

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26253075

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた骨組織のエピジェネティクスと細胞間ネットワークの解明

研究課題名(英文) Epigenetics in osteoclastogenesis

研究代表者

田中 栄 (TANAKA, Sakae)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50282661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,800,000円

研究成果の概要(和文)：RANKLによる骨髄マクロファージ(BMM)から破骨細胞(OC)への分化誘導過程で、NFATc1とIRF8はそれぞれ促進的、抑制的に作用する。本研究では、ChIP-seqの手法を用いて、マウスのBMMとOCの活性化制御領域のモチーフ解析を行い、PU.1モチーフが両方に、IRF8とNFATc1はそれぞれBMMとOCのみに濃縮していた。BMM特異的なPU.1結合領域はBMMでのIRF8結合領域と、OC特異的なPU.1結合領域はOCでのNFATc1結合領域と重なった。破骨細胞分化では、PU.1がそのパートナーをIRF8からNFATc1に替え、エピジェネティクスと遺伝子発現を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：RANKL induces osteoclast (OC) differentiation from bone marrow-derived macrophages (BMMs). NFATc1 and IRF8 play positive and negative roles, respectively, in this process. We used chromatin immunoprecipitation and formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements followed by sequencing to show that PU.1 transcription factor binding motifs were overrepresented at active cis-regulatory regions in both murine BMMs and OCs, while IRF and NFAT binding motifs were selectively enriched at these regions in BMMs and OCs, respectively. BMM-specific PU.1 binding sites were observed to overlap with IRF8 binding sites in BMMs, and this also occurred for OC-specific PU.1 binding sites and NFATc1 binding sites in OCs. Our results suggest that PU.1 switches its transcription partner from IRF8 to NFATc1, and alters the binding regions during RANKL-induced osteoclastogenesis, which is associated with changes in epigenetic profiles and the control of cell-type specific gene expression.

研究分野：骨代謝

キーワード：破骨細胞 エピジェネティクス 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

組織あるいは細胞特異的な遺伝子の発現メカニズムに関する知見のほとんどは、各々の遺伝子に対する遺伝子的、生化学的な研究によりもたらされている。破骨細胞においても様々な破骨細胞特異的な遺伝子について、その近傍における制御領域が同定されており、様々な転写因子の関与が示されてきた。しかしながら、破骨細胞に關与する遺伝子発現制御領域のゲノムワイドな網羅的解析はいまだおこなわれておらず、破骨細胞特異的な遺伝子制御の全貌はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨代謝にかかわる破骨細胞の分化メカニズムを、エピジェネティックな観点から網羅的に解析することである。最先端の次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな研究を行い、既存の研究にない新たな視点から、骨代謝関連疾患に対する創薬につながる成果を目指す。

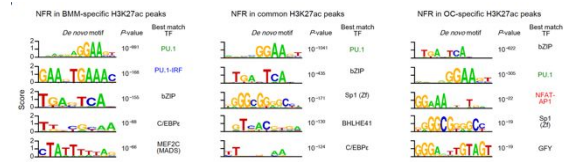
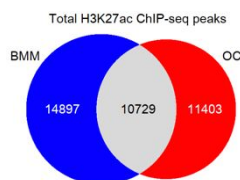
3. 研究の方法

マウスの骨髄マクロファージにRANKLおよびM-CSFを投与して破骨細胞分化を誘導する系を用いる。骨髄マクロファージと破骨細胞において、次世代シーケンサーを用いたChIP-seq、FAIRE-seqの手法を用いて、各分化段階でエピジェネティクスに關与するヒストン修飾、および転写因子の結合領域を網羅的に同定し、解析する。

