

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293401

研究課題名(和文) エピジェネティクスを軸とした骨・軟骨再生医療開発への分子基盤の確立

研究課題名(英文) Epigenetic regulation underlying bone and cartilage regeneration

研究代表者

波多 賢二 (Hata, Kenji)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80444496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、再生医療におけるエピジェネティクスの重要性が注目されているが、骨・軟骨細胞分化のエピジェネティクスは不明な点が多く残されている。本研究では、様々な遺伝子スクリーニングシステムを用いて骨・軟骨細胞分化のエピジェネティック制御因子の探索を行い、その生物学的役割の解明を行った。その結果、骨・軟骨細胞分化に重要なIhh-Gli2シグナルを制御する転写因子としてFoxc1およびFoxc2を同定し、骨格形成におけるその重要性を明らかにした。これらの研究結果は、骨・軟骨再生療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidences demonstrated that epigenetic regulation play important roles in tissue regeneration including bone and cartilage regeneration. However, epigenetic regulatory mechanism underlying bone and cartilage development remains to be elusive. In this study, we established several cloning strategy to identify novel epigenetic factors controlling bone and cartilage development. We have identified Foxc1/Foxc2 and found that Foxc1/Foxc2 regulates Ihh-Gli2 signaling during endochondral bone development. We believe that these findings would contribute to the development of novel regenerative medicine for bone and cartilage.

研究分野：口腔生化学

キーワード：軟骨細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会の到来に伴い、歯周病、骨粗鬆症および変形性関節炎を代表とする骨・軟骨疾患の患者数が増大し社会的問題となっている。歯周病の進行により失われた歯槽骨の再生は、歯科領域において古くから重要な研究課題となっているが、未だ完全な歯周組織再生療法の確立には至っていない。また、軟骨組織は自己再生能力が極端に低いことから軟骨再生医療の具現化が強く望まれている。

骨・軟骨組織の再生を可能にするには、足場(マトリックス)と増殖分化調節因子に加えて、骨・軟骨組織を再生することの出来る「幹細胞」の存在が必須である。最近では成人の骨髄や脂肪組織の中に骨・軟骨組織再生を可能にする間葉系幹細胞が存在することが明らかにされ、また山中博士らによる iPS 細胞の発見もあり、幹細胞に関する知識や技術が集積されるに至っている。しかしながら、足場や増殖分化調節因子の改良が飛躍的に進んでいるにもかかわらず、幹細胞から誘導される骨・軟骨細胞集団の不均一性や分化効率の低さが未だ問題として残されている。これら骨・軟骨組織再生における問題解決のアプローチとして近年その重要性が増しているのがエピジェネティクスである。

エピジェネティクスとは DNA の塩基配列を変化させずに遺伝子の発現を調節するメカニズムであり、DNA メチル化やヒストン修飾がそれにあたる。エピジェネティクスは様々な生命現象や疾患に関与することが明らかにされ、再生医療の分野でもその重要性が認識され始めている。実際、成体の脂肪組織や皮膚細胞から採取した細胞群においては DNA メチル化が骨芽細胞および軟骨細胞への分化を阻害していることも報告されている。したがって、効率的な骨・軟骨組織再生法の確立には、骨・軟

骨細胞分化のエピジェネティック制御機構を分子レベルで理解したうえで、エピジェネティック修飾剤による骨・軟骨細胞分化抑制を解除するアプローチが有効となる。しかし、骨芽細胞および軟骨細胞分化のエピジェネティクスは不明な点が多く、ヒストン修飾剤や DNA メチル化阻害剤の利用など臨床応用への展開に関しても検討すべきことが多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究計画では、まず骨・軟骨細胞のエピジェネティクス研究を展開し、骨芽細胞および軟骨細胞分化を制御するエピジェネティック機構の詳細を分子レベルで明らかにする。次に得られた知見に基づき、エピジェネティック因子およびその修飾剤の効果を動物実験モデルで検討する。最終的には、エピジェネティクスを基盤とした効率的な骨・軟骨組織再生の技術開発の具現化に貢献することを最大の目的として研究を遂行する。

