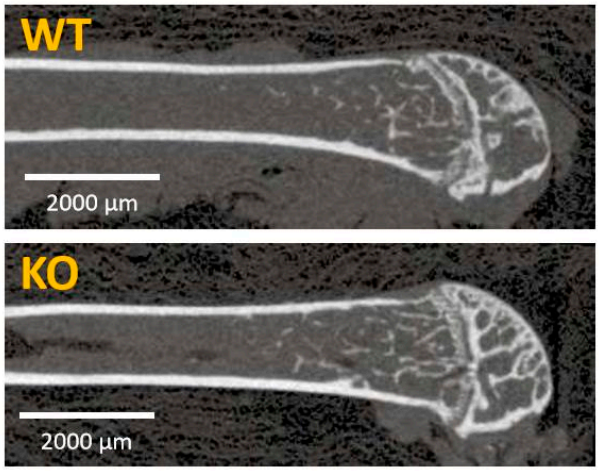
35　ヒストン脱メチル化制御による骨形成促進機構の解明	酒井　寿郎

【目的】現代社会では肥満を背景にした糖脂質代謝異常、動脈硬化などの生活習慣病患者が増加し、また超高齢化社会を迎え骨粗鬆症やサルコペニアの対策も重要な課題となっている。生活習慣病の発症進展には遺伝因子とともに環境因子の関与が重要である。我々はこれまで、エピゲノム制御の観点から生活習慣病に関する研究を推進し、最近では褐色脂肪や白色脂肪細胞において、環境因子に対する反応が急性期【応答】と慢性期【適応】で異なる遺伝子発現制御を経ることを示し、エピゲノム制御により生活習慣病発症に至る詳細な分子基盤を報告した。脂肪組織と骨は同じ間葉系幹細胞に由来する。そこで本研究では、我々のこうした研究背景を活かして、骨形成に関与するエピゲノム機構を解明し、骨粗鬆症の新規治療薬標的を提示することを目的とした。

【方法】我々はある種のヒストン脱メチル化酵素に着目し、そのノックアウトマウスを用いて、骨形成への寄与を調べることとした。12 週齢の野生型マウスおよびノックアウトマウスから大腿骨をサンプリングし、その大腿骨遠位の骨量をマイクロ CT を用いて測定した。生後 3〜4 日目の時点で、野生型マウスおよびノックアウトマウスから頭蓋骨をサンプリングし、コラゲナーゼ・トリプシンを用いた酵素処理によって初代骨芽細胞を単離・培養した。骨芽細胞分化誘導をかけ、アルカリホスファターゼ活性を測定した。また、石灰化をアリザリンレッド S 染色で評価した。12 週齢の野生型マウスおよびノックアウトマウスから大腿骨および脛骨をサンプリングし、骨髄細胞を培養した。M-CSF および RANKL を用いて破骨細胞分化を刺激し、RANKL 添加開始 3 日後に細胞を固定し、TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。

【結果】野生型マウスと比較して、ノックアウトマウスでは骨量が増加しており、その骨形成と骨吸収を検証すると、骨吸収に関しては両群で差がなく、骨形成に関してはノックアウトマウスで亢進していた。このことから、ヒストン脱メチル化酵素の欠損によって骨形成が促進され、個体レベルでの骨量増加につながっていると推測された。

骨量の評価



35. ヒストン脱メチル化制御による骨形成促進機構の解明

酒井　寿郎

*東北大学 大学院医学系研究科 細胞生物学講座 分子生理学分野

Key words：エピゲノム，ヒストン脱メチル化，骨形成，骨芽細胞

緒　言

現代社会では肥満を背景にした糖脂質代謝異常、動脈硬化などの生活習慣病患者が増加し、また超高齢化社会を迎え骨粗鬆症やサルコペニアの対策も重要な課題となっている。生活習慣病の発症進展には遺伝因子とともに環境因子の関与が重要である。我々はこれまで、エピゲノム制御の観点から生活習慣病に関する研究を推進し［1〜4］、最近では褐色脂肪や白色脂肪細胞において、環境因子に対する反応が急性期【応答】と慢性期【適応】で異なる遺伝子発現制御を経ることを示し、エピゲノム制御により生活習慣病発症に至る詳細な分子基盤を報告した［5，6］。急性の寒冷刺激ではβアドレナリン刺激が急性に熱産生遺伝子のクロマチンの三次元立体構造を変化させ、急速な遺伝子発現を担う。一方で、この急速な刺激と考えられていたβアドレナリン刺激は、慢性的な寒冷刺激には白色脂肪細胞のエピゲノムをヒストン脱メチル化によって変化させ、熱産生能を有するベージュ細胞に形質を変化させることで環境に適応していくというメカニズムを初めて明らかにした。