4. 研究成果

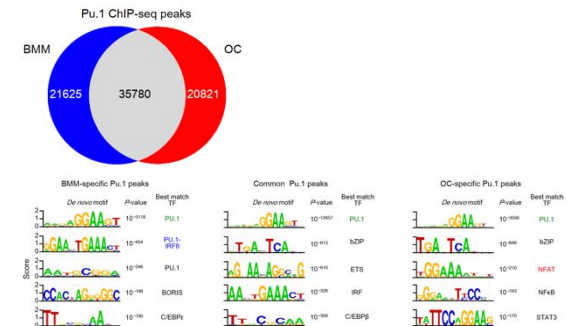
(1) 破骨細胞分化における活性化制御領域

骨髄マクロファージと破骨細胞の活性化制御領域を同定するために、H3K27acに対するChIP-seqを行った。骨髄マクロファージ固有のピークは14897箇所、破骨細胞固有のピークは11403箇所、共通のピークは10729箇所が同定された。さらにFAIRE-seqを行ってヌクレオソームの結合していない領域(nucleosome-free regions; NFRs)を特定し、H3K27acとNFRsの共通領域における新規結合モチーフ解析を行って、骨髄マクロファージと破骨細胞で遺伝子発現制御に関わる転写因子の候補を探索した。骨髄マクロファージ固有領域、破骨細胞固有領域、共通領域のいずれにおいてもPU.1とbZIPの結合モチーフが濃縮していた。一方、PU.1-IRF複合体やC/EBPe、MADSの結合モチーフは骨髄マクロファージ固有領域で、NFATc1-AP1やSp1、GFYの結合モチーフは破骨細胞固有領域に濃縮していた。



(2) 骨髄マクロファージと破骨細胞におけるPU.1結合領域

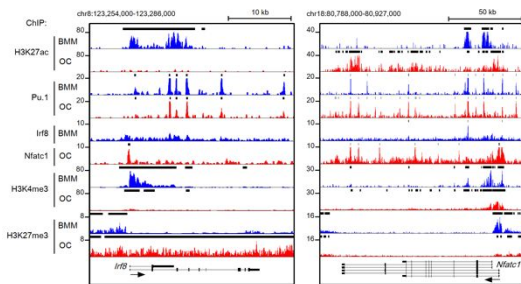
骨髄マクロファージ固有、破骨細胞固有、共通のいずれのH3K27acを伴うNFRsにもPU.1モチーフを認めため、破骨細胞におけるPU.1の役割をより詳細に検証する目的でPU.1のChIP-seqを行った。骨髄マクロファージ固有に21625箇所、破骨細胞固有に20821箇所、共通には35780箇所の結合領域を同定した。PU.1結合領域のうち、骨髄マクロファージに固有のもの、破骨細胞に固有のもの、いずれにも存在する共通のものにつきそれぞれ新規モチーフ解析を行った。PU.1のChIP-seqの結果として想定される通り、いずれにも既知のPU.1の結合配列が強く濃縮していた。それに加え、骨髄マクロファージ固有のPU.1結合領域ではPU.1-IRF8、BORIS、C/EBPeの結合モチーフが、共通のPU.1結合領域ではbZIP、ETS、IRF、C/EBPbの結合モチーフが、破骨細胞固有のPU.1結合領域ではbZIP、NFAT、NFKB、STAT3の結合モチーフが濃縮していた。この結果から、RANKL誘導性破骨細胞分化の過程において、PU.1が細胞種ごとに協調する転写因子のパートナーを切り替えることにより、それぞれの細胞特異的な遺伝子発現を制御している可能性が想起された。



(3) NFATc1とIRF8の結合領域

NFATc1は破骨細胞分化におけるマスター転写因子であり、一方IRF8はRANKL誘導性破骨細胞分化を抑制的に制御する。これら破骨細胞に対して対照的な役割をもつ2つの転写因子について、RNA-seq、histone修飾に対するChIP-seq、およびそれぞれの転写因子に対するChIP-seqを行い、解析を行った。RNA-seqの結果からRANKL誘導性破骨細胞分化の過程ではIrf8の発現は減少し、Nfatc1の発現は増加する。また、転写を抑制的に制御するヒストン修飾であるH3K27me3に対するChIP-seqでは、骨髄マクロファージではNfatc1遺伝子領域にあるH3K27me3修飾が、破骨細胞では減少していた。これに対して、

