

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16936

研究課題名（和文）ラクチル化ヒストン修飾による間葉系幹細胞の分化振り分け機序の解明

研究課題名（英文）Study on the mechanism of cell fate decisions by histone lactylation in mesenchymal stem cell differentiation.

研究代表者

笹 清人（SASA, KIYOHITO）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50823069

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）：ヒストンの修飾は、様々な化学修飾により染色体の高次構造の変化や転写制御、細胞運命の維持などを制御する重要な役割を担っている。近年、ヒストンの新規修飾として乳酸による「ラクチル化」が発見され世界的に注目を集めている。現在までに間葉系幹細胞から骨芽細胞および脂肪細胞への分化をMCT1による乳酸の輸送が制御するというMCTの新しい機能を見出した。そこで本研究では、乳酸によるヒストンのラクチル化が間葉系幹細胞の分化にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。本研究の成果は、乳酸のラクチル化による新たな分化機序の解明に繋がり、新たな骨代謝疾患の治療法の開発に大きく寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸によるヒストン修飾であるラクチル化が骨芽細胞の分化を促進する可能性が示唆された。乳酸は、ほとんどの組織内で産生される物質であり、生体の局所的な応用がしやすい分子であると考えられる。今後のヒストンラクチル化が制御する遺伝子や調節する酵素を詳細に調べることで、新たな骨代謝疾患の標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Modification of histones plays an important role in regulating changes in the higher-order structure of chromosomes, transcriptional regulation, maintenance of cell fate, and the like through various chemical modifications. In recent years, lactylation by lactic acid was discovered as a new modification of histones and has attracted worldwide attention. To date, we have discovered a new function of MCTs: lactate transport by MCT1 regulates the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes. In this study, we will clarify how histone lactylation by lactate affects the differentiation of mesenchymal stem cells. The results of this study will lead to the elucidation of a new differentiation mechanism by lactylation of lactic acid, and may greatly contribute to the development of new therapeutic methods for bone metabolism diseases.

研究分野：骨代謝

キーワード：osteoblast lactylation differentiation

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳酸は解糖系の最終産物としてピルビン酸から乳酸脱水素酵素 (LDH) により生成される。生成された乳酸は、エネルギー源や酸化作用などが多く研究されている。骨は、身体を支える支持機能と Ca を貯蔵する機能をもつ硬組織である。一方で、脂肪組織は余剰なエネルギーを脂肪として貯蓄する器官である。このように性質の全く異なった 2 つの器官だが、構成する細胞の起源はいずれも間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞は、骨組織や脂肪組織の構成細胞である骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などに分化できる多分化能を持つ。これらの分化はそれぞれの転写因子が分化の運命を決定する。老化や肥満では、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化より脂肪細胞への分化が優位になり骨の脆弱化の原因のひとつとなることが知られている。このように骨と脂肪組織は密接な関係が築かれている。

ヒストンは、DNA と結合しているタンパク質である。ヒストンの修飾は、アセチル化やメチル化などの様々な化学修飾により染色体の高次構造の変化、細胞運命の維持などを制御する重要な役割を担っている。クロマチンの後天的な修飾により遺伝子発現が制御される「エピジェネティクス」に重要な働きがある。近年、Y Zhao らによりヒストンの新規修飾として乳酸による「ラクチル化」が発見された。ラクチル化とは、乳酸の部分構造がヒストンタンパクのリジンに結合する修飾の事である。マクロファージが細菌感染などにより M1 (炎症型) に極性化すると解糖系が亢進し乳酸産生が増加し、乳酸によるヒストンのリジン残基のラクチル化が促進する。その結果、炎症の収束を担う M2 の極性化に必要な遺伝子発現が誘導されることを突き止めた。すなわち、乳酸が単なる解糖系の副生成物ではなくヒストン修飾を介して遺伝子発現制御を担う重要なシグナル分子であることが示された。

### 2. 研究の目的

本研究では、乳酸によるヒストンのラクチル化が間葉系幹細胞の分化にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。骨組織および脂肪組織における乳酸によるヒストンのラクチル化の機能を解析することは、間葉系幹細胞の分化の決定に重要な意味を持つと考え、本研究の遂行により「間葉系幹細胞分化の振り分けにおけるヒストンラクチル化によるエピジェネティクス制御」という新たな分野を確立でき、新たな骨代謝疾患の治療法の開発に大きく寄与する可能性がある。

### 3. 研究の方法

骨芽細胞: マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞に BMP2 の刺激より骨芽細胞へ分化を誘導する系を用いて以下の項目について検討を行った。

#### グルコース濃度による骨芽細胞およびヒストンラクチル化の影響

糖代謝の過程で乳酸は産生される。そのため、高グルコースと低グルコース培地で培養した C2C12 細胞を比較した。骨芽細胞分化を ALP 活性染色および骨芽細胞分化マーカー遺伝子 (*Tnap*, *Sp7*, *Runx2*) を Real-time PCR 法にて定量的に遺伝子発現を解析した。また、ヒストンラクチル化のタンパク質量を Western blot 法にて解析した。

#### 乳酸脱水素酵素による骨芽細胞分化およびヒストンラクチル化の影響

乳酸は乳酸脱水素酵素 (LDH A) によりピルビン酸から合成されることから、乳酸の産生を抑えるため、LDH A の阻害剤である Oxamate を添加し骨芽細胞の分化およびヒストンラクチル化を と同様に解析した。

#### ラクチル化制御を担う酵素による骨芽細胞分化の影響

ラクチル化酵素として候補に挙っているヒストンアセチル基転移酵素 p300 の siRNA を導入し、各種

細胞分化マーカー遺伝子およびヒストンラクチル化を と同様に解析した。

脂肪細胞: マウス間葉系幹細胞の細胞株である 10T1/2 細胞に脂肪細胞分化誘導培地 (MDI 培地) を用いて脂肪細胞へ分化誘導する系を用いて行った。

乳酸のトランスポーターである MCT1 の siRNA を導入し後に脂肪細胞へ分化誘導し、脂肪細胞分化マーカー遺伝子およびヒストンラクチル化の量を検討した。

#### 4. 研究成果

C2C12 細胞は BMP-2 により骨芽細胞分化を誘導することが可能である。まず、研究方法 のグルコース濃度の変化による検討を行った結果、高グルコース培地で培養した C2C12 細胞は、低グルコース培地で培養した C2C12 細胞よりも骨芽細胞分化の促進およびヒストンラクチル化が増加した。次に、研究方法 の高グルコース培地で培養した C2C12 細胞に乳酸脱水素酵素 A 阻害剤で刺激したところ、骨芽細胞分化の抑制およびヒストンラクチル化の減少が認められた。また、ヒストンラクチル化を修飾する酵素 p300 の siRNA を導入した C2C12 細胞は骨芽細胞分化の抑制およびヒストンラクチル化の減少が認められた。以上の結果は、未分化な細胞から骨芽細胞へ分化する際に、糖代謝により生成される乳酸が p300 を介して骨芽細胞分化を誘導することを意味している。

MCT1 siRNA により Mct1 遺伝子を knockdown した C3H10T1/2 細胞は、細胞内乳酸濃度の増加と脂肪細胞分化の促進およびヒストンラクチル化の増加が認められた。以上より、間葉系幹細胞や未分化な細胞は、乳酸によるヒストンラクチル化が遺伝子発現を一部、制御している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------