脂肪組織と骨は同じ間葉系幹細胞に由来する。発生初期の未分化状態では、分化制御の鍵となる調節遺伝子ではビバレントクロマチンを形成し刺激に応じてどちらの方向にもただちに分化できるような準備状態にある。これに加え、我々は新規のビバレントクロマチンドメイン（H3K4／H3K9me3）を発見し、前駆細胞から成熟細胞への分化する直前の前駆脂肪細胞の段階でとどめておくエピゲノム機構を解明した［7］。さらに、我々は骨芽細胞の活性化にはLRP5-Wnt／β-catenin シグナルを介した転写制御が重要であることを解明した［8］。

そこで本研究では、我々のこうした研究背景を活かして、骨形成に関与するエピゲノム機構を解明し、骨粗鬆症の新規治療薬標的を提示することを目的とした。

方法および結果

1. マイクロ CT による骨量解析

我々はある種のヒストン脱メチル化酵素に着目し、そのノックアウトマウスを用いて、骨形成への寄与を調べることとした。まず、同遺伝子が野生型マウスの骨組織でも発現していることを、定量 PCR およびウェスタンブロットで確認した。また、ノックアウトマウスでは同遺伝子が正しくノックアウトされていることも確認した（図表略）。

その上で、12 週齢、メスの野生型マウスおよびノックアウトマウスから大腿骨をサンプリングし、その大腿骨遠位の骨量をマイクロ CT を用いて測定した。すると、野生型マウスと比較して、ノックアウトマウスでは骨量が有意に増加していた（図 1）。この結果はメスのみではなく、オスで比較しても同様であった。

*現在の所属：東北大学 大学院医学系研究科 細胞生物学講座 分子代謝生理学分野

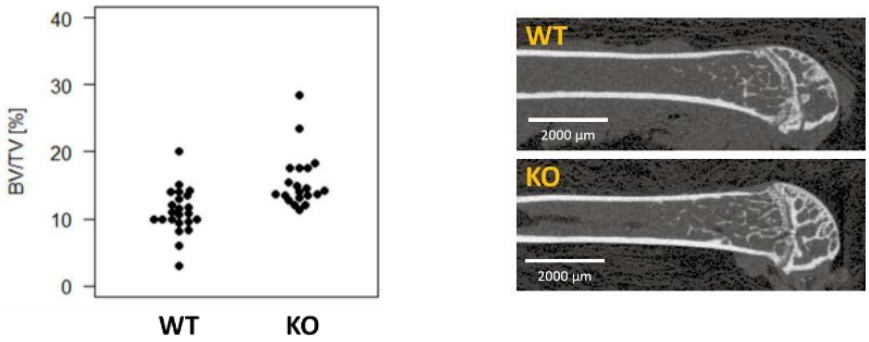


図 1. マイクロ CT による骨量解析

12 週齢、メスの野生型マウスとノックアウトマウスの大腿骨を用いて、その骨量をマイクロ CT で測定した。

左）野生型マウスとノックアウトマウスの各群の骨量を示す。BV/TV：Bone volume/Tissue volume。t-検定にて両群に有意差あり（$p < 0.01$）。

右）各群の代表的な個体における CT 撮影像を示す。スケールバーは 2,000 μm。

2. 骨形成の評価

骨組織では骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が繰り返されており（骨リモデリング）、その両者のバランスによって骨量が規定されている。

我々は、ノックアウトマウスにおいて骨量が増加していたという結果を受けて、初代培養細胞において骨形成および骨吸収の作用を検証することとした。

まずは、生後 3〜4 日目の時点で、野生型マウスおよびノックアウトマウスから頭蓋骨をサンプリングし、コラゲナーゼ・トリプシンを用いた酵素処理によって初代骨芽細胞を単離・培養した。そして、アスコルビン酸およびβグリセロリン酸を含む分化誘導培地で骨芽細胞分化誘導をかけ、分化開始 7 日後に細胞を回収し、アルカリホスファターゼ活性を測定した。すると、オスにおいてもメスにおいても、野生型マウスと比較して、ノックアウトマウスではアルカリホスファターゼ活性が有意に上昇していた（図 2）。