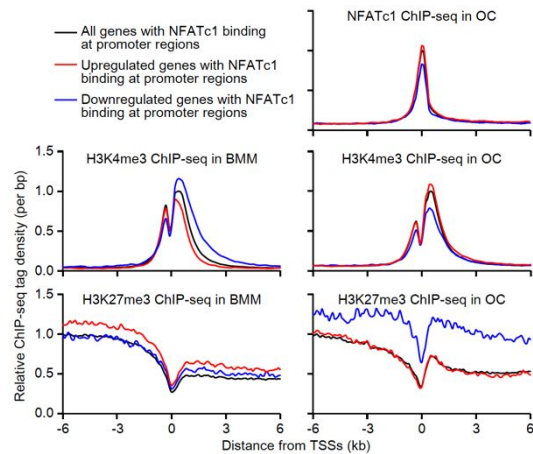
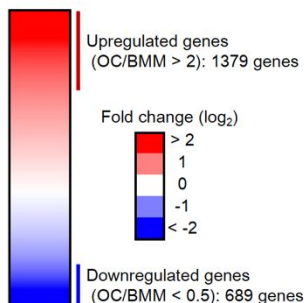
*Irf8* 遺伝子領域では骨髄マクロファージの段階と比較して破骨細胞で H3K27me3 修飾が大幅に増大した。加えて、*Irf8* のプロモータ領域では、転写を亢進する H3K4me3 修飾が骨髄マクロファージと比較して破骨細胞で大幅に減少していた。NFATc1 の結合は *Nfatc1* 自身の遺伝子領域に広く分布しており、その多くで PU.1 が共局在していた。興味深いことに、NFATc1 の結合は破骨細胞での *Irf8* のプロモータ領域にも認められたが、その周囲に PU.1 の結合は認めなかった。



#### (4) NFATc1 制御遺伝子のヒストン修飾

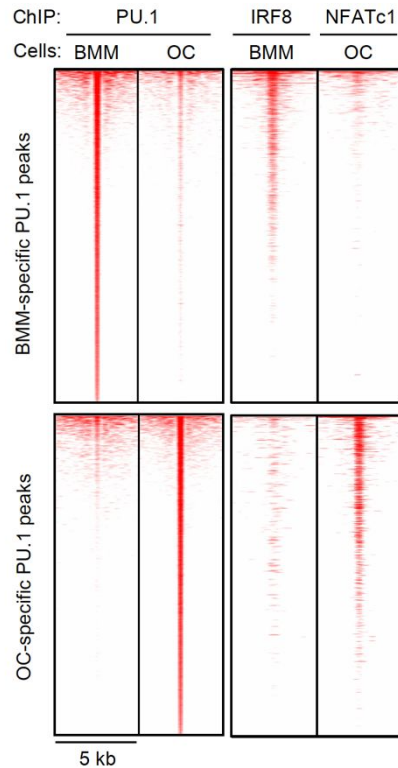
NFATc1 が転写開始点から 2kb 以内に結合するものを NFATc1 制御遺伝子群とし、RNA-seq でこれらの遺伝子群の発現変化を解析した。予想される通り、RANKL 刺激により発現上昇する遺伝子群が存在するが、興味深いことに RANKL 刺激により発現が減少する遺伝子群のプロモータ領域でも NFATc1 の結合が認められた。骨髄マクロファージあるいは破骨細胞において、標準化した mRNA 転写を表す read per kilobases per million (RPKM) が 10 以上である 4976 遺伝子について、NFATc1 が転写開始点から 2kb 以内に結合し、かつ骨髄マクロファージと破骨細胞での発現が 2 倍以上 ( $n=1379$ )、あるいは 0.5 倍以下 ( $n=689$ ) になる遺伝子群について、そのプロモータ領域でのヒストン修飾を解析した。H3K4me3 修飾についてはどちらの遺伝子群においても骨髄マクロファージと破骨細胞で大きな差は認めなかったが、H3K27me3 修飾については、発現が減少する遺伝子群では破骨細胞において大きく修飾が増加していた。一方、発現が増加する遺伝子群では細胞間で明らかな違いを認めなかった。

