

破骨細胞のエピジェネティック制御機構の解明
大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 細胞動態学
西川 恵三

1. はじめに

関節リウマチや骨粗鬆症に伴う運動器障害は、高齢化社会を背景に重大な社会問題である。この病態発症には、骨吸収活性をもつ破骨細胞の分化亢進が深く関係していることから、破骨細胞を標的とする骨吸収抑制剤の開発は焦眉の急である。ビスホスホネート製剤は上市された骨吸収阻害剤の中で最も有用であるものの、様々な副作用(顎骨壊死、食道炎や食道癌)が指摘されていることから、高い特異性をもつ新薬の開発が必要とされている。申請者は、破骨細胞機能を阻害する化合物の探索研究を通じて(1)、高い特異性を発揮できる創薬標的として、転写制御機構に注目している。しかし、これまでに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。この一方で、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黎明期にあるとも考えられる。従って、破骨細胞のエピジェネティクス制御を標的とした創薬応用の是非は重要な検討課題と挙げられるが、このために必要な破骨細胞のエピジェネティクス制御機構はほとんど明らかでない。そこで、本研究では、破骨細胞分化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ことで、『破骨細胞のエピゲノム創薬』に資する分子基盤の確立を目的とする。

2. 方法

メチル化制御にかかわるエピジェネティクス制御因子Rimr(仮名)の遺伝子座にfloxed配列をもつ遺伝子改変マウスを入手し、破骨細胞特異的にCreを発現するCtsk-CreやRANK-Creと交配することで(2, 3)、破骨細胞特異的にRimrを欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作出した。また、骨芽細胞特異的にCreを発現するCol1a1-Creとも交配することで、骨芽細胞特異的にRimrを欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作出した(4)。コンディショナルノックアウトマウスの骨表現型を、 μ CTならびに骨形態計測によって評価した(2)。さらに、長管骨より骨髓細胞を採取することで、破骨細胞の初代培養を試み、それぞれの細胞におけるRimrの細胞自律的な役割の解析も実施した(5)。

3. 研究成果

破骨細胞分化過程で取得したトランスクリプトームデータを用いて、全転写因子の発現パターンを網羅的に解析した結果、破骨細胞分化誘導因子 RANKL の刺激に伴って、発現誘導される転写因子を同定した(2)(図1)。同定遺伝子の中で、メチル化制御に関与することが知られているエピジェネティクス制御因子 Rimr の解析を実施した。Rimr の発現は、破骨細胞分化に伴ない増加するが、骨芽細胞ではほとんど発現変動を示さない(図2)。生体レベルでの Rimr の重要性を検討するために、Rimr の floxed マウスと破骨細

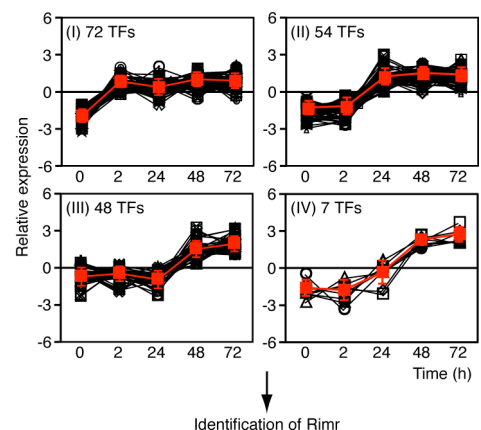


図1 破骨細胞のトランスクリプトームデータを用いた転写因子の発現解析

胞特異的に Cre を発現する *Ctsk*-Cre 並びに *RANK*-Cre、あるいは骨芽細胞特異的に Cre を発現する *Col1a1*-Cre と交配することで、破骨細胞あるいは骨芽細胞特異的に *Rimr* を欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作出し、骨表現型の解析を実施した(図3)。その結果、破骨細胞特異的に *Rimr* を欠損したマウスにおいては、骨量の増加、並びに破骨細胞数や骨吸収面

