

# 破骨細胞のエピジェネティクスの研究と創薬への応用

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 免疫細胞生物学  
西川 恵三

## 1. 目的

骨粗鬆症に伴う運動器障害は、高齢者の寝たきりの原因に挙げられ、高齢化社会を背景に重大な社会問題となる。この病態発症には、骨吸収活性をもつ破骨細胞の異常が深く関係していることから、破骨細胞に作用する阻害剤は有効な治療薬候補となる。ビスホスホネート製剤は、破骨細胞内の低分子量Gタンパク質に作用して細胞死を誘導する効果をもち、上市された破骨細胞阻害薬の中で最も汎用されている。しかしながら、近年、様々な副作用(顎骨壊死など)が指摘されていることから、異なる細胞内分子を標的とした新薬の開発は焦眉の急である。申請者は、破骨細胞で働く骨吸収関連酵素に対して阻害作用をもつ化合物をこれまでに探索し、破骨細胞の骨吸収機能が有効な創薬標的となることを明らかにした(*Science* 2008)。さらに、近年においては、破骨細胞のDNAメチル化制御にかかわる酵素Dnmt3aの研究を通じて、エピジェネティック制御機構が骨粗鬆症の有効な治療標的となることを実証した(*Nature Med.* 2015)。従来、核内受容体を除けば、核内分子を標的とした創薬研究はほとんど例を見ない。しかしながら、近年、エピジェネティック制御の阻害剤が抗癌剤として有用であることが示されており、核内のエピジェネティック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。そこで、本研究では、新たな破骨細胞のエピジェネティック制御を明らかにし、その成果を創薬研究に向けた基盤研究として発展させることを目的とする。近年、申請者は、破骨細胞のゲノムDNAがメチル化されるだけでなく、5-ヒドロキシメチル化修飾を受けることを見出した(未発表)。そこで、本研究では新規のヒドロキシメチル化酵素HMに注目し、破骨細胞における機能解明に取り組む。本研究によって、『破骨細胞のエピゲノム創薬』に資する分子基盤の確立を推進し、従来研究とは全く異なる創薬アプローチの実現を目標とする。

## 2. 方法

(1)骨代謝制御におけるHMの重要性の解明 破骨細胞特異的にHM遺伝子を欠損したマウス(HMcKO マウス)を作出し、骨代謝におけるHMの役割を生体レベルで明らかにする。即ち、HM遺伝子座にloxP配列を挿入したHM<sup>flox/flox</sup>マウスと破骨前駆細胞特異的にCreを高発現する系統Rank-Creマウスを交配することでHMcKOマウスを作出する。そして、HMcKOマウスの長管骨を $\mu$ CT(microfocus X-ray computed tomography)撮影した後、RATOC社の画像解析ソフトによってCT画像を3次元構築することで、骨構造に関するパラメータを算出する。同時に、この3次元CTデータから骨塩量の分布解析も実施することで、骨密度の空間的変動の是非を定量的に評価する。一方、非脱灰硬組織標本を作製し、骨形態計測を実施することで、破骨細胞および骨芽細胞特有のパラメータを測定する。これによって、HMcKOマウスで生じる破骨細胞あるいは骨芽細胞の異常の是非を細胞レベルで解析する。

(2)破骨細胞制御にかかわるHMの作用機序の解析 野生型とHMcKOマウスから破骨細胞の前駆細胞を単離し、破骨細胞の分化誘導実験を実施する。また、当該細胞を用いてトランスクリプトーム解析や、高速シーケンス解析によるゲノムワイドな5-ヒドロキシメチル化DNA領域の解析(5-hmc-seq解析)を実施することで、HMの標的遺伝子を同定する。5-hmc-seq解析は、化学的補足法を用いて実施する。具体的には、100-500bp程度に断片化したゲノムDNAとヒドロキシメチルシトシングルコシルトランスフェラーゼを反応させることで、DNA中の5-ヒドロキシメチルシトシン特異的にグルコース基のタグを付加させ、5-ヒドロキシメチルシトシンをグルコシル-5-ヒドロキシメチルシトシンへ変換する。続いて、クリックケミストリーによって糖鎖部分にビオチン付加し、アビジンビーズによって当該DNA断片を濃縮する。その後、単離したDNA断片を高速シーケンサによって解析を行う。

## 3. 結果 研究成果

(1)骨代謝制御におけるHMの重要性の解明 HMcKOマウスは、メンデル則に従って出生し、生理的条件下では体重や体長などにおいて野生型マウスと比較して有意な表現型の差を示さなかった。10週齢の野生型ならびにHMcKO雄マウスの大腿骨の $\mu$ CTによる3次元断層像を作製し、骨構造に関するパラメータ(海綿骨量、骨梁幅、骨梁数及び骨梁間隔)を算出した。その結果、海綿骨量、骨梁幅、骨梁数並びに骨梁間隔などの骨構造に関するパラメータに関して、野生型ならびにHMcKOマウスの間に有意な差が観察されなかった(図1)。次に、同検体の脛骨の非脱灰薄切標本を作製し、骨形態計測を実施することで、骨吸収に関するパラメータ(骨吸収面、破骨細胞数および破骨細胞面)並びに骨形成に関するパラメータ(骨芽細胞面、骨石灰化面、骨石灰化速度および骨形成速度)を計測した。その結果、骨吸収面、破骨細胞数