3. 研究の方法

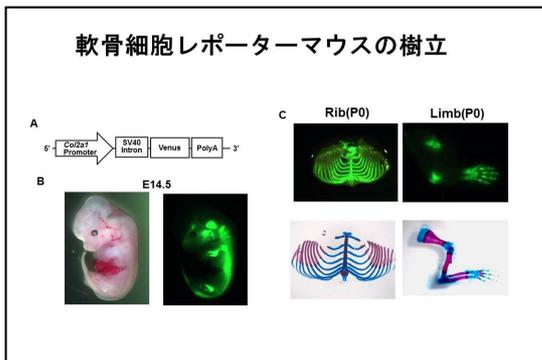
本研究ではまず、未分化間葉系細胞から骨芽細胞および軟骨細胞への分化モデルを用いて骨・軟骨細胞分化に関与するエピジェネティック制御因子の探索を行う。そのためのアプローチとして、レポーターマウスを用いたクローニングシステムの構築、

マイクロアレイおよび DNA メチル化アレイの統合解析による DNA メチル化制御因子の同定を行う。これらのアプローチを用いて骨・軟骨細胞分化におけるエピジェネティック制御因子を同定し、その機能的役割を In Vitro および In Vivo において検討する

4. 研究成果

レポーターマウスを用いたエピジェネティック制御因子の同定

まずはじめに、軟骨細胞を蛍光たんぱく質で特異的にマーキングした軟骨細胞レポーターマウスを作製した。軟骨細胞特異的遺伝子である Col2a1 の 5'上流プロモーター制御下に改良型 YFP 遺伝子を発現させたトランスジェニックベクターを構築した。Tg ベクターを直鎖化した後、交配 0.5 日目の受精卵の前核にインジェクションし、DNA 注入した卵を偽妊娠雌マウスの卵管に戻した。F0 マウスをの尻尾からゲノム DNA を採取しジェノタイプピングを行い Tg マウスを選別した。F0 マウスと野生型 C57Bl6 マウスを交配し F1 マウスを得た。蛍光実態顕微鏡により軟骨組織が改良型 YFP の発現により容易に観察できたことから、レポーターマウスの作製は成功したと考えられる。(下図参照)



次に、上記レポーターマウスを用いて軟骨細胞の分離と遺伝子プロファイリングを行った。軟骨細胞形成が活発な E13.5 日齢マウスより Limb Bud を採取し、0.1% コラゲナーゼ処理により細胞を分離した。その後、FACS-Aria を用いて改良型 GFP 陽性細胞と陰性細胞に分離し、それぞれの細胞群を回収した。これらの細胞を In Vitro で培養することなく、直接 RNA を精製しマイクロアレイ解析を行った。最終的には改良型 GFP 陽性の軟骨細胞での発現が、陰性細胞に比較して 2 倍以上に増加した遺伝子を軟骨細胞特異的遺伝子として同定した。同定されて遺伝子には Col2a1, Sox9 など軟骨細胞に高発現していることがすでに報告

されている遺伝子を含んでいた。

骨、軟骨細胞分化における DNA メチル化遺伝子の同定

引き続き、エピジェネテクス制御機構の一つである DNA メチル化に注目し、軟骨細胞分化における DNA メチル化変動遺伝子の検討を行った。ヒト軟骨細胞と皮膚線維芽細胞を LONZA 社より購入しゲノム DNA を回収した。EZ DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH 社) を用いて、バイサルファイト変換し、DNA 増幅、断片化を行った後、Human Methylation 450 BeadChip にハイブリダイゼーションさせ、45 万以上のメチル化サイトのゲノムワイドな検索を行った。その結果、軟骨細胞において DNA メチル化が亢進している CpG サイトが 31769 か所、DNA メチル化が低下している CpG サイトが 47682 か所存在していた。DNA メチル化の変化が遺伝子発現の変化とリンクするか否かを検討するために同じ皮膚線維芽細胞および軟骨細胞から RNA を採取し、マイクロアレイ解析を行い、DNA メチル化解析との統合解析を行った。その結果、軟骨細胞において遺伝子発現が増加し、DNA メチル化が低下している遺伝子上流 1000bp 以内の CpG サイトを 7410 個同定した。これら CpG サイト近傍の遺伝子には Sox9, Col2a1, アグリカンなど軟骨細胞のマーカー遺伝子も含まれており、軟骨細胞のエピジェネテクス制御に関与する遺伝子のクローニングが行われたと考えられる。

