

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 現在

機関番号：84414

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 21 年 4 月 1 日 ～ 平成 25 年 3 月 31 日

課題番号：21790351

研究課題名（和文） 酸化ストレスを介した遺伝子発現再活性化による糖尿病骨合併症発症機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of mechanism of the bone complication in diabetes mellitus by reactivation of the gene expression through oxidative stress

研究代表者

森 清（MORI KIYOSHI）独立行政法人国立病院機構大阪医療センター（臨床研究センター）

研究者番号：70432573

研究成果の概要（和文）：糖尿病性骨合併症発症機構を解明するために、特に酸化ストレスに注目し、マウス骨髄間質細胞株を用いて *in vitro* での検討を行った。酸化ストレスは、secreted Frizzled-related protein 4 (sFRP-4)に加えて、破骨細胞分化因子(RANKL)の発現増強、逆に RANKL 阻害因子の Osteoprotegerin (OPG)発現を減少させた。また Wnt/ β -catenin 系シグナルの一部を抑制した。sFRP-4 に着目したところ、本遺伝子プロモータ領域 TATA-box 近傍の CpG アイランドでは、定常状態で高頻度のシトシンメチル化が観察され、メチル化シトシン結合蛋白(MeCP2)を介する転写抑制機構が推察された。一方、酸化ストレス環境下では、この CpG 配列のグアニン 8 位に水酸化が起きた場合、MeCP2 結合に干渉して、TATA-box 結合蛋白(TBP)と TATA-box との結合の促進が観察され、酸化ストレスによる sFRP-4 遺伝子発現再活性化機構を明らかにした。また *in vitro* の観察では、薬剤性に糖尿病を誘発した野生型マウス的大腿骨などで、骨梁減少が観察された。独自に開発した sFRP-4 欠損マウスは、自然経過での加齢による骨量減少に抵抗性であった。急激な酸化ストレスは RANKL を介する急激な骨吸収を促進し、加齢などの緩やかな酸化ストレス下では、sFRP-4 が Wnt/ β -catenin 系を介する骨代謝回転を抑制することで、骨減少症ひいては骨粗鬆症を招来することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of diabetic bone complication, we focused on the oxidative stress and performed *in vitro* studies by using mouse bone marrow stromal cell line. Oxidative stress induced by methylglyoxal (MG) treatment upregulated secreted Frizzled-related protein 4 (sFRP-4) gene expression as well that of osteoclast differentiating factor (RANKL) gene while MG treatment suppressed the expression of Osteoprotegerin (OPG, a RANKL antagonist) gene in reciprocal manner. Furthermore we observed oxidative stress suppressed Wnt/ β -catenin signal transduction pathway. In the analysis of sFRP-4 gene promoter region, we found highly methylated two-tandem cytosine-guanine sequences (CpGs) at 5 bases upstream of TATA-box following to downregulation of sFRP-4 gene transcription through methylcytosine binding protein 2 (MeCP2) recruitment. We observed enhanced adhesion of TATA-box binding protein (TBP) to TATA-box under the condition of oxidative stress. These findings elucidated a part of the mechanisms of restoration in sFRP-4 gene expression induced by oxidative stress. We next designed *in vivo* studies, in which we histomorphologically compared long bones obtained from drug-induced diabetic mice and healthy mice, and we observed reduction of trabecular bones in diabetic mouse femur. Moreover, we originally established sFRP-4 knock-out mice and observed that this animal was resistant to osteopenia due to senescence in natural course. These studies suggest that acute oxidative stress promotes bone resorption through RANKL signaling whereas, in mild and persistent oxidative stress as senescence, sFRP-4 represses turnover of bone metabolism through Wnt/ β -catenin signaling prior to the onset of osteopenia and ultimately osteoporosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨・関節・筋肉・皮膚・感覚器