並びに破骨細胞面などの骨吸収に関するパラメータおよび骨芽細胞面、骨石灰化面、骨石灰化速度並びに骨形成速度などの骨形成に関するパラメータに関して、野生型ならびにHMcK0マウス間に有意な差が観察されなかった(図2)。

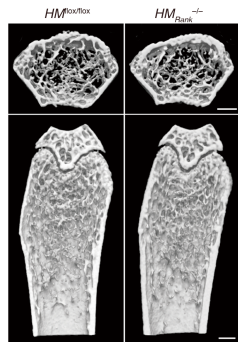


図1 破骨細胞特異的なHM遺伝子欠損マウスの骨表現型

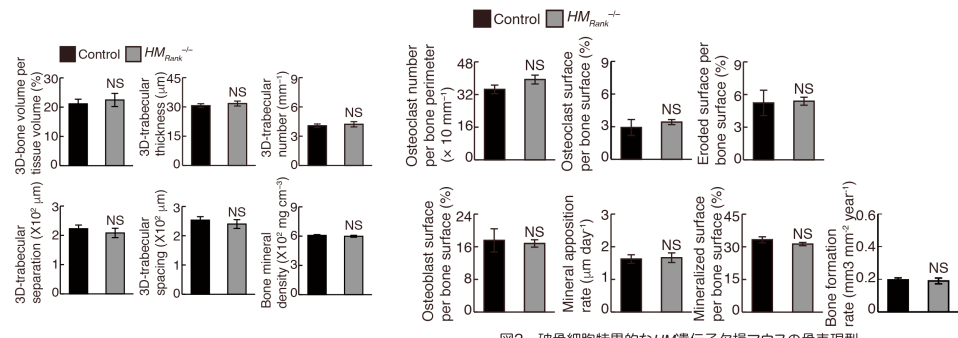


図2 破骨細胞特異的なHM遺伝子欠損マウスの骨表現型

(2)破骨細胞制御にかかわるHMの作用機序の解析 破骨細胞分化に対するHM欠損の影響を検討するために、野生型とHMcK0マウスから破骨細胞の前駆細胞を単離し、破骨細胞の分化誘導実験を試みた。その結果、HMcK0マウスから単離した前駆細胞から破骨細胞への分化は、野生型と同等に誘導されることが観察された(図3)。また、当該細胞を用いて5-hmc-seq解析を実施したところ、破骨細胞特異的に発現する遺伝子(Acp5, Ctsk, Mmp9及びOscar)の領域において5-ヒドロキシメチル化DNAの濃縮が見出されたものの、HM欠損によってこれらの修飾の程度に変化が観察されなかった(図4)。

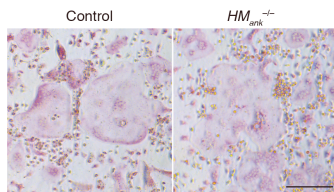


図3 破骨細胞分化に対するHM遺伝子欠損の効果

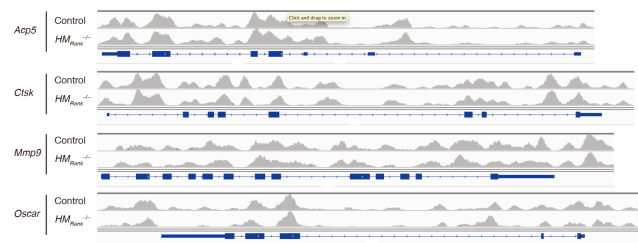


図4 HM遺伝子破骨細胞における5-ヒドロキシシトシンの分布

#### 4. 考察 まとめ

破骨細胞特異的なHM欠損マウスの骨代謝には異常が観察されなかったことから、一見、HMは破骨細胞において重要でないことが示唆される。しかしながら、哺乳類では、HMと同等の機能を有するHMファミリータンパク遺伝子HM1およびHM2が存在する。実際に、破骨細胞においてこれらの遺伝子が発現することから、HM遺伝子の機能が代償されている可能性が考えられる。現在、HMファミリータンパク遺伝子を同時に複数欠損させたノックアウトマウスの作出に着手しており、今後、破骨細胞におけるHM遺伝子の役割のさらなる解明を計画している。

#### 5. 発表論文、参考文献

##### 原著論文

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.

##### 参考文献

1. 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) 2016 259, 389-396, 2016.
2. 阪口友香子, 西川恵三 注目の海外文献 *Clinical Calcium* 26, 100-101, 2016.
3. Nishikawa K Elucidation of the role of metabolic reprogramming in osteoclast differentiation *Clinical Calcium* 26, 713-719, 2016.
4. 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.
5. 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.
6. 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.