Promoter regions  
with NFATc1 binding: 4976 genes



#### (5) PU.1 は骨髄マクロファージにおいては IRF8 と、破骨細胞においては NFATc1 と協調して遺伝子発現を制御する

骨髄マクロファージと破骨細胞において、ChIP-seq を用いて PU.1、IRF8、NFATc1 の結合領域を同定し、これらと比較解析した。ヒートマップ解析の結果、骨髄マクロファージ固有の PU.1 結合領域では骨髄マクロファージでの IRF8 結合領域との重なりを認められたが、破骨細胞固有の PU.1 結合領域ではこれを認めなかった。逆に、破骨細胞固有の PU.1 結合領域では破骨細胞での NFATc1 結合領域との重なりを認められたが、骨髄マクロファージ固有の PU.1 結合領域ではこれを認めなかった。



#### (6) 結論

本研究により、RANKL 刺激が骨髄マクロファージのエピジェネティックな環境を変化させ、*Irf8* の発現を抑制し、*Nfatc1* の発現を促進することを示した。さらに、PU.1 はパ

ートナー転写因子を IRF8 から NFATc1 へ切り替えることにより結合部位を変化し、骨髄マクロファージ特異的遺伝子の発現を抑制するとともに破骨細胞特異的遺伝子の発現を促進した。

#### 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2件)

Nakamura Shinya, Koyama Takuma, Izawa Naohiro, Nomura Seitaro, Fujita Takanori, Omata Yasunori, Minami Takashi, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Fujita-Jimbo Eriko, Momoi Takashi, Miyamoto Takeshi, Aburatani Hiroyuki, Tanaka Sakae, Negative feedback loop of bone resorption by NFATc1-dependent induction of Cadm1, PLOS ONE, 査読有, vol.12, 2017, e0175632, DOI:10.1371/journal.pone.0175632

Yasunori Omata, Tetsuro Yasui, Jun Hirose, Naohiro Izawa, Yuuki Imai, Takumi Matsumoto, Hironari Masuda, Naoto Tokuyama, Shinya Nakamura, Shuichi Tsutsumi, Hisataka Yasuda, Kazuo Okamoto, Hiroshi Takayanagi, Atsuhiko Hikita, Takeshi Imamura, Koichi Matsuo, Taku Saito, Yuho Kadono, Hiroyuki Aburatani, Sakae Tanaka, Genomewide Comprehensive Analysis Reveals Critical Cooperation Between Smad and c-Fos in RANKL-Induced Osteoclastogenesis, Journal of Bone and Mineral Research, 査読有, vol.30, No.5, pp.869-877, DOI:10.1002/jbmr.2418

[学会発表](計4件)

伊沢直広、エピジェネティクスからみた破骨細胞分化、運動器科学研究会、2016

伊沢直広、破骨細胞分化において NFATc1 によるクロマチン構造変化には STAT3 が必要である、日本骨代謝学会、2014

Yasunori Omata, TGF- $\beta$  works as an essential mediator for RANKL-induced osteoclastogenesis cooperating with c-FOS, JCR summer international school, 2014

Naohiro Izawa, Genome-wide comprehensive analysis demonstrates that PU.1 cooperates with NFATc1 in osteoclastogenesis, International Conference on Osteoimmunology, 2014

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

田中 栄 (TANAKA, Sakae)  
東京大学医学部附属病院・教授  
研究者番号：50282661

##### (2)研究分担者

廣瀬 旬 (HIROSE, Jun)  
東京大学医学部附属病院・専任講師  
研究者番号：00456112

武富 修治 (TAKETOMI, Shuji)  
東京大学医学部附属病院・講師  
研究者番号：70570018

##### (3)連携研究者

油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)  
東京大学先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号：10202657

##### (4)研究協力者

( )