1. 研究開始当初の背景

塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が、生命現象の多くの場面に重要な役割を担っている。DNAのメチル化は、エピジェネティックな遺伝子発現不活化機序の一つとして知られるが、多くの真核生物では、リン酸結合を介して隣り合うシトシン、グアニン (5'-CG-3', CpG) におけるシトシンの 5 位にメチル化が起きる。このメチル化シトシンは GATC に次ぐ、いわば 5 つめの塩基として、エピジェネティックな制御機構の主役である。

破骨細胞分化因子 RANKL の組織・細胞特異的な発現が、TATA-box 近傍 (3 塩基上流) の非 CpG アイランド領域内のただ 1 か所のメチル化シトシンの有無で規定されることが示された。(Kitazawa R et al. Mol Endocrinol, 2006)。

Wnt アンタゴニストの一つである sFRP-4 遺伝子では、TATA-box 近傍の CpG メチル化が高頻度で存在するにもかかわらず、糖尿病患者血清・組織中にグルコース中間代謝産物として蓄積するメチルグリオキサール(MG) による酸化ストレス下においては、sFRP-4 遺伝子発現が増加する現象を観察した。

2. 研究の目的

プロモーター領域内 TATA-box 近傍に CpG が存在する遺伝子群では、CpG メチル化により発現抑制されている遺伝子において、酸化ストレスがメチル化 CpG 結合蛋白 (MBP) のメチル化 CpG への結合に干渉する機構の存在が想定された。そこで、特に硬組織などにおいて、メチル化により不活化された遺伝子発現が、糖尿病などによる酸化ストレスを介して転写を回復する分子機構を詳細に検討し、糖尿病、加齢などによる酸化ストレスが骨減少を誘導するメカニズムの解析を主にマウス細胞株、マウス個体を用いて解

析することにした。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄間質細胞株 ST2 を用いた in vitro での検討

① メチルグリオキサール (MG) 投与による遺伝子、蛋白発現変動の解析。

ST2 細胞に、細胞毒性を示さない範囲で高濃度の (100 μM) の MG による短期酸化的ストレスを加え mRNA 抽出の後、網羅的遺伝子発現検索、real time RT-PCR を行い、種々の主に骨代謝関連遺伝子の発現変化を観察する。また、蛍光免疫染色法にて、MG 投与前後での sFRP-4 蛋白発現変動を観察する。また、sFRP-4 は Wnt 阻害因子の一つであるため、Wnt シグナル伝達系に関与する蛋白発現をウェスタンブロット法で観察する。

② 酸化ストレスにより発現開腹を示す sFRP-4 遺伝子を含む遺伝子プロモーター領域の構造解析。

網羅的解析にて発現増加を示した遺伝子のうち、プロモーター領域に TATA-box を持ちなおかつ、TATA-box 近傍 (数塩基以内) に CpG を有する遺伝子を in silico で検索する。条件に該当する遺伝子について 5' 上流プロモーター領域の構造を検索し、その後 sodium bisulfite mapping 法により ST2 細胞より回収した DNA を用い TATA-box 近傍の CpG メチル化の頻度 (CpG アイランドであればメチル化の分布) を確認する。

③ TATA-box 直上の CpG メチル化/酸化修飾がメチル化結合蛋白と TATA-box 結合蛋白結合能に及ぼす影響の検討。

ST2 細胞質・核抽出蛋白と、sFRP-4 遺伝子プロモーター領域の TATA-box 周辺配列を基にしたプローブを用い、electrophoresis

mobility shift assay (EMSA)を行う。プローブは TATA-box 直上の CpG のシトシンに対するメチル化修飾プローブとグアニンに対する酸化修飾プローブとを組み合わせて使用する。免疫クロマチン沈降法 (ChIP assay) で sFRP-4 遺伝子 TATA-box 周辺での MBP、TATA-box 結合蛋白 (TBP) 結合能に対する MG 投与による酸化的ストレスが与える効果を検討する。

(2) 糖尿病発症マウスを用いた in vivo での検討

ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスを作成後、成獣より大腿骨を採取し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋ブロックを作成し、HE 標本、sFRP-4 免疫染色標本を作製し、健常マウス大腿骨標本との比較を行う。