エピジェネティック制御因子の役割の解明

実験 および の解析を行った結果、軟骨細胞に高発現し、さらに DNA メチル化により発現制御されている遺伝子として Fox ファミリーに属する転写因子 Foxc1 および Foxc2 を同定した。Foxc1 は軟骨細胞で約 16 倍の発現増加が見られ chr6:1604606-1615866

(3'UTR;1stExon)に存在するCpGアイランドのメチル化が顕著に減少していた。一方、FOXC2は軟骨細胞で約14倍の発現増加が、そしてchr16:86599355-86602649

(3'UTR;1stExon) 存在するCpGアイランドのメチル化が顕著に減少していた。したがって、これらの遺伝子は軟骨細胞分化においてエピジェネティックに制御されていると考えられる。

Foxc1は軟骨組織に強く発現し、骨・軟骨組織形成に重要な副甲状腺ホルモン関連タンパク(PTHrP)の発現を直接制御していることを見出した。さらに、Foxc1はCol10a1、Gli1およびPtch1などの骨・軟骨におけるIhh標的遺伝子の発現も協調的にその発現を促進した。その分子メカニズムとしてインディアンヘッジホッグのシグナル伝達分子Gli2のDNA結合能を増加させることにより骨格形成過程におけるIhhシグナルを制御していることが明らかとなった。Foxc1遺伝子の自然発症変異マウス(chマウス)、重篤な骨格形成異常を示し、さらにchマウス由来の初代軟骨細胞ではIhhシグナルとその標的遺伝子の発現が減弱していた。また骨格や歯の形成異常を示すAxenfeld-Rieger症候群の原因となる病的FOXC1変異(F112S)の機能解析を行った結果、F112S変異はIhhシグナルとの協調作用が顕著に抑制されていることを見出された。Foxファミリーに属する転写因子の多くはクロマチン構造を緩めることが知られていることから、Foxc1はエピジェネティックにIhhシグナルを制御することにより骨・軟骨形成を制御している可能性が示唆される。

一方、Foxc2は軟骨細胞に発現しているが、Foxc1と異なり腎臓に最も高い発現が認められた。初代培養軟骨細胞にFoxc2を過剰発現させるとPTHrP、Col10a1の発現増加が認められた。また、Gli2と協調してインディアンヘッジホッグ(Ihh)の標的遺伝子であ

る、PTHrP、Ptch1およびGli1の発現を増加させたが、その相乗効果はFoxc1に比較して弱かった。

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)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Wakabayashi H, Wakisaka S, Hiraga T, Hata K, Nishimura R, Tominaga M, Yoneda T. Decreased sensory nerve excitation and bone pain associated with mouse Lewis lung cancer in TRPV1-deficient mice. *J Bone Miner Metab* (in press).
2. Kawai S, Michikami I, Kitagaki J, Hata K, Kiyonari H, Abe T, Amano A, Wakisaka S. Syntaxin 4a Regulates Matrix Vesicle-Mediated Bone Matrix Production by osteoblasts *J Bone Miner Res*. 2017 Mar;32(3):440-448 doi: 10.1002/jbmr.3056.
3. Nakanshi M, Morita Y, Hata K, Muragaki Y. Acidic microenvironments induce lymphangiogenesis and IL-8 production via TRPV1 activation in human lymphatic endothelial cells *Exp Cell Res*. 2016 Jul 15;345(2):180-9. doi:10.1016/j.yexcr.2016.06.006.
4. Yoshida M, Hata K, Takashima R, Ono K, Nakamura E, Murakami T, Sainio K, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. A functional collaboration between Foxc1 and Gli2 controls endochondral ossification. *Nature Commun* 6:6653, 2015 DOI: 10.1038/ncommc7653.
5. Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Yura Y, Nishimura R, Yoneda T. Cellular fibronectin1 promotes VEGF-C expression, lymphangiogenesis and