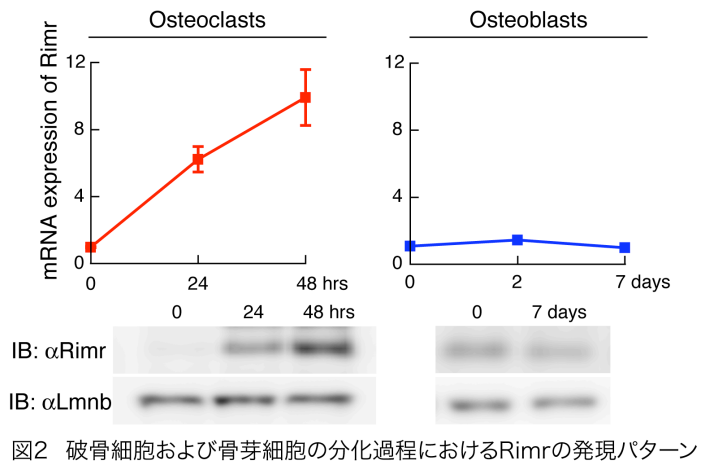


図2 破骨細胞および骨芽細胞の分化過程における*Rimr*の発現パターン

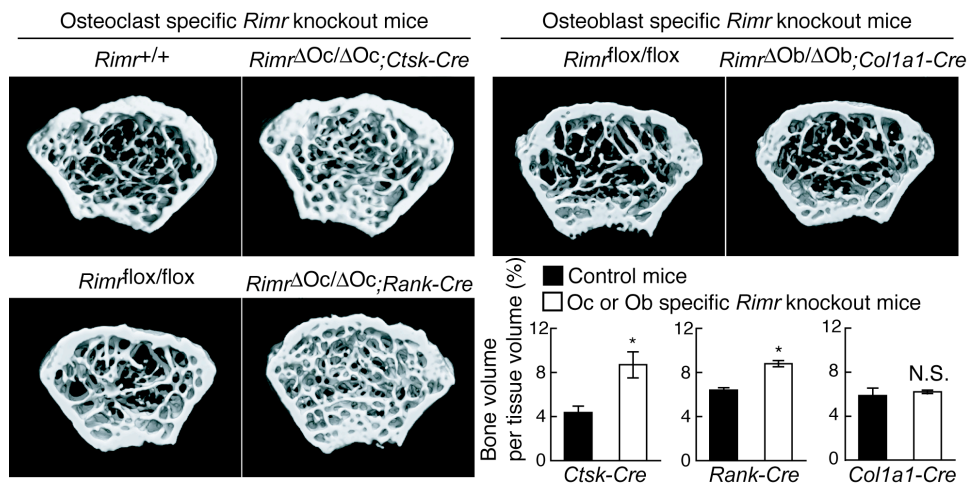


図3 破骨細胞および骨芽細胞特異的な*Rimr*遺伝子欠損マウスの骨表現型

の低下が観察された。一方で、骨芽細胞特異的に *Rimr* を欠損したマウスにおいては、骨量の有為な変化は観察されなかった。以上の結果から、*Rimr* は、骨芽細胞でなく、破骨細胞において重要な機能を有することが示唆される。続いて、細胞レベルでの *Rimr* の重要性を検討するた

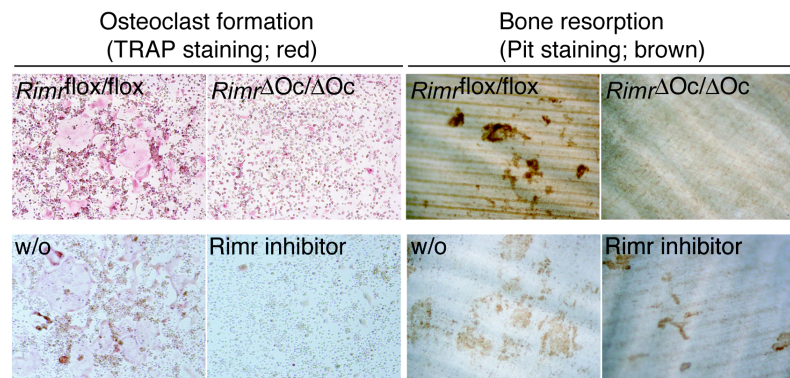


図4 *Rimr*遺伝子の欠損細胞を用いた破骨細胞の分化誘導実験

めに、破骨細胞特異的に *Rimr* を欠損したマウスより骨髓細胞を取得し、破骨細胞の初代培養を実施した(図4)。その結果、破骨細胞分化および骨吸収能の低下が観察された。さらに、*Rimr* の阻害剤を用いた場合も、同様な結果が得られた。以上の結果から、*Rimr* は、細胞自律的に破骨細胞分化に関与することが示唆される。