(3) sFRP-4KO マウスでの表現型、加齢による硬組織変化の解析

理化学研究所変異マウス開発チームとの共同研究により、sFRP-4 遺伝子ノックアウトマウスの作成が終了したので、これを用いて、若年 (17 週齢) 個体と、高齢 (46 週齢) 個体それぞれから、大腿骨を採取し、骨形態計測、 μ CT などの腫瘍を用いて、それぞれ野生型マウスとの比較を行う。

4. 研究成果

(1) ①マウス骨髄間質細胞株 ST2 では、MG 投与前後で、解析した遺伝子 36,719 個のうち、354 遺伝子が 2 倍以上に発現亢進し、121 遺伝子が 0.5 倍以下に発現低下した。sFRP-4 を含む多くの Wnt/ β catenin シグナル関連遺伝子の発現が有意な変動を示した (下表)。

Table 1. Summary of gene expression profiles in methylglyoxal-treated cells. Genes showing up-regulated (≥ 2 -fold increase) or down-regulated (≤ 0.5 -fold decreased) mRNA expression by 48-hr methylglyoxal treatment.

Up-regulated genes (extract)		Down-regulated genes (extract)	
Genes	Fold change	Genes	Fold change
Hemopoietic progenitor cell antigen (CD34)	9.473	Flammogen activator inhibitor 1 precursor	0.137
Collagen type I precursor (MMP13)	5.926	Tumor necrosis factor receptor superfamily 10b (TNFR2)	0.286
Adiponectin precursor	5.347	Caseinolytic tissue growth factor precursor (CTGF)	0.133
Collagen type III precursor	4.767	Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1)	0.143
Casp-1	4.338	Wnt 1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1)	0.367
Cytokeratin keratin subunit 1 (K17)	3.952	ILK1-specific cytoskeleton	0.289
Hypoxia-inducible growth factor precursor (HIF1)	2.962	Tumor necrosis factor receptor associated factor 1 (TRAF1)	0.427
Growth arrest and DNA damage-inducible 4 (GADD45)	2.815	Wnt 1 inducible signaling pathway protein 2 (WISP2)	0.433
Transcription factor jun B	2.569	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4)	0.439
Run domain 1 (RUN1)	2.562	Proteoglycan type 3, alpha 1 (PGI3)	0.443
Dkk1-like protein 3 precursor	2.524	Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitor alpha (PKAI)	0.469
Collagen type VII alpha 1 precursor	2.295	Integrin alpha 5 precursor	0.476
Collagen type VI alpha 1 precursor	2.165	Integrin alpha 5 precursor	0.484
Glucuronidase transmembrane 4	2.162	GTP-binding protein subfamily A	0.485
Transcription factor C/EBP- β	2.149	Interferon- β	0.485
CD133 transmembrane	2.126	Wnt 1 signaling pathway protein 4 (WISP4)	0.485
Hemopoietic stem cell antigen 1 (CD34)	2.075	Wnt 1 signaling pathway protein 4 (WISP4)	0.485
Myosin II regulatory chain 1 (MYO1B)	2.064	GTP-binding protein 1	0.485
GTP-binding protein 1	2.064		

(Bold face indicates Wnt/ β -catenin signaling pathway-related genes)

また、骨代謝関連遺伝子を含むいくつかの遺伝子について、real-time RT-PCR で発現を確認したところ、MG 投与の前後の比較では、sFRP-4、RANKL、p16INK4a などでも 2 倍以上の高い発現亢進が見られた。

ST2 細胞を用いた蛍光免疫染色では、MG 投与により、細胞質内 sFRP-4 シグナルの増加が観察された。

この他、MG 投与後から継時的に回収した ST2 細胞核抽出物を用いたウェスタンブロット法での検討では、 β -catenin 蛋白の継時

的減少、リン酸化 β -catenin 蛋白の増量が観察された。

(1) ②sFRP-4 遺伝子プロモータ領域 TATA-box 近傍に CpG が集積しており、sodium bisulfite mapping 法で CpG メチル化の頻度を観察したところ、TATA-box 直上に 2 連続して存在する CpG が高頻度にメチル化され (20/24) ており、定常状態での sFRP-4 遺伝子発現を低く保つ機構の一つと推定された。