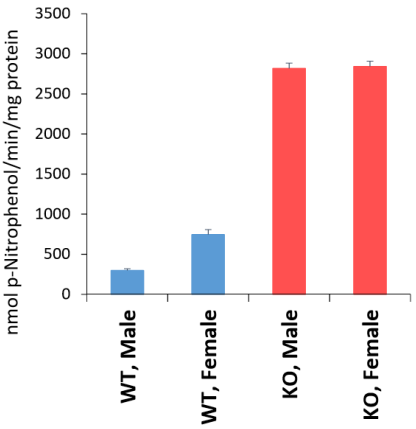


図 2. 初代骨芽細胞における骨形成能の評価 1

生後 3〜4 日目の野生型マウスとノックアウトマウスの頭蓋骨から初代骨芽細胞を単離して培養した。アスコルビン酸およびβグリセロリン酸を含む分化誘導培地で骨芽細胞分化誘導をかけ、分化開始 7 日後に細胞を回収し、アルカリホスファターゼ活性を測定した.平均値＋標準偏差を示す。ANOVA および SNK 検定にて、オスにおいてもメスにおいても、野生型マウスとノックアウトマウスに有意差あり（$p < 0.01$）。

また、同様の手法にて単離・培養した野生型マウスおよびノックアウトマウス由来の初代骨芽細胞を、アスコルビン酸およびβグリセロリン酸を含む分化誘導培地で骨芽細胞分化誘導をかけ、分化開始 3 週間後に固定し、アリザリンレッド S で染色した。すると、オスにおいてもメスにおいても、野生型マウスと比較して、ノックアウトマウスでは石灰化が促進していた（図 3）。

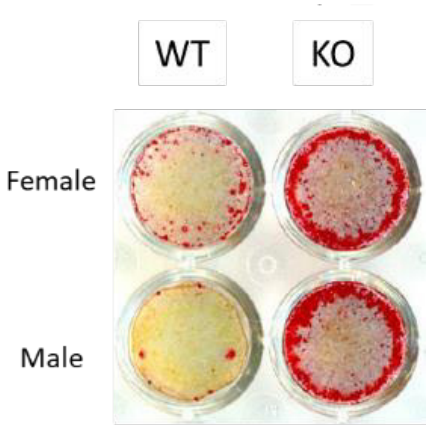


図 3. 初代骨芽細胞における骨形成能の評価 2

生後 3～4 日目の野生型マウスとノックアウトマウスの頭蓋骨から初代骨芽細胞を単離して培養した。アスコルビン酸およびβグリセロリン酸を含む分化誘導培地で骨芽細胞分化誘導をかけ、分化開始 3 週間後に細胞を固定し、アリザリンレッド S で染色した。

3. 骨吸収の評価

続いて、破骨細胞による骨吸収の評価を行った。12 週齢、メスの野生型マウスおよびノックアウトマウスから大腿骨および脛骨をサンプリングし、フラッシュして取り出した骨髄細胞を培養した。M-CSF および RANKL を用いて破骨細胞分化を刺激し、RANKL 添加開始 3 日後に細胞を固定し、TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。計測の結果、野生型マウスおよびノックアウトマウスの両群で、破骨細胞数は同程度であった（図 4）。

また、破骨細胞機能を表す代表的な遺伝子の遺伝子発現を定量 PCR で評価したが、これも野生型マウスおよびノックアウトマウスの両群で同程度であった（図表省略）。

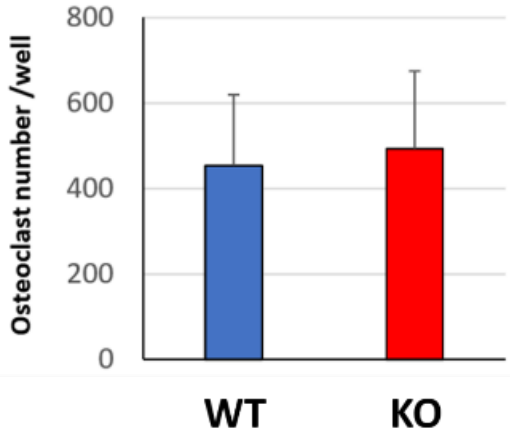


図 4. 破骨細胞の評価

12 週齢、メスの野生型マウスおよびノックアウトマウスから大腿骨および脛骨をサンプリングし、取り出した骨髄細胞を培養した。M-CSF および RANKL を用いて破骨細胞分化を刺激し、RANKL 添加開始 3 日後に細胞を固定し、TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。

