

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713010

研究課題名(和文) 異所性骨化症の治療を可能にする新技術基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapeutic approach for bone diseases.

研究代表者

西川 恵三 (Nishikawa, Keizo)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：30516290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、石灰化にかかわる骨芽細胞様線維芽細胞や骨破壊を担う破骨細胞に対する新たな創薬標的の同定を試み、創薬研究のための基盤研究として発展させることに取り組む。本研究を通じて、次の4つの成果が得られた。(1) 破骨細胞ならびに骨芽細胞で重要な働きをもつエピジェネティック制御因子を同定した。(2) DNAメチル基転移酵素Dnmt3aの新規阻害剤を同定した。(3) Dnmt3aの新規阻害剤を用いることで、閉経後骨粗鬆症、炎症性骨破壊ならびに真珠腫誘導性骨破壊を呈する3種類の骨病態マウスモデルの治療に成功した。(4) マウスiPS・ES細胞から破骨細胞を効率的に分化誘導する培養法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Our study revealed that Dnmt3a-mediated DNA methylation regulates osteoclastogenesis via epigenetic repression of the anti-osteoclastogenic gene and that Dnmt3a-deficient osteoclast precursor cells do not undergo osteoclast differentiation efficiently. The importance of Dnmt3a in bone homeostasis was underscored by the observation that mice with an osteoblast/osteoclast-specific deficiency in Dnmt3a exhibit a high bone mass phenotype due to a smaller number of osteoclasts. Furthermore, inhibition of DNA methylation by TF-3 abrogated bone loss in models of osteoporosis, rheumatoid arthritis and cholesteatoma. Thus, our study reveals the role of epigenetic processes involved in bone homeostasis, which may provide a novel therapeutic approach for bone diseases.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 エピジェネティクス 骨芽細胞 DNAメチル基転移酵素 Dnmt3a

1. 研究開始当初の背景

平均寿命が延伸した我が国では、高齢者の運動器障害が原因で寝たきりにつながるロコモティブ症候群の問題が指摘されている。骨破壊や異所性の骨化は、運動器障害を引き起こす大きな要因であるが、これらに対する治療法は未だ十分とは言えない。なかでも、異所性骨化症の治療は、高いリスクを伴う外科手術のみであり、新たな治療法の開発が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、石灰化にかかわる骨芽細胞様線維芽細胞や骨破壊を担う破骨細胞に対する新たな創薬標的の同定を試みる。これまで、我々は破骨細胞や骨芽細胞の分化にかかわる転写制御研究に従事しており、新たな分子メカニズムの解明に成功を収めてきた(PNAS 2010, JCI 2010)。転写因子は高い特異性が期待できる創薬標的であるものの、核内受容体を除けば、核内の分子機構を標的とした創薬研究はほとんど例を見ない。しかし、近年、ヒストン修飾酵素などの阻害剤が抗癌剤として有効であることが示されていることから、核内のエピジェネティクス制御を標的とした創薬研究は注目されるアプローチである。そこで、本研究では、破骨細胞や骨芽細胞の分化・成熟過程にかかわるエピジェネティクス制御機構の解明に取り組む。そして、これらの知見を異所性骨化や骨破壊の治療を可能にする新しい創薬研究として発展させることを目標に掲げる。また、人工多能性幹細胞(iPS細胞)から骨芽細胞や破骨細胞を分化誘導する培養法を新規に開発することで、異所性骨化部位で骨吸収と骨形成を細胞療法によって操作する新たな方法論の確立にも挑戦する。

3. 研究の方法

申請研究計画のなかで、研究成果が得られた研究方法5つを以下に記載する。

(1) 骨芽細胞ならびに破骨細胞特異的に複数のDNA修飾酵素を欠損したマウスを作出することで、DNAメチル基転移酵素やDNA新規修飾酵素の生体レベルでの重要性を、 μ CTや病理標本を用いることで、骨組織に対する形態学的影響を解析した。