(1) ③sFRP-4 遺伝子プロモータ領域 TATA-box 周辺配列をプローブとした EMSA では、TATA-box 直上の CpG メチル化導入プローブでメチル化シトシン結合蛋白 (MeCP2) の一つである MeCP2 結合が強化される一方で、同部の 8-OHdG (酸化ストレス状態を模した) 導入により MeCP2 結合は低減された。対照的に、TATA-box 結合蛋白 (TBP) のプローブ結合は、メチル化導入プローブで低減、8-OHdG 導入プローブで増強された。また、MG 投与した ST2 細胞を用いた ChIP assay 法でも、酸化ストレス存在下で MeCP2 結合は低減するが、TBP 結合は強化された。よって、定常状態の sFRP-4 遺伝子プロモータ TATA-box 直上の CpG のメチル化は同遺伝子発現を抑制しているが、酸化的ストレスの負荷は、この発現抑制を阻害し、正に制御することが明らかとなった。

(2) STZ 誘発糖尿病マウス大腿骨と健常マウス大腿骨を HE 標本にて組織学的に比較したところ、同週齢の健常個体に比較して、一次海綿骨骨梁の短縮、減少が観察された。また、パラフィン切片での免疫組織化学的な sFRP-4 蛋白発現を検索したところ、健常個体に比較して、糖尿病個体の骨皮質内膜の骨芽細胞細胞質に陽性シグナルの増加を認めた。

(3) sFRP-4 遺伝子ノックアウトマウス個体は、同週齢の野生型マウスと同様の発生を示し、継代可能であった。体重の推移は、正常マウスと同様であった。また、個々の臓器重量、形状についても正常マウスに比べ、際立った変化は見られなかった。若年 (17 週齢) 個体と高齢 (46 週齢) 個体の大腿骨を用いた解析では、若年個体では骨パラメータ (骨構造に関するパラメータ (海綿骨量、骨梁幅、骨梁数)・骨形成に関するパラメータ (類骨面、骨芽細胞面、骨石灰化面、石灰化速度、骨形成率など)・骨吸収に関するパラメータ (骨吸収面、破骨細胞数、破骨細胞面など)) において、同週齢正常マウスとの間に有意差は見られなかったが、高齢マウスにおいては、骨形成パラメータはやや高く保たれていた。

よって、sFRP-4 は、加齢などの持続的な酸化ストレスによる低代謝回転型骨減少を促進している可能性が明らかとなった。

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 件)

- ① Mori K., et al.: “Derepression of Mouse SFRP-4 Gene Expression by Oxidative Stress: A Plausible Mechanism Leading to Low-turnover Osteoporosis in Diabetes and Senescence.” IOF World Congress on Osteoporosis and 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (IOF WCO-ECCEO 10), Florence, Italy, May 5-8, 2010
- ② 森 清、北澤 理子、近藤 武史、向井 智美、濱田 康弘、北澤 荘平:”高齢 SFRP-4 遺伝子欠損マウスにおける骨代謝形質の検討” 第 99 回日本病理学会総会 東京 2010
- ③ Mori K., et al.: “Oxidative DNA Damage to Methylated CpG Located at Five Bases Upstream of TATA-box Restores Suppressed sFRP-4 Gene Expression: Proposal of A Unique Mechanism towards Diabetic Osteoporosis.” 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Denver, Colorado, USA, September 11-15, 2009
- ④ 森 清、北澤 理子、近藤 武史、濱田 康弘、北澤 荘平:”sFRP-4 遺伝子ノックアウトマウスにおける骨代謝形質の解析” 第 98 回日本病理学会総会 京都 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 清 (MORI KIYOSHI)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター・臨床研究センター・研究員

研究者番号：70432573