*In vitro*ならびに *in vivo*実験の結果、エピジェネティクス制御因子*Rimr*が破骨細胞形成において重要な機能をもつことが明らかとなったので、続いて、*Rimr*を標的とした治療実験を試みた。まず最初に、骨粗鬆症モデルに対する治療実験を実施した。破骨細胞分化誘導因子RANKLの組み換えタンパクをマウス個体へ投与することで、破骨細胞分化が惹起され、骨量の低下を示す骨粗鬆症様表現型を誘導できる(6)。このマウスに、*Rimr*の阻害剤を同時投与した結果、骨量の低下が抑制さ

れた(図5)。次に、炎症性骨破壊モデルに対する治療実験を実施した。リポ多糖を頭蓋骨周辺部に投与することで、炎症反応が惹起され、破骨細胞分化の誘導、並びに頭蓋骨部位の骨破壊像が観察される(6)。このマウスに、Rimrの阻害剤を同時投与した結果、破骨細胞の誘導、並びに骨破壊が抑制された(図6)。以上の結果から、骨粗鬆症並びに炎症性骨破壊を治療する手段として、Rimrは有効な創薬標的となることが示唆される。

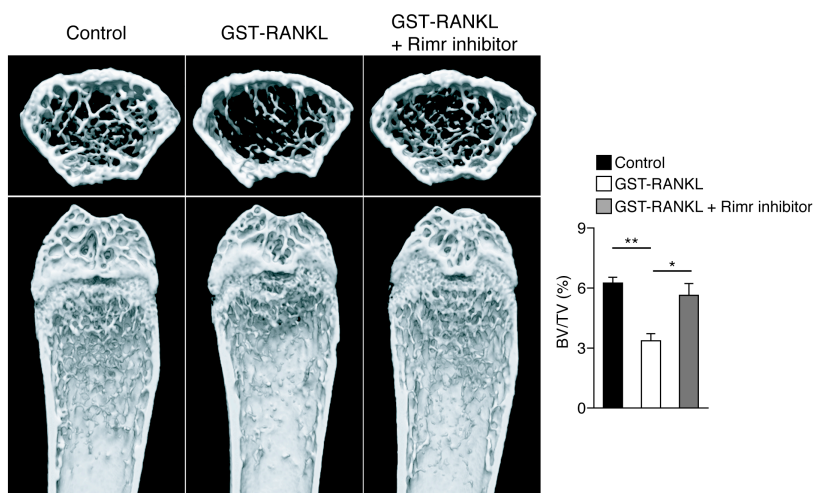


図5 Rimr阻害剤を用いた骨粗鬆症モデルの治療効果

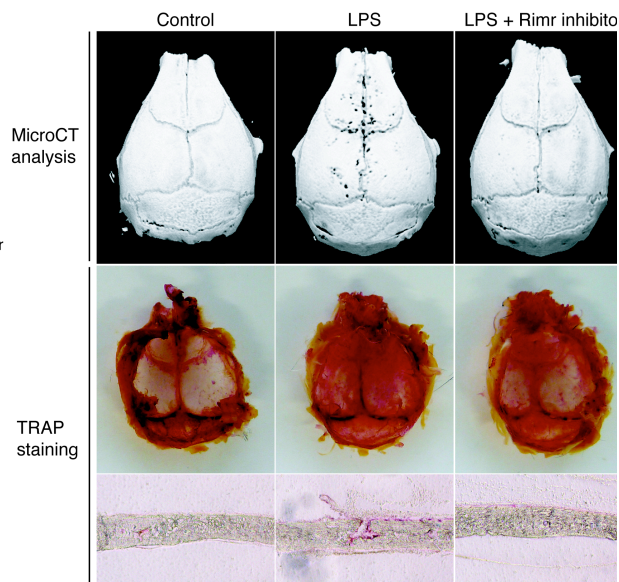


図6 Rimr阻害剤を用いた炎症性骨破壊モデルの治療効果

4. まとめ

本研究によって、エピジェネティクス制御因子Rimrが破骨細胞分化において促進的な役割を担うことを見出した。さらに、骨粗鬆症や炎症性骨破壊モデルを用いた治療実験の結果から、Rimr阻害剤は骨吸収抑制剤の有用な候補化合物として有効である成果が得られた。

5. 参考文献

1. Asagiri M, *Science* 319, 624-27, 2008
2. Nishikawa K, *PNAS* 107, 3117-22, 2010
3. Maeda K, *Nat Med* 19, 405-12, 2012
4. Dacquin R, *Dev Dyn* 224, 245-51, 2002
5. Nishikawa K, *JCI* 120, 3455-65, 2010
6. Shinohara M, *Cell* 132, 794-806, 2008