり、手関節骨折では手が使えないことによる ADL の低下、椎体骨折や大腿骨頸部骨折では疼痛や歩行困難およびその結果としての廃用性の障害(筋力低下、肺炎、褥瘡など)など様々な問題が生じ、手術を必要とすることも多い。これらは本人の QOL を損なうだけでなく、介護が必要となり家族が離職するなど社会的な損失も大きい。

高齢者の骨脆弱性の原因となる骨粗鬆症は破骨細胞による骨吸収の亢進と骨芽細胞による骨形成の抑制から骨密度が低下することにより生じる。これらの知見から、破骨細胞による骨吸収を抑制するビスホスホネートやデノスマブ、骨形成を促進するテリパラチドなどの薬剤が開発された。しかし、効果が不十分であったり、副作用が生じたりすることもあり、骨代謝に対するさらなる知見が待ち望まれている。

2. 研究の目的

破骨細胞は、macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)刺激により造血幹細胞から分化した単球・マクロファージ系の前駆細胞に間葉系細胞の表面上に発現する receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)が作用して分化する。RANKL 刺激により H3K4 と H3K27 が共にトリメチル化された準備状態から遺伝子発現を抑制する H3K27 のみ脱メチル化され、遺伝子発現を活性化する H3K4 のトリメチル化が残った活性化状態になる遺伝子として Vopp1 に注目した。

Vopp1 は細胞寿命を延ばすことが知られており(Park S, et al. Oncogene. 2005)、ノックダウンによりアポトーシスが誘導されるとの報告もある(Park S, et al. Oncogene. 2005)。破骨細胞における Vopp1 の働きについて解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) マウスの長管骨髄から細胞を採取し、M-CSF で 2 日間培養後、M-CSF と RANKL で 3 日間培養することによって破骨細胞様の TRAP 陽性多核細胞を分化させる系を用いて、RANKL 刺激前後の細胞を採取する。RANKL 刺激前及び刺激後 1 日毎の細胞から RNA を採取し、Realtime PCR を実施し、Vopp1 の遺伝子発現の変化を評価する。

(2) Vopp1 の shRNA (short hairpin RNA)を RNAi Consortium の shRNA ライブラリーから得られる配列をもとに構築し、標的 RNA を RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen Vector に挿入してベクターを作成する。これをパッケージング細胞 PLAT-E に Fugene HD を用いてトランスフェクションしてレトロウイルスの入った培養上清(レトロウイルス液)を採取する。(1)と同様にマウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で 2 日間培養後、を M-CSF ならびにポリブレンを加えたレトロウイルス液で 24 時間培養する。その後、M-CSF と RANKL の存在下でさらに 72 時間培養する。RANKL 刺激前後の mRNA を採取し、Vopp1 の Real-time PCR によりノックダウン効率を確認する。ベクター配列に含まれている緑色蛍光タンパクである ZsGreen の発現を蛍光顕微鏡で観察して感染効率を評価する。しっかりノックダウンされているものについて破骨細胞の大きさや数を顕微鏡や IN CELL ANALYZER を用いて計測する。Nfatc1、cfos、Ctsk、Acp5、Dcstamp などの破骨細胞関連分子の発現量を Realtime PCR を実施して評価する。対照群として shLuc を組み込んだベクターを感染させたものを使用する。

(3) 破骨細胞の骨吸収能を評価するために Pit formation assay を実施する。(2)と同様に Vopp1 をノックダウンし RANKL 刺激を 72 時間行った細胞を計数し、数をあわせてデンチン上に撒きなおし、M-CSF および RANKL の存在下にさらに 48 時間培養する。デンチンを回収し、トルイジンブルーで染色し、吸収窩の面積の合計をソフトにより評価する。

(4) 破骨細胞の生存能を評価するために survival assay を実施する。Vopp1 をノックダウンし RANKL 刺激を 72 時間行った細胞を M-CSF のみで培養し、その後 48 時間まで 12 時間ごとに細胞を固定し、TRAP 染色を行い、破骨細胞数の変化を顕微鏡または IN CELL ANALYZER を用いて評価する。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

マウスの骨髄から細胞を採取し、M-CSF と RANKL で培養することによって破骨細胞様の TRAP 陽性多核細胞を分化させた。ChIP シークエンスにより全ゲノム的にヒストン修飾パターンの解析を実施し、M-CSF 培養後の細胞ではヒストン修飾が H3K4 および H3K27 がともにトリメチル化されている準備状態であり、TRAP 陽性多核細胞においては H3K27 のトリメチル化が外れ、H3K4 のトリメチル化のみ残存する遺伝子群を同定した。これらの中から Vopp1 を候補遺伝子として選択した。

と同様の TRAP 陽性多核細胞を分化させる系において、RANKL 刺激前から、刺激後 24 時間毎に mRNA を採取し、それらの検体で定量的 RT-PCR を実施し、時間とともに Vopp1 の発現量が増加することを確認した。

Vopp1 の shRNA(short hairpin RNA)を構築し、ベクターに組み込むことによって、標的 RNA を

発現するベクターを作成した。これをパッケージング細胞にトランスフェクションし、レトロウイルス溶液を採取した。この溶液下で M-CSF で 2 日間培養した細胞を 24 時間培養し、M-CSF と RANKL で 3 日間培養した。同様に shLuc を導入したベクターを導入した系を対照群として用いた。RANKL 刺激後の細胞から採取した mRNA に対し定量的 RT-PCR を実施し、対照群と比較して Vopp1 の発現が抑制されていることを確認した。

の系において Vopp1 をノックダウンした RANKL 刺激後の細胞において TRAP 染色を実施して、破骨細胞の形態や数を評価したが、対照群との明らかな有意差は生じていなかった。また、Nfatc1、cfos、Ctsk、Acp5、Dcstamp などの破骨細胞関連遺伝子の定量的 RT-PCR においても対照群との有意差は検出されなかった。

の系において Vopp1 をノックダウンした RANKL 刺激後の細胞をデンチン上に撒きなおし、Pit formation assay を実施した。吸収窩の面積をソフトにより評価したが、有意差は確認できなかった。

の系において Vopp1 をノックダウンした RANKL 刺激後の細胞を M-CSF のみで培養し、破骨細胞数の経時的变化を解析したところ、24 時間後に対照群よりも有意に細胞数の減少が生じていた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

閉経後骨粗鬆症では破骨細胞による骨吸収の亢進による骨密度の低下が主な原因となっている。今回、Vopp1 が破骨細胞の寿命に関与する可能性が示されたことにより、破骨細胞の作用に関するより深い解明への手助けとなり、将来的な骨粗鬆症のより良い治療法や予防法の開発の一助となると考えられる。

(3) 今後の展望

本研究では *in vitro* の実験において Vopp1 が破骨細胞の寿命の制御に関与している可能性が示されたが、*in vivo* の実験を深く実施することができなかった。今後は *in vivo* の実験を進めることにより Vopp1 が生体内でどのように骨代謝に影響するかを評価していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 春彦
2. 発表標題 破骨細胞分化においてヒストン修飾により制御される遺伝子Msi2の解析
3. 学会等名 第2回日本骨免疫学会
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
研究分担者	廣瀬 旬 (Hirose Jun) (00456112)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	門野 夕峰 (Kadono Yuho) (70401065)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	