- lymph node metastasis associated with human oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 32 (7):739-753, 2015, DOI 10.1007/s10585-015-9741-2
6. Morita Y, Morita N, Hata K, Nakanishi M, Kimoto N, Omata T, Nakamura Y, Yoneda T. Cyclooxygenase-2 Expression is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor-C and Lymph Node Metastases in Human Oral Tongue Cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 117 (4):502-510 2014
 7. Hata K, Takashima R, Amano K, Ono K, Nakanishi M, Yoshida M, Wakabayashi M, Matsuda A, Maeda Y, Suzuki Y, Sugano S, Whitson RH, Nishimura R, Yoneda T. Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nature Commun.* 2013 Nov 26;4:2850.
 8. Yoneda T, Tanaka S, Hata K. Role of RANKL/RANK in primary and secondary breast cancer. *World J Orthop.* 2013 Oct 18;4(4):178-185.
 9. Hisada K, Hata K, Ichida F, Matsubara T, Orimo H, Nakano T, Yatani H, Nishimura R, Yoneda T. Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Metab.* 2013 Jan;31(1):53-63.
 10. Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, Tamamura Y, Watanabe T, Haraikawa M, Hamagaki M, Hata K, Kanno J, Yoneda T, Saga Y, Goseki-Sone M, Kaneko K, Yamaguchi A, Iimura T. Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the Mesp2-null mouse: a model of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis. *Bone.* 2013 Mar;53(1):248-258.
- < 総説 >
11. Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nishimura R. Transcriptional network controlling endochondral ossification *J Bone Metab* (in press)
 12. Hata K, Epigenetic regulation of chondrocyte differentiation. *Japanese Dental Science Review*, Volume 51, Issue 4, November 2015, 105-113
 13. 波多 賢二 「口腔疾患に対する PTH および BMP の臨床応用の可能性」 *Clinical Calcium* Vol26 No3 126-133 2016
 14. 波多 賢二 「軟骨細胞の分化誘導法」 10章 軟骨領域での再生医療の現状と製品開発 第1節 2015年10月発行 骨・関節・軟骨治療のための新製品開発と臨床ニーズ 技術情報協会 343-347+
 15. 波多 賢二 骨ペディア 骨疾患・骨代謝・キーワード辞典 「がんの骨転移」 羊土社 2015年5月発行 東京 260-261
- [学会発表](計8件)
1. 波多 賢二 「軟骨細胞分化を制御する転写因子の同定とその役割の解析」 第17回運動器科学研究会 大阪大学中之島センター佐治敬三メモリアルホール 2016年9月2日(金)~3日(土)
 2. 波多 賢二 「内軟骨性骨化を制御する転写因子の同定とその分子メカニズムの解明」 第31回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム1「骨・軟骨分化の制御機構」2016/10/13 福岡
 3. Kenji Hata Transcriptional networks

controlling endochondral bone formation
The 28th Korean Society for Bone and
Mineral Research Autumn Scientific
Congress November 5 /2016 Seoul
Republic of Korea

4. 波多賢二, 吉田倫子, 中村恵理子, 高
畑佳史, 村上智彦, 井関祥子, 山本照子,
西村理行, 米田俊之 転写因子 Foxc1 と
Ihh-Gli2 シグナルの機能的相互作用は骨
格形成に重要である 第9回 骨・軟骨フ
ロンティア 2015/11/7 東京

5. Kenji Hata A functional collaboration
between Foxc1 and Ihh-Gli2 is critical for
endochondral ossification 5th
Japan-Thailand-Korea Joint Symposium
2015/12/3 Daegu ,Republic of Korea

6. Yoshida M, Hata K, Takashima R,
Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura
R, Yoneda T 「The transcription factor
Foxc1 controls endochondral ossification
through the direct regulation of PTHrP
and Col10a1 expression under the
partnership with Gli2 and Runx2」 『The
41st European Calcified Tissue Society
May 17, 2014, Prague, Czech Republic

7. Yoshida M, Hata K, Takashima R,
Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura
R, Yoneda T 「The transcription factor
Foxc1 regulates chondrocyte hypertrophy
in a synergistic cooperation with Runx2」,
『The American Society for Bone and
Mineral Research 2014 36th Annual
Meeting』, September 12, 2014 Houston,
Texas, USA

8. 中村恵理子, 波多賢二, 若林真, 由良
義明, 米田俊之, 西村理行. 内軟骨性骨
形成の後期過程の制御に必要な新規転写
因子 Zfhx4 の同定. 第32回日本骨代
謝学会. 2014年7月25日. 大阪.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

波多 賢二 (HATA, Kenji)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 80444496

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()