

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659712

研究課題名（和文） 骨形成促進の分子基盤解明

研究課題名（英文） Clarification of molecular basis underlying acceleration of bone formation

研究代表者

今井 祐記 (YUUKI IMAI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任講師

研究者番号：10423873

研究成果の概要（和文）：骨細胞への分化におけるエピゲノムに着目し、分化培地で 4 週間以上培養した MC3T3E1 細胞では、骨細胞マーカーの十分な発現を認めなかった。このことから、骨細胞マーカー遺伝子の転写開始点におけるヒストン H3 の K4 および K27 のメチル化修飾を評価したところ、ともに修飾された bivalent な状態であった。そこで、転写抑制性修飾である K27 の脱メチル化酵素の一つである Kdm6A に着目し、Kdm6A 遺伝子座に loxP 配列を挿入した Kdm6A flox マウスを作出した。

研究成果の概要（英文）： MC3T3E1 cells treated with differentiation medium could not express osteocyte marker genes. Therefore, we focused on epigenetic regulation during osteocyte differentiation. ChIP analyses revealed that methylation levels of H3K4 and K27 on transcriptional start sites of osteocyte marker genes were bivalent status, suggesting that demethylation of H3K27 might to be essential for the differentiation from osteoblast to osteocyte. To examine physiological impact of this phenomenon, we generated flox mice of Kdm6A, demethylase for H3K27.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨、骨粗鬆症、骨細胞、エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む先進諸国において、健康寿命の拡大が期待される中、易骨折性を認める骨粗鬆症患者数は我が国で約 1000 万人存在すると推計されているが、その内わずか 1/3 のみしか何らかの治療を受けていないと推定されているが、健康長寿を獲得するためには、骨粗鬆症の克服が急務と言える。現在、臨床上治療に用いられている主な薬剤は、一部を除きその多くが骨吸収抑制剤であり、骨形成促進治療は副甲状腺ホルモンの間欠投与など、極めて限られている。しかしながら、既存の骨吸収抑制剤をはじめとした治療法

による合併症や組織選択性の問題などがあり、骨形成促進をはじめとした新規薬剤の開発が期待されている。

骨吸収抑制剤以外の骨粗鬆症治療法開発が困難を極めている原因として、骨組織中のおよそ 90% を占める骨細胞の機能および骨芽細胞から骨細胞への分化に関する詳細な分子メカニズムのほとんどが不明であることがあげられる。間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化においては、主要転写因子である Runx2 や Osterix の発見により、その詳細が明らかにされつつあるものの、骨芽細胞から骨細胞への分化に関する分子メカニズムは、

ほとんど解明されていない。

そこで現状を打開する手がかりとしてエピゲノム制御に着目する。全ゲノムが解読された現在、いわゆる遺伝子情報のみでは説明困難な生物現象が、第2の遺伝暗号とも言われるヒストン修飾やDNA修飾をはじめとしたエピゲノム制御を理解することで解き明かされつつあるが、骨・関節におけるエピゲノム制御の生物学的重要性の解明はほとんど報告されていないと言える。そこで、骨芽細胞から骨細胞への分化において、エピゲノム制御の分子メカニズムが解明されれば、新たな骨粗鬆症疾患病態を紐解くことが可能になり、様々な新規治療技術への応用が期待できると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

我が国をはじめとする先進諸国においては、高齢化社会が急激に進行しているが、高齢化が進む社会全体にとって、生命寿命のみならず、健康寿命をも延ばしていくことが必須の克服課題である。全ゲノムが解読された現在、いわゆる遺伝子情報のみでは説明困難な生物現象が、第2の遺伝暗号とも言われるヒストン修飾やDNA修飾をはじめとしたエピゲノム制御を理解することで解き明かされつつあるが、骨・関節におけるエピゲノム制御の生物学的重要性の解明はほとんど報告されていないと言える。そこで、骨芽細胞から骨細胞への分化におけるエピゲノム修飾変化ならびにその制御因子を同定することができれば、新たな骨粗鬆症疾患病態を紐解くことが可能になり、様々な新規治療技術への応用が期待できると考え、本研究の着想に至った。

3. 研究の方法

MC3T3E1細胞を用いて、培養による骨細胞分化系を導入し、その分化前後でのエピゲノム修飾、特にヒストン修飾を中心に変化を確認すると同時に、Microarray解析にてヒストンリジン残基のメチル化および脱メチル化酵素の発現変動を確認する。現在、骨細胞へと分化を果したと考えられる所謂分化マーカーとして、Dmp1やSclerostinなどの分子が同定されている。これらの遺伝子発現を指標として、培養骨芽細胞の分化程度を判定し、そのマーカー遺伝子の発現前後で、エピゲノム修飾変化やエピゲノム制御因子の発現変動を比較することで、骨細胞分化に最も寄与すると考えられるエピゲノム修飾ならびに制御因子の同定を試みる。申請者は、予備的実験ではあるものの、マウス新生仔頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞の培養系におけるヒストン脱メチル化酵素群の一部Jmjdファミリーの分化段階に沿ったの発現変動を確認しており、このような遺伝子発現変動を