(2) 上述した遺伝子改変マウス由来の細胞を用いて、骨芽細胞や破骨細胞を分化誘導する初代培養を実施することで、DNA修飾酵素の重要性を細胞レベルで検証した。

(3) 約70個の化合物ライブラリーを用いた*in silico*ドッキングシミュレーションによってDNAメチル基転移酵素の酵素活性ドメインと結合する化合物を探索した。

(4) 3種類の骨病態マウスモデルを作出し、DNAメチル基転移酵素の阻害剤を投与することで、病態改善効果を、 μ CTや病理標本を用いることで解析した。

(5) マウスiPS・ES細胞から破骨細胞を効率的に分化誘導する培養法を確立した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞や破骨細胞特異的にDNA修飾酵素を欠損したマウスの解析。

DNAメチル基転移酵素Dnmt3aを骨芽細胞特異的に欠損したマウスを作出するために、Dnmt3a floxマウスとI型コラーゲン-Creマウスとの交配を行った。一方、Dnmt3aを破骨細胞特異的に欠損したマウスを作出するために、Dnmt3a floxマウスとRank-Cre並びにカテプシンK-Creとの交配を行った。作出したコンディショナルノックアウトマウスの骨表現型を解析した結果、骨芽細胞特異的なDnmt3a欠損マウスの骨量はほとんど影響が見られなかったのに対して、破骨細胞特異的なDnmt3a欠損マウスでは顕著な骨量増加を観察した(図1a, b)。さらに、骨形態計測の結果から、有為な破骨細胞数の減少が見られた。これらの結果は、Dnmt3aが破骨細胞の

分化に生体レベルで重要であることを示している。

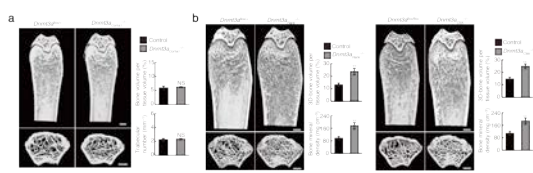


図2 骨芽細胞並びに破骨細胞分化におけるDNA修飾酵素Dmodの重要性の検証

次に、DNA 新規修飾酵素 Dmod の役割を明らかにするために、ノックアウトマウスの作出を行った。Dmod は3つのファミリー遺伝子が存在するために、破骨細胞で高い発現を示す Dmod2 の解析を最初に行った。Dmod2^{flox} マウスと Rank-Cre との交配を行ない、破骨細胞特異的なノックアウトマウスを作出した。しかしながら、ノックアウトマウスにおいて有意な骨量の変化が観察されなかった(図 2a)。他のファミリー遺伝子 Dmod1 と Dmod3 による機能代償が考えられるため、Dmod1Dmod2Dmod3(Dmod)^{flox} マウスと ERT-Cre との交配を行ない、4-ヒドロキシタモキシフェン投与によってノックアウトマウスを作出後、骨表現型の解析を行った。その結果、ノックアウトマウスでは顕著な骨量増加が観察された(図 2b)。これらの結果は、Dmod が骨代謝制御に重要な役割をもつことを示している。

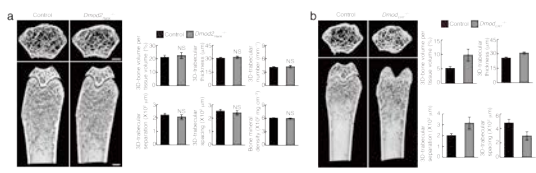


図3 骨芽細胞並びに破骨細胞分化におけるDnmt3aの重要性の検証

(2) 骨芽細胞並びに破骨細胞分化における DNA 修飾酵素の重要性の検証。

Dnmt3a の細胞自律的な重要性を明らかにするために、骨芽細胞あるいは破骨細胞特異的に Dnmt3a を欠損したマウスから骨髓細胞を採取し、骨芽細胞あるいは破骨細胞の分化誘導実験を行った。その結果、Dnmt3a の欠損によって、骨芽細胞分化に影響は見られなかったが、破骨細胞においては細胞分化が阻害することが明らかとなった(図 3a, b)。これらの結果から、Dnmt3a が破骨細胞の分化に重要