平均値＋標準偏差を示す。t-検定にて両群に有意差なし。

考　察

本研究に関してこれまで得られた結果をまとめると、野生型マウスと比較して、ノックアウトマウスでは骨量が増加しており、その骨形成と骨吸収を検証すると、骨吸収に関しては両群で差がなく、骨形成に関してはノックアウトマウスで亢進していた。このことから、ヒストン脱メチル化酵素の欠損によって骨形成が促進され、個体レベルでの骨量増加につながっていると推測された。

今後は、骨組織切片の解析による骨形成・骨吸収の評価を行うとともに、骨芽細胞におけるヒストン修飾の変化がどのようにして骨形成につながっているか、その分子メカニズムの解析を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野の佐藤信吾先生、越智広樹先生との共同研究です。本研究を進めるにあたり、研究を実際に進めてくださった荒井誠先生、平川弘幸先生に感謝申し上げます。そして、研究費の支援をいただいた上原記念生命科学財団に感謝申し上げます。

文　献

1) Sakakibara I, Fujino T, Ishii M, Tanaka T, Shimosawa T, Miura S, Zhang W, Tokutake Y, Yamamoto J, Awano M, Iwasaki S, Motoike T, Okamura M, Inagaki T, Kita K, Ezaki O, Naito M, Kuwaki T, Chohnan S, Yamamoto TT, Hammer RE, Kodama T, Yanagisawa M, Sakai J. Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2. Cell Metab. 2009 Feb;9(2):191-202. PMID: 19187775 DOI: 10.1016/j.cmet.2008.12.008.

2) Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. Mol Cell Biol. 2009 Jul;29(13):3544-55. Epub 2009 May 4. PMID: 19414603 Doi: 10.1128/MCB.01856-08.

3) Okamura M, Kudo H, Wakabayashi K, Tanaka T, Nonaka A, Uchida A, Tsutsumi S, Sakakibara I, Naito M, Osborne TF, Hamakubo T, Ito S, Aburatani H, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. COUP-TFII acts downstream of Wnt/beta-catenin signal to silence PPARgamma gene expression and repress adipogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 7;106(14):5819-24. Epub 2009 Mar 23 PMID: 19307559 DOI: 10.1073/pnas.0901676106.

4) Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura M, Naito M, Kodama T, Shinkai Y, Sakai J. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. Genes Cells. 2009 Aug;14(8):991-1001. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19624751 Doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01326.x.

5) Abe Y, Rozqie R, Matsumura Y, Kawamura T, Nakaki R, Tsurutani Y, Tanimura-Inagaki K, Shiono A, Magoori K, Nakamura K, Ogi S, Kajimura S, Kimura H, Tanaka T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, Inagaki T, Sakai J. JMJD1A is a signal-sensing scaffold that regulates acute chromatin dynamics via SWI/SNF association for thermogenesis. Nat Commun. 2015 May 7;6:7052. PMID: 25948511 Doi: 10.1038/ncomms8052.

6) Abe Y, Fujiwara Y, Takahashi H, Matsumura Y, Sawada T, Jiang S, Nakaki R, Uchida A, Nagao N, Naito M, Kajimura S, Kimura H, Osborne TF, Aburatani H, Kodama T, Inagaki T, Sakai J. Histone demethylase JMJD1A coordinates acute and chronic adaptation to cold stress via thermogenic phospho-switch. Nat Commun. 2018 Apr 19;9(1):1566. PMID: 29674659 Doi: 10.1038/s41467-018-03868-8

7) Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, Yoshida A, Kano Y, Kimura H, Tanaka T, Tsutsumi S, Nakao M, Doi T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, Sakai J. H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation. Mol Cell. 2015 Nov 19;60(4):584-96. PMID: 26590716 Doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.025.

8) Fujino T, Asaba H, Kang MJ, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim DH, Ioka RX, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J, Yamamoto TT. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 7;100(1):229-34. Epub 2002 Dec 30. PMID: 12509515