

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07435

研究課題名（和文）老人性骨粗鬆症の病態解析：加齢モデルにおける破骨細胞分化因子発現制御

研究課題名（英文）Pathogenesis of senile osteoporosis: regulation of RANKL expression in aging model

研究代表者

北澤 理子（KITAZAWA, RIKO）

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00273780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：超高齢化社会においては「老人性骨粗鬆症」の病態解明が重要である。高齢者の低回転型骨粗鬆症では、破骨細胞分化因子RANKLや受容体RANK遺伝子にメチル化による転写抑制がおり、骨吸収が低下する可能性がある。RANKLメチル化候補部位に1塩基変異を導入した遺伝子改変動物を確立して骨量を解析した。受容体RANKについては加齢動物と培養継代という時間的負荷によるCpGメチル化と遺伝子発現を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉経関連骨減少は骨粗鬆症の主因であり、有効な治療薬も使用されているが、今日の超高齢化社会においては男女を問わずおこる「老人性骨粗鬆症」の病態解明が重要である。健常な高齢者では骨量は30歳代の70%程度であるが、更年期よりも骨代謝は低回転となり、骨量の年次減少は緩やかとなる。後期高齢者の低回転型骨粗鬆症においては、骨吸収を担う破骨細胞形成に関わる破骨細胞分化因子RANKLや受容体RANK遺伝子にCpGメチル化による転写抑制がおり、破骨細胞による骨吸収活性が低下するメカニズムの解明は重要であり、生活習慣病などの過剰に骨吸収を促進する要因を防ぐ方策に繋がるものであり、社会的意義が大きいといえる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathophysiology of low turnover osteoporosis in senile osteoporosis regardless of gender, we investigated the epigenetic repression by CpG methylation of RANKL and the receptor RANK in relation to aging.

We established the *Tnfsf11*-GFP mouse in which a single-base mutation was introduced into a methylation candidate site of RANKL gene promoter, and we have RANKL expression and bone mass were analyzed. We have investigated the passage-dependent and age-related change in osteoclastogenesis and the receptor RANK expression relative to the CpG methylation status in cultured pre-osteoclastic RAW cells and aged mice. These data suggest that DNA methylation at CpG-island in the RANK gene occurs in an age-related manner (type-A methylation).

研究分野：人体病理学

キーワード：破骨細胞 RANK RANKL 遺伝子プロモータ メチル化 加齢

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

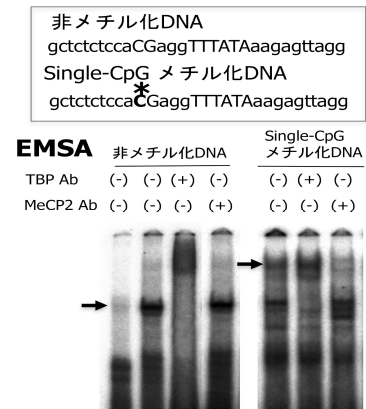
更年期の閉経後骨粗鬆症に加え、今日の超高齢化社会では、男女を問わず「老人性骨粗鬆症」が重要課題である。老人性骨粗鬆症は低代謝型の骨粗鬆症であり、骨形成と骨吸収が共に低下して緩やかな骨減少を示す。生活習慣病や悪性腫瘍などの疾患では病的な骨吸収亢進を示すが、健常な超高齢者では加齢メチル化と関連して骨吸収を低く抑える機構を想定する作業仮説である。

破骨細胞形成に必須の分子である破骨細胞分化因子 RANKL と破骨細胞側の受容体 RANK の各々の遺伝子プロモータ領域には、DNA メチル化を受けて転写抑制に働く部位が認められる。加齢に伴う CpG メチル化により破骨細胞形成に関わる遺伝子が抑制的に制御され、緩やかな骨吸収低下となり低代謝型骨粗鬆症をきたす可能性を検討する。

2. 研究の目的

(1) TATA-box 近傍 CpG の 1 塩基変異を導入した遺伝子改変動物 *Tnfsf11*TATAm-GFP KI マウスの作成

RANKL 遺伝子上流領域には TATA-box 直近に CpG がある。右下図に示すように「TBP 結合による転写促進」が、1 箇所の CpG メチル化により「MeCP2 結合による転写抑制」になる、という特定部位/pin-point の制御に着目した。TATA-box 近傍の CpG に 1 塩基変異を導入した遺伝子改変動物 *Tnfsf11*TATAm-GFP KI マウスを作成し、加齢に伴うメチル化の RANKL 転写への影響を解析する。