な役割を担うことが示唆される。

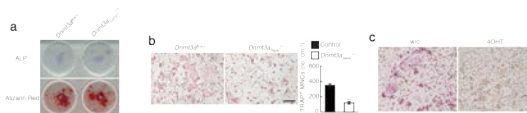


図4 骨芽細胞並びに破骨細胞分化に対するDnmt3aあるいはDnmt3a欠損の影響

次に、Dmod の細胞自律的な重要性を明らかにするために、Dmod^{flox};ERT-Cre マウスから骨髓細胞を採取し、4-ヒドロキシタモキシフェンの存在下で破骨細胞の分化誘導実験を行った。その結果、Dmod の欠損によって、破骨細胞分化が低下することが明らかとなった(図 3c)。この結果から、Dmod が破骨細胞の分化に重要な役割を担うことが示唆される。

(3) Dnmt3a 新規阻害剤の探索。

in silico ドッキングシミュレーションの結果、Dnmt3a の酵素活性ドメインに対して優れたスコア値をもって結合する新規化合物 TF-3 を同定した(図 4a)。TF-3 は、Dnmt のパラログの中で Dnmt3a と Dnmt3b を特異的に阻害することが明らかとなった(図 4b)。

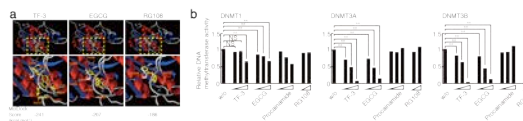


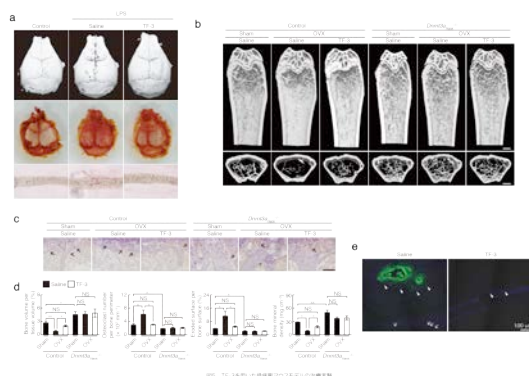
図5 Dnmt3a 阻害剤を用いた骨病態モデルの治療実験

(4) Dnmt3a 阻害剤を用いた骨病態モデルの治療実験。

まず最初に、炎症性骨破壊に対する TF-3 の治療効果を検証した。リポ多糖を頭蓋骨部に直接投与することで、破骨細胞の誘導ならびに骨破壊が誘導される。本マウスに対して TF-3 の投与を行ったところ、破骨細胞の誘導ならびに骨破壊が有意に抑えられた。これらの結果は、TF-3 が炎症性骨破壊に対して有効な候補治療薬となることを示唆する(図 5a)。

次に、閉経後骨粗鬆症に対する TF-3 の治療効果を検証した。卵巣摘出によって破骨細胞の増加ならびに骨量低下を呈する閉経後骨粗鬆症モデルを作出した。本マウスに対して TF-3 を投与したところ、破骨細胞の増加が抑えられ、骨量低下が改善した。これらの結果は、TF-3 が閉経後骨粗鬆症に対して有効な候補治療薬となることを示唆する(図 5b-d)。

最後に、真珠腫誘導性骨破壊に対する TF-3 の治療効果を検証した。耳介由来の線維芽細胞と角化細胞を移植することで、真珠種様腫瘍を誘導することができ、さらに本腫瘍によって破骨細胞を介した骨破壊が生じる。本マウスに対して TF-3 を投与したところ、破骨細胞の誘導が有意に抑えることが明らかとなった。本成果は、TF-3 が真珠腫誘導性骨破壊に対して有効な候補治療薬となることを示唆する(図 5e)。



(5) iPS・ES 細胞から破骨細胞を誘導する培養法の確立。

ハンギングドロップ法によってマウス iPS・ES 細胞から誘導した胚葉体を、IL3 と M-CSF 存在下で培養することで、破骨前駆細胞を誘導した。さらに、得られた破骨前駆細胞に対して、破骨細胞分化誘導因子である RANKL を処理することで、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性の多核の破骨細胞様細胞が分化誘導された。得られた破骨細胞様細胞は、破骨細胞特異的な遺伝子(Ctsk, Acp や Nfatc1 など)を高発現することが明らかとなった。さらに、象牙切片上で培養によって骨吸収能の評価を行ったところ、顕著な骨吸収窩が形成されたことから、誘導された細胞が骨吸収活性をもつことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

① Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Itoi-Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara H and Ishii M, Intercellular communication

between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction. *Molecular and Cellular Biology* 36, 1610-20, 2016.