手掛かりにエピゲノム制御因子の同定を試みる予定である。

さらに、たんぱく質を抽出し、細胞全体としてのヒストン修飾変動を特にHistone H3リジン残基のメチル化を中心に網羅的にWestern blot法にて確認する。同時に、Dmp1発現を指標とするため、Dmp1転写調節領域におけるヒストン修飾変化をChIPにて確認する。さらに、分化前後の細胞から、RNAを抽出しGene Expression Microarrayを行うことにより、これまでに明らかとなっている発現変動遺伝子のみならず、機能未知遺伝子についてヒストン修飾に関連する機能ドメインから着目し、軟骨分化に関連するエピゲノム制御因子の候補を絞り込む。

4. 研究成果

(1)骨芽細胞系細胞株MC3T3E1細胞は、骨細胞への分化を認めない。

骨芽細胞から骨細胞への分化過程を理解することにより骨形成促進剤開発へとつながると考え、MC3T3E1細胞をアスコルビン酸およびβグリセロリン酸含有の分化培地で4週間以上培養し、経時的に細胞を回収。RNAを抽出しリアルタイムRT-PCR法により、骨細胞マーカー(Dmp1、Mepe、Sost)遺伝子および骨芽細胞分化マーカー(OCN)の発現を解析した。その結果、OCNは時間経過にそって、その発現が有意な上昇を認めたものの、骨細胞マーカー遺伝子群は、軽微な変化は認められたものの、ほとんど発現変動を示さなかった。このことから、骨細胞マーカー遺伝子の転写調節に関連するクロマチン構造を制御するエピゲノムに着目した。

(2)MC3T3E1細胞の骨細胞マーカー遺伝子の転写は負に制御されている。

そこで、エピゲノム修飾の代表であるヒストン修飾に着目した。ヒストンH3K4のメチル化は転写促進に、H3K27のメチル化は転写抑制に関与することが知られている。骨細胞マーカー遺伝子群の転写開始点(TSS: Transcriptional Start Site)におけるH3K4およびK27のメチル化修飾をChIP(クロマチン免疫沈降反応)で評価したところ、すべての骨細胞マーカー遺伝子のTSSにおいてH3K4およびK27が同等に修飾されていることが明らかとなった。このことから、骨芽細胞から骨細胞への分化には、抑制性修飾であるH3K27の脱メチル化が必要であり、MC3T3E1細胞ではこの脱メチル化が充分でないことから、骨細胞へ分化しないことが示唆された。

(3)脱メチル化酵素遺伝子欠損マウスの作出

H3K27の脱メチル化酵素としては、Jmjd3

と Kdm6A の 2 種の酵素が知られている。すでに Jmjd3 遺伝子欠損マウスは存在していることから、Kdm6A 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。ES 細胞に Replacement vector を用いて、Kdm6A flox マウスを作出し、全身性 Cre リコンビナーゼ発現マウスである CMV-Cre マウスと交配させることにより、Kdm6A 遺伝子欠損マウスを作出し、RT-PCR にて遺伝子発現を認めないことを確認した。

今後、後期骨芽細胞-初期骨細胞で Cre を発現する Dmp1-Cre マウス（または、OCN-Cre マウス）との交配により、骨芽細胞から骨細胞への分化における Kdm6A の生体内高次機能を明らかにする予定である。

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)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Imai Y, Youn MY, Inoue K, Takada I, Kouzmenko A, Kato S
Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases
Physiol Rev. 2013 Apr;93(2):481-523.
(査読有)
2. Inoue K, Inoue E, Imai Y.
Female sex hormones ameliorate arthritis in SKG mice
Biochem Biophys Res Commun.
(in press) (査読有)
3. Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Shiroye-Fukuda Y, Yu T, Sekine K, Sato T, Kawano H, Aihara K, Nakamichi Y, Watanabe T, Shindo M, Inoue K, Inoue E, Tsuji N, Hoshino M, Karsenty G, Metzger D, Chambon P, Kato S, Imai Y.
Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control
Endocrinology.
2013 Mar;154(3):1008-20. (査読有)
4. Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y.
Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase
Diabetes. 2013 May;62(5):1426-34.
(査読有)
5. Youn MY, Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Ohtake F, Minehata KI, Yasuda H, Suzuki T, Kato S, Imai Y.
JMJD5, a JmjC-domain-containing protein, negatively regulates osteoclastogenesis through facilitating NFATc1 protein degradation.
J Biol Chem. 2012 Apr 13;287(16):12994-3004.
(査読有)
6. Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim JH, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder R, Brown M, Kato S
GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination
Nature. 2011 Nov 27;480(7378):557-60.
(査読有)
7. Manaka T, Suzuki A, Takayama K, Imai Y, Nakamura H, Takaoka K.
Local delivery of siRNA using a biodegradable polymer application to enhance BMP-induced bone formation.
Biomaterials. 2011 Dec;32(36):9642-8.
(査読有)
8. Okamoto M, Murai J, Imai Y, Ikegami D, Kamiya N, Kato S, Mishina Y, Yoshikawa H, Tsumaki N
Conditional deletion of Bmpr1a in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice.
J Bone Miner Res. 2011 Oct;26(10):2511-22.
(査読有)
9. Imai Y, Kouzmenko A, Kato S
Targeting Fas/FasL signaling, a new strategy for maintaining bone health
Expert Opin Ther Targets
2011 Oct;15(10):1143-5. (査読有)
10. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, Rimm DL, Liu XS, Brown M.
Targeting Androgen Receptor in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer
Cancer Cell 2011 Jul 12;20(1):119-31.
(査読有)
11. Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S.
Signal-sensing activation of a histone lysine demethylase complex
Nat Cell Biol. 2011 Jun;13(6):669-76.
(査読有)
12. Yasuda T, Kometani K, Takahashi N, Imai Y, Aiba Y, Kurosaki T.

- Erk kinases control plasma cell differentiation by regulating expression of Blimp-1
Sci Signal. 2011 Apr 19;4(169):ra25.
 (査読有)
13. 【骨と多臓器ネットワーク】 性ホルモンと骨
今井祐記
 Clinical Calcium 23 巻 2 号
 Page211-217(2013.01) (査読無)
14. 【性決定分化の制御システム:疾患性差・性転換をもたらす母化・♀化のせめぎ合い】 骨伸長と性差
今井祐記
 細胞工学 32 巻 2 号
 Page199-202(2013.01) (査読無)
15. 男性ホルモンの骨代謝における役割
今井祐記
 内分泌・糖尿病・代謝内科 34 巻 5 号
 Page474-477 (2012) (査読無)
16. 破骨細胞分化におけるエピジェネティック制御
 延 珉榮 加藤茂明 今井祐記
 Clinical Calcium 22 巻 5 号
 Page11-18(2012) (査読無)
17. アンドロゲン受容体機能解明へのゲノムワイド解析
今井祐記
 Clinical Calcium 22 巻 5 号
 Page37-42 (2012) (査読無)
18. エストロゲンと骨細胞
 金藤紫乃 今井祐記
 Clinical Calcium 22 巻 5 号
 Page121-126(2012) (査読無)
19. 骨吸収における正と負のエピゲノム制御
今井祐記 延 珉榮 加藤茂明
 炎症と免疫 20 巻 3 号
 Page16-21(2012) (査読無)
20. ASBMR 2011 REPORT 基礎研究トピックス
今井祐記
 Clinical Calcium 22 巻 1 号
 Page108-110(2012) (査読無)
21. 骨組織・骨代謝と核内性ホルモン受容体の機能
今井祐記, 加藤茂明
 日本臨床 69 巻第 7 号
 Page1198-1202(2011) (査読無)
22. 【性差科学の現状】 女性ホルモン受容体による骨代謝制御の分子機構
今井祐記, 加藤茂明
 ファルマシア 47 巻 3 号
 Page203-207(2011) (査読無)
- [学会発表] (計 15 件)
- 1) 日本内分泌学会 2011/4/21 (神戸)
 今井祐記ら
 アンドロゲンによる骨同化作用の分子メカニズム解明
- 2) IBMS/ECTS 2011/5/10 (ギリシャ、アテネ)
 Yuuki Imai et al.
 Identification of Androgen Receptor Function in Osteoblast by Genome-wide Approach Using ChIP-seq
- 3) 日本骨代謝学会 2011/7/28 (大阪)
 今井祐記ら
 アンドロゲンによる骨同化作用の分子メカニズム解明
- 4) ASBMR 2011 2011/9/16-17 (米国、サンディエゴ)
 Yuuki Imai et al.
 Androgen Directly Exerts Anabolic Action through Osteoblastic Androgen Receptor
- 5) 第 12 回日本抗加齢医学会総会 2012.6.23 (横浜)
 今井祐記
 性ホルモン欠乏による骨粗鬆症の分子基盤
- 6) 第 54 回日本老年医学会学術集会 2012.6.29 (東京)
 今井祐記
 性ホルモン受容体による骨代謝調節
- 7) 第 39 回日本毒性学会学術年会 2012.7.17 (仙台)
 今井祐記、延 珉榮
破骨細胞分化におけるエピジェネティック制御
- 8) 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 2012.7.20-21 (東京)
 Yuuki Imai et al.
 Osteoblastic Androgen Receptor mediates androgenic anabolic actions in Bone remodeling
 今井祐記ら
 骨細胞における ERα の高次機能解析
- 9) 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012.10.26 (名古屋)
 今井祐記ら
 軟骨代謝制御における性ホルモン受容体の機能解析
- 10) 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer

2012. 11. 16 (金沢)

Yuuki Imai et al.

Estrogen Exerts Osteoprotective
Function through Facilitating Bone
Formation via ER α in Osteocytes

11) 第 85 回日本生化学会 2012. 12. 16 (福
岡)

今井祐記

骨代謝制御における性ホルモン受容体の
生体内機能解明

〔図書〕(計 1 件)

1) バイオ実験に絶対使える統計の基本 Q&A
羊土社、2012 監修：秋山徹、編集：井元清
哉、河府和義、藤渕航(執筆担当：p139-141、
146-148、152-154)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 祐記 (YUUKI IMAI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任講師

研究者番号：10423873