(2) RANK 遺伝子の転写制御とメチル化制御の解析
破骨細胞側の受容体 RANK 遺伝子の転写制御機構を解析する。破骨細胞株 RAW264 の長期培養継代やマウスの長期飼育という、in vitro 並びに in vivo の実験的・時間的負荷による CpG メチル化と受容体 RANK 発現低下を検討する。

3. 研究の方法

(1) TATA-box 近傍 CpG の 1 塩基変異を導入した遺伝子改変動物 *Tnfsf11*TATAm-GFP KI マウスの作成

RANKL プロモータ領域の当該塩基変異によるプロモータ活性と、EMSA アッセイによる TATA-box と MeCP2 結合配列の機能解析を行う。遺伝子編集により TATA-box 近傍 CpG の 1 塩基変異を導入した遺伝子改変動物 *Tnfsf11*TATAm-GFP KI マウスの系統確立と飼育を行い、諸臓器での RANKL 発現量と骨量測定の評価を行う。



(2) RANK 遺伝子の転写制御とメチル化制御の解析

受容体 RANK 遺伝子発現制御に関わる AP-1 転写因子や NFATc1 機能を EMSA やプロモータアッセイにより解析する。破骨細胞株 RAW264 の継代数依存的な破骨細胞減少と受容体 RANK 発現低下、転写開始部位周辺の CpG メチル化状態を解析する。脱メチル化処理による RANK 発現と破骨細胞形成の回復を証明する。

4. 研究成果

(1) TATA-box 近傍 CpG の 1 塩基変異を導入した遺伝子改変動物 *Tnfsf11*TATAm-GFP KI マウスの作成

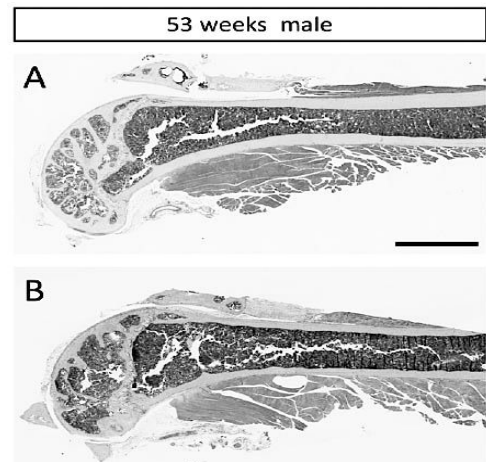
TATA-box 近傍 CpG 1 塩基変異について、C を他の 3 塩基で置換しても in vitro の転写活性に影響がないことを確認した。*Tnfsf11*TATAm-GFP KI マウスの系統の長期飼育を行い、主要臓器サンプリングと骨量測定を行った。遺伝子改変マウスでは 1 塩基変異によりメチル化

修飾が起きず、メチル化による抑制機構が阻害される結果、in vivoでは、RANKL mRNA 発現増加傾向を示し、対照群よりも低骨量を示す知見を得た。右図に53週令雄マウス大腿骨組織像を示す。

A:対照群に比して、B:Tnfsf11TATAm-GFP KIでは、骨梁が少なく皮質骨が薄い傾向を認める。さらに個体数を増やし、解析を継続中である。

(2) RANK 遺伝子の転写制御とメチル化制御の解析

受容体 RANK 発現制御の転写因子ネットワークに関して、2019年にはProtein kinase C による制御機構に関する成果を論文発表し、2020年にはNFATc1 による制御機構に関する成果を論文発表した。培養破骨細胞株や加齢マウスへの時間的負荷における RANK 遺伝子 CpG メチル化の促進と RANK 発現低下、培養細胞における破骨細胞形成低下について、成果を取りまとめ、国内国外の学会で発表した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 北澤 理子	4. 巻 40
2. 論文標題 【エピジェネティクスと病理】ヒストン蛋白の異常と病理診断.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa S, Ohno T, Haraguchi R, Kitazawa R.	4. 巻 55
2. 論文標題 Histochemistry, Cytochemistry and Epigenetics.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00095.	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 -

1. 著者名 Kohara Y, Kitazawa R, Haraguchi R, Imai Y, Kitazawa S.	4. 巻 154
2. 論文標題 Macrophages are requisite for angiogenesis of type H vessels during bone regeneration in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116200	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 -

1. 著者名 Kitazawa R, Haraguchi R, Kohara Y, Kitazawa S.	4. 巻 572
2. 論文標題 RANK- NFATc1 signaling forms positive feedback loop on rank gene expression via functional NFATc1 responsive element in rank gene promoter.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 86-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.100.	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 -

1. 著者名 Kohara Y, Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S.	4. 巻 523
2. 論文標題 Knockdown of Lrp1 in RAW264 cells inhibits osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast interactions in vitro.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 961-965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.065	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 -