② 西川恵三 フードケミカルエピジェネティクスによる骨粗鬆症予防～紅茶成分テアフラビンが DNA メチル化制御を抑制する～ *実験医学* 35, 114-6, 2016.

③ 西川恵三 海外文献紹介 *The Bone* 30, 2016.

④ 阪口友香子、西川恵三 注目の海外文献 *Clinical Calcium* 26, 100-101, 2016.

⑤ Nishikawa K Elucidation of the role of metabolic reprogramming in osteoclast differentiation *Clinical Calcium* 26, 713-719, 2016.

⑥ 西川恵三、石井優 細胞内代謝を基軸とした新たな破骨細胞制御 *医学のあゆみ* 257, 1328-29, 2016.

⑦ 西川恵三 代謝リプログラミングを基軸とした破骨細胞分化制御 *Osteo Lipid Vascular&Endocrinology* 6, 24-27, 2016.

⑧ 西川恵三 マクロファージの代謝リプログラミングと制御 *マクロファージのすべて* (松島綱治 編集) 259, 389-396, 2016.

⑨ Kikuta J, Nishikawa K and Ishii M Macrophage dynamics during bone resorption and chronic inflammation *Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation* (Masahiro Miyawaki and Kiyoshi Takatsu edition) 2016 133-145.

⑩ Nishikawa K*, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H and Ishii M*, Dnmt3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosyl methionine-producing metabolic pathway. *Nature Medicine* 21, 281-7, 2015. *

Corresponding author

- ⑪ Naito A, Yamamoto H, Kagawa Y, Naito Y, Okuzaki D, Ohtani K, Iwamoto Y, Maeda S, Kikuta J, Nishikawa K, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Ishii H, Doki Y, Mori M and Ishii M, RFPL4A Increases the G1 Population and Decreases Sensitivity to Chemotherapy in Human Colorectal Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 290, 6326-37, 2015.
- ⑫ 西川恵三、石井優 マクロファージサブセットの代謝リプログラミングの実体とその役割 **感染・炎症・免疫** 45, 278-287, 2015.
- ⑬ 西川恵三 好氣的代謝と共役するエピジェネティック制御を介した新たな破骨細胞制御機構 **臨床免疫・アレルギー科** 64, 1-5, 2015.
- ⑭ 西川恵三 代謝と共役する Dnmt3a を介したエピジェネティクスは破骨細胞分化の制御にかかわる **実験医学** 33, 2115-2118, 2015.
- ⑮ 西川恵三、石井優 DNA メチル基転移酵素 Dnmt3a を介した代謝と共役するエピジェネティクスは破骨細胞の分化の制御にかかわる **ライフサイエンス新着レビュー** 35, 2015.
- ⑯ 西川恵三 破骨細胞の代謝エピジェネティクスの解明 **骨代謝学会企画 1st Author** 1, 2015.
- ⑰ 西川恵三 Maf **骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典(日本骨代謝学会編集)** 86-87, 2015.
- ⑱ Nishikawa K*, Iwamoto Y and Ishii M, Development of an *in vitro* culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell into mature osteoclasts. *Journal of Bone Mineral Metabolism* 32, 331-6, 2014. *

Corresponding author

[学会発表] (計 41 件)