1. 著者名 Kohara Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Haraguchi R, Arai K, Amasaki H, Soeta S.	4. 巻 529
2. 論文標題 Localization of DLL1- and NICD-positive osteoblasts in cortical bone during postnatal growth in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 186-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.039	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 -

1. 著者名 Kohara Y, Haraguchi R, Kitazawa R, Imai Y, Kitazawa S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Hedgehog inhibitors suppress osteoclastogenesis in in vitro cultures, and deletion of smo in macrophage/osteoclast lineage prevents age-related bone loss.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082745	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 -

1. 著者名 Haraguchi R, Kohara Y, Matsubayashi K, Kitazawa R, Kitazawa S.	4. 巻 53
2. 論文標題 New insights into the pathogenesis of diabetic nephropathy: proximal renal tubules are primary target of oxidative stress in diabetic kidney.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.	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 -

1. 著者名 Hamatani M, Yamashita H, Ochi H, Ashida S, Hashi Y, Okada Y, Fujii C, Kawamura K, Kitazawa R, Nakagawa M, Mizuno T, Takahashi R, Kondo T.	4. 巻 140
2. 論文標題 Altered features of monocytes in adult onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia: A clue to the pathomechanism of microglial dyshomeostasis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis	6. 最初と最後の頁 104867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2020.104867	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 -

1. 著者名 Kitazawa R, Kinto-Shibahara S, Haraguchi R, Kohara Y, Kitazawa S.	4. 巻 515
2. 論文標題 Activation of protein kinase C accelerates murine osteoclastogenesis partly via transactivation of RANK gene through functional AP-1 responsive element in RANK gene promoter.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 268-274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.144	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 -

1. 著者名 S Kitazawa, R Haraguchi, Y Kohara, R Kitazawa.	4. 巻 52
2. 論文標題 Modulation of α 3 Integrin via Transactivation of α 3 Integrin Gene on Murine Bone Marrow Macrophages by 1, 25 (OH) 2D3, Retinoic Acid and Interleukin-4.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta histochemica et cytochemica	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.19015	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 -

1. 著者名 R Haraguchi, R Kitazawa, Y Kohara, A Ikedo, Y Imai, S Kitazawa.	4. 巻 20
2. 論文標題 Recent Insights into Long Bone Development: Central Role of Hedgehog Signaling Pathway in Regulating Growth Plate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	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) 10.3390/ijms20235840	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 -

1. 著者名 北澤 理子, 北澤 莊平	4. 巻 2
2. 論文標題 研究者の最新動向 基本転写調節領域から見たRANK遺伝子の発現制御(解説).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1046-1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 北澤莊平、木谷彰岐、原口竜摩、北澤理子	4. 巻 38
2. 論文標題 骨巨細胞腫の病態と治療修飾.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 愛媛医学	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 北澤理子, 原口竜摩, 小原幸弘, 北澤莊平.
2. 発表標題 加齢モデルにおける破骨細胞分化因子受容体RANKのプロモータ領域メチル化による発現制御.
3. 学会等名 第110回日本病理学会 2021.4.22-24 WEB開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 潮音, 北澤 理子, 原口 竜摩, 小原 幸弘, 遠香 薫, 小野 真理, 北澤 莊平.
2. 発表標題 長期継代培養・老化ストレスが前破骨細胞の破骨細胞最終分化能に与える影響.
3. 学会等名 第110回日本病理学会 2021.4.22-24 WEB開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口 竜摩, 小原 幸弘, 北澤 理子, 北澤 荘平.
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナルの活性化によって生じるマウス下肢軟部腫瘍病変についての病理組織学的解析.
3. 学会等名 第110回日本病理学会 2021.4.22-24 WEB開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北澤 荘平, 原口 竜摩, 小原 幸弘, 北澤 理子.
2. 発表標題 エビジェネティクスの組織化学.
3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2021.9.24-26 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北澤 荘平, 北澤 理子, 小原 幸弘, 原口 竜摩.
2. 発表標題 チル化シトシン塩基配列特異的な検出法の開発.
3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2021.9.24-26
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原口 竜摩, 小原 幸弘, 今井 祐記, 北澤 理子, 北澤 荘平
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナル調節因子Hhipの骨伸長過程における役割.
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会2021.10.8-10 WEB開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原 幸弘, 北澤 理子, 原口 竜摩, 今井 祐記, 北澤 荘平.
2. 発表標題 Calreticulinは破骨細胞分化を直接抑制するだけでなく、骨細胞でのSclerostin発現を抑制する.
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会2021.10.8-10 WEB開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kitazawa R, Haraguchi R, Kohara Y, Kitazawa S.
2. 発表標題 Senescence-dependent increase of CpG methylation at receptor activator NF- B (RANK) gene promoter impairs osteoclastogenesis by decreasing RANK-positive osteoclast precursors.
3. 学会等名 ASBMR 2021 10.11-4, 2021 Virtual Event (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haraguchi R, Kitazawa R, Kohara Y, Imai Y, Kitazawa S.
2. 発表標題 Role of Hedgehog signal modulator gene, Hedgehog Interacting Protein (Hhip), in growing long bone.
3. 学会等名 ASBMR 2021 10.11-4, 2021 Virtual Event (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohara Y, Kitazawa R, Haraguchi R, Kitazawa S.
2. 発表標題 Macrophages are requisite for angiogenesis of type H vessels during bone regeneration in mice.
3. 学会等名 ASBMR 2021 10.11-4, 2021 Virtual Event (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北澤理子, 原口竜摩, 小原幸弘, 福島万奈, 北澤荘平.
2. 発表標題 加齢モデルにおける破骨細胞分化因子受容体RANKのプロモータ領域メチル化による発現制御.
3. 学会等名 第109回日本病理学会 2020.4.16-18 WEB開催 (7.1-7.31)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原口竜摩, 小原幸弘, 北澤理子, 北澤荘平.
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナル調節因子Hhipの骨形成過程における役割.
3. 学会等名 第109回日本病理学会 2020.4.16-18 WEB開催 (7.1-7.31)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北澤理子, 原口竜摩, 小原幸弘, 北澤荘平.
2. 発表標題 破骨細胞分化因子受容体RANKのプロモータ領域メチル化による発現制御
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会(2020.10.9-11)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小原幸弘, 原口竜摩, 今井祐記, 北澤理子, 北澤荘平.
2. 発表標題 肝臓抽出液から分離・同定した新規破骨細胞形成阻害因子Calreticulinの機能解明.
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会(2020.10.9-11)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kitazawa R, Haraguchi R, Kohara Y, Kitazawa S.
2. 発表標題 Senescence-dependent increase of CpG methylation at receptor activator NF- κ B (RANK) gene promoter impairs osteoclastogenesis by decreasing RANK-positive osteoclast precursors.
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting September 11-15, 2020 Virtual Event (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Haraguchi R, Kohara Y, Kitazawa R, Imai Y, Kitazawa S
2. 発表標題 Specific role of Hh signaling pathway in bone resorption.
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting September 11-15, 2020 Virtual Event (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kohara Y, Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S.
2. 発表標題 Role of Lrp1 in RAW264 cells on osteoclast differentiation.
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting September 11-15, 2020 Virtual Event (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北澤 理子, 村田 夕紀, 原口 竜摩, 上田 康雄, 福島 万奈, 北澤 莊平.
2. 発表標題 破骨細胞分化因子受容体RANKのプロモータ領域メチル化による発現制御.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会2019.5.9-11
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口 竜摩, 松林 加那子, 北澤 理子, 北澤 荘平.
2. 発表標題 近位尿細管に注目したストレプトゾトシン誘導性糖尿病腎の病態組織学的考察.
3. 学会等名 第108回日本病理学会2019.5.9-11
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北澤 理子, 村田 夕紀, 小原 幸弘, 原口 竜摩, 北澤 荘平.
2. 発表標題 骨細胞分化因子受容体RANKのプロモータ領域メチル化による発現制御.
3. 学会等名 第37回骨代謝学会学術集会2019.10.12-14
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原 幸弘, 原口 竜摩, 北澤 理子, 北澤 荘平.
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナル阻害剤であるCyclopamineは破骨細胞形成を抑制する.
3. 学会等名 第37回骨代謝学会学術集会2019.10.12-14
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口 竜摩, 小原 幸弘, 今井 祐記, 北澤 理子, 北澤 荘平
2. 発表標題 ヘッジホッグシグナル調節因子Hhipの骨形成過程における役割.
3. 学会等名 第37回骨代謝学会学術集会2019.10.12-14
4. 発表年 2019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	原口 竜摩 (Ryuma Haraguchi) (00423690)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301)	
研究分担者	木谷 彰岐 (Teruki Kidani) (60380234)	愛媛大学・医学部附属病院・講師 (16301)	
研究分担者	福島 万奈 (Mana Fukushima) (70546225)	愛媛大学・医学部附属病院・講師 (16301)	
研究分担者	小原 幸弘 (Yukihiro Kohara) (50792214)	愛媛大学・医学系研究科・助教 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------