- ① 西川恵三、第 7 回 SENRI の会 大阪 2017 年 1 月 13 日
- ② 西川恵三他、第 90 回日本薬理学会年会 長崎 2017 年 3 月 16 日
- ③ 西川恵三、第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 横浜 2016 年 11 月 30 日
- ④ 西川恵三、第 46 回アステラス病態代謝研究報告会 東京 2016 年 10 月 15 日
- ⑤ 西川恵三、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム 福岡 2016 年 10 月 13 日
- ⑥ 西川恵三、第 2 回ロッテ財団若手研究者の集い 東京 2016 年 9 月 5 日
- ⑦ 西川恵三、第 12 回生体イメージング研究会 京都 2016 年 8 月 8 日
- ⑧ 西川恵三、第 1 回イメージング・プローブ技術セミナー 京都 2016 年 8 月 3 日
- ⑨ 西川恵三、第 37 回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 京都 2016 年 6 月 17 日
- ⑩ 西川恵三、第 68 回日本細胞生物学会 ワークショップ 京都 2016 年 6 月 16 日
- ⑪ 西川恵三、同志社大学 第 3 回遺伝情報セミナー 京都 2016 年 6 月 10 日
- ⑫ 西川恵三、酸素生物学班会議 東京 2016 年 5 月 28 日
- ⑬ 西川恵三、三島海雲学術賞選考会 東京 2016 年 4 月 8 日
- ⑭ 西川恵三、第 89 回日本生化学会年会 仙台 2016 年 9 月 25 日
- ⑮ 西川恵三他、第 63 回日本食品科学工学会年会 京都 2016 年 8 月 26 日
- ⑯ 西川恵三他、第 2 回日本骨免疫学会 沖縄 2016 年 7 月 7 日
- ⑰ Nishikawa K et al. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages Tokyo June 4, 2016
- ⑱ 西川恵三、冬の若手ワークショップ 2016 (転写研究会・転写サイクル・転写代謝シス

テム共催) 山梨 2016年2月5日

①⑨ 西川恵三、酸素生物学班会議・ダイイングコード合同若手会議 千葉 2016年1月27日

②⑩ 西川恵三、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会合同大会 ワークショップ 神戸 2015年12月2日

③⑪ 西川恵三、第18回骨発生・再生研究会 東京 2015年11月28日

④⑫ 西川恵三、第8回骨軟骨フロンティア 東京 2015年11月7日

⑤⑬ 西川恵三、第76回共同研テクニカルセミナー 大阪 2015年9月28日

⑥⑭ 西川恵三、第33回日本骨代謝学会学術集会 シンポジウム 東京 2015年7月24日

⑦⑮ 西川恵三、第1回日本骨免疫学会 宮古島 2015年7月1日

⑧⑯ 西川恵三、ヒューマンメタボロームセミナー 大阪 2015年6月19日

⑨⑰ 西川恵三、転写代謝システム領域班会議 熊本 2015年6月14-16日

⑩⑱ 西川恵三、酸素生物学班会議 京都 2015年5月30、31日

⑪⑲ 西川恵三、第6回大阪免疫塾 大阪 2015年2月3日

⑫⑳ 西川恵三、第2回先進イメージング研究会 神戸 2015年1月9日

⑬㉑ 西川恵三他、第62回日本食品科学工学会 京都 2015年8月27日

⑭㉒ Nishikawa K et al., The 3rd Conference of the Japanese Association for Hypoxia Biology Tokyo July 25, 2015

⑮㉓ 西川恵三他、第1回日本骨免疫学会 宮古島 2015年6月30日

⑯㉔ 西川恵三 第57回日本老年医学学術集会 横浜 2015年6月14日

⑰㉕ 西川恵三他、第88回日本薬理学会年会 名古屋 2015年3月20日

⑱㉖ 西川恵三、第87回日本生化学会大会 京

都 2014年10月18日

⑳㉗ 西川恵三、転写代謝システム領域班会議 仙台 2014年7月11-13日

㉘㉙ Nishikawa K、Symposium Immunology and Infection Biology Sweden 2014年6月10日

㉚㉛ 西川恵三他、第12回日本機能性食品医学学会年会 京都 2014年12月13日

㉜㉝ 西川恵三他、第37回日本分子生物学会年会 横浜 2014年11月

㉞㉟ Nishikawa K et al., Development of an *in vitro* culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell into mature osteoclasts. 第87回日本薬理学会年会 仙台 2014年3月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

名称:

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 恵三 (NISHIKAWA KEIZO)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授(常勤)
研究者番号: 30516290

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし