

長寿医療研究開発費 平成23年度 総括研究報告

骨粗鬆症治療薬開発のためのポリコーム機能解析 (23-3)

主任研究者 福井 由宇子 国立長寿医療研究センター 老化制御研究部 (室長)

研究要旨

骨芽細胞系列による造骨機能にクロマチン上のエピジェネティック因子の関与が、近年、相次いで明らかになっている。疾患におけるクロマチン高次構造の破綻と疾患の過程を理解することは、将来の、薬剤などのコントロールによる治療につながる可能性を有する。本課題では、疾患等の過程におけるクロマチン高次構造変化を詳細に記述し、様々なクロマチンタンパク修飾やその転写制御因子が形成する制御分子機構を解析する。ポリコームタンパクメンバーノックアウトマウスは骨粗鬆症様骨形態等の早期老化症様表現型を呈し、骨吸収に関わる破骨細胞は正常であるが、骨芽細胞系列細胞が減少する。この結果より、ポリコームタンパクの未解明な骨芽細胞系列における抗老化機能が示唆される。本研究課題では成体骨芽細胞系列制御の分子機構を解析する。ポリコームタンパクは、ゲノム上の数千箇所にも及ぶクロマチン領域に集積し標的遺伝子座の転写制御に不可欠である。そのため、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降法(ChIP-Sequence)により、クロマチンを介したポリコームタンパクの骨芽細胞系列制御分子機構を明らかにする。計画初年度の平成23年度は、成体組織における機能解析のため必須であるコンディショナルノックアウトマウス、ChIP-Sequence 解析を行う細胞調整用の骨芽細胞系列マーカー発現マウス、および ChIP-Sequence のための抗体を含めた実験系の整備をおこなった。

主任研究者

福井 由宇子 国立長寿医療研究センター 老化制御研究部 (室長)

分担研究者

諸橋 憲一郎 九州大学大学院医学研究院 分子生命科学系部門 (教授)

A. 研究目的

骨芽細胞系列による造骨機能にクロマチン上のエピジェネティック因子の関与が、近年、相次いで明らかになっている。疾患特有のエピジェネティックな破綻と疾患の過程の理解は、将来の、人為的コントロールによる治療ならびに創薬につながる可能性を有する。ポ

リコームタンパクメンバー*Cbx2*ノックアウトマウスは早期老化症様表現型（骨粗鬆症様骨形態、皮下脂肪の減少、皮膚の角質化、運動性の低下等）を呈して生後数週間で死亡する。この*Cbx2*KO長管骨では骨吸収に関わる破骨細胞は正常であるが、骨芽細胞系列が減少する（主任研究者本年度学会発表）。類似の表現型は同じポリコームタンパクメンバーである*Bmi1*遺伝子ノックアウトマウスにも報告されている（Liu et al., Nature, 2009, Zhang et al., J Bone Miner Res, 2010）。さらに、*Cbx2*パラログ*Cbx7*の過剰発現による培養細胞寿命の延伸も報告されている（Gil et al., Nature Cell Biol., 2004）。*in vitro*細胞老化過程ではポリコームタンパク発現が減少する傾向が知られていることから、ポリコームタンパクの未解明な抗老化機能が示唆される。本研究課題では骨芽細胞系列に注目し、細胞系列分化制御の分子機構を解析する。ポリコームタンパクは、ゲノム上の数千箇所にも及ぶクロマチン領域に集積し標的遺伝子座の転写制御に不可欠である。そのため、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降法(ChIP-Sequence)により、クロマチンを介したポリコームタンパクの骨芽細胞系列制御分子機構を明らかにする。

骨粗鬆症治療薬開発の分子標的であるエストロゲンあるいは治療薬ビスフォスフォネートは、骨吸収過程に関わる分子である。これらの分子関連の治療薬は骨吸収の抑制により骨粗鬆症の進行遅延効果がある。一方、骨形成促進薬として使用される副甲状腺ホルモン関連分子は、薬剤投薬濃度およびタイミングのコントロールが必要である。骨粗鬆症の罹患が判明する骨折時に、既に低下した骨密度を増やすためには、造骨機能を有する骨芽細胞系列に焦点をあてた新規治療薬研究の推進が急務である。本研究課題では、骨芽細胞系列における新規機能因子としてのポリコームタンパクの機能を解明し、当該因子を新たなターゲットとする創薬研究の基盤整備を推進する。

B. 研究方法

本研究課題では成体骨組織におけるポリコームタンパクの機能を明らかにする。計画初年度の平成23年度は、成体組織における機能解析のため必須であるコンディショナルノックアウト(CKO)マウス、ChIP-Sequence解析を行う細胞調整用の骨芽細胞系列マーカー発現マウス、およびChIP-Sequenceのための抗体を含めた実験系の整備をおこなった。

(倫理面への配慮)

『遺伝子組換え生物等の仕様等の規制による生物の多様性の確保に関する法律』

『研究開発等に係る第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令（二種省令）』および国立長寿医療研究センターの定める規定により設置されている遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経た後、指定された区域内で行う。動物実験に当たっては、『動物の保護および管理に関する法律』『研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針』および、国立長寿医療研究センターの定める規定により設置されている実験動物倫理委員会の審査を経て行った。ヒト由来の研究材料は用いない。

C. 研究結果

・ *Cbx2* flox/frt マウス IMSR より導入要件の整備 (主任研究者担当)

IMSR に保有されている CKO 用 *Cbx2* flox/frt ES 細胞は、平成 23 年 5 月に MTA 等導入手続きを完了した。US DAVIS における、細胞の融解、培養、相同組換え端(3')部分での Long PCR、Loss of allele 解析ゲノム構造およびカリオタイプ解析の結果、2 系統の ES 細胞ラインが予定通りの相同組み換え体であることが確認した(平成 23 年 12 月)。平成 24 年 2 月よりキメラマウス作製のためのマイクロインジェクションに着手した。一方、当該マウスの導入のための微生物モニタリングを行い、国立長寿医療研究センター物実験施設棟 SPF モニタリング項目全ての陰性が確認された。そのため、相同組み換え遺伝子の germ line transmission を確認次第、国立長寿医療研究センター動物実験施設棟に導入可能である。

・ 骨芽細胞系列における *Cbx2* CKO マウス作製のための FLP 全身発現マウス導入 (主任研究者担当)

flox/frt ライン作製の進捗状況と新動物実験施設への移動を考慮して Jackson Laboratory (USA) より全身 FLP 発現マウスの導入手続きを開始した。

・ 骨芽細胞系列におけるポリコームタンパク発現細胞の同定と細胞内局在 (主任研究者担当)

マウス骨髄由来間葉系細胞 *in vitro* 培養系において、骨芽細胞マーカー ALP 発現細胞において CBX2、CBX7、Bmi-1 の核局在を明らかにした。次年度に骨組織からの骨芽細胞分離(FACS)に使用する *Osx*-CRE-GFP および *Col2.3*-GFP マウスは平成 23 年度内に国立長寿医療研究センター動物実験施設棟に導入した。検疫期間を経て飼育室に於いて交配を行い *Col2.3*-GFP マウスより単離した骨髄由来間葉系細胞 *in vitro* 培養系において GFP の発現を確認した。同様に *Osx*-CRE-GFP マウスの交配を開始した。間葉系前駆細胞特異的に発現すると報告の有る Nestin は、マウス骨髄由来間葉系細胞 *in vitro* 培養系において必ずしもマウス骨髄由来間葉系前駆細胞のみに発現するものでないことから、FACS への単独の使用では当初の目的を達しない可能性がある。そのため、次年度以降細胞表面抗原を用いたマウス骨髄由来間葉系前駆細胞の分離法を検討する。

・ ChIP-Sequence 解析に用いる技術基盤の整備 (分担研究者担当)

ChIP-Sequence 解析に使用する特異的ヒストン修飾認識抗体 (抗 H3K27me3, H3K4me1, H3K4me3, H3K27Ac 等)、ポリコームタンパク認識抗体 (抗 CBX2, CBX7, EZH, BMI、等)、を購入あるいは共同研究により提供を受けた。これまでに、Poised エンハンサー (細胞分化後のエンハンサー候補) のクロマチン特異的ヒストン修飾である H3K4me1、および転写活性化状態のクロマチン特異的ヒストン修飾である H3K27Ac 認識抗体は、ChIP-Sequence 解析を行った。この成果の一部は今年度日本分子生物学会年會にて報告した。

D. 考察と結論

・ *Cbx2* CKO 作成用マウス(*Cbx2* flox/frt)マウスの新規作成は、キメラマウス作成段階に到達した。International Mouse Strain Resource (IMSR)において微生物モニタリングを行ったところ、*Cbx2* flox/frt を作成している現飼育室は、国立長寿医療研究センター動物実験施設棟導入に必要な項目を満たしていた。相同組み換え遺伝子の germ line transmission が確認でき次第、国立長寿医療研究センター動物実験施設棟に導入可能である。一方、時期組織特異的のロックアウトに利用する組換え酵素の発現のために、誘導型 CRE マウス並びに全身 FLP 発現マウス導入手続きを開始し、一部導入を完了した。次年度以降のマウス交配による成体特異的のロックアウトマウスの作成による、骨組織維持における CBX2 の機能解析を行う準備が着実に進行している。

・ 骨芽細胞系列細胞の ChIP-Sequence 解析を行うための骨芽細胞系列マーカー発現マウスの整備を行った。骨髄由来間葉系前駆細胞調整法については、細胞表面抗原を用いたマウス骨髄由来間葉系前駆細胞の分離法を検討する。

・ 骨芽細胞系列を対象とした ChIP-Sequence 解析のためのエピジェネティック解析技術の基盤整備を行い、他の転写因子並びにクロマチン因子とともにポリコームタンパクのクロマチン上の集積状態を明らかにする技術的基盤が整備した。次年度以降のゲノムワイドなクロマチンタンパク機能の分子基盤の解明をおこなう。

・ ショウジョウバエポリコームタンパク Pc のオーソログである *Cbx7* は、ほ乳類に於いて *Cbx2* との機能分化が予想されてきたが、平成 23 年度末に null 型機能欠失マウスの解析結果が報告された(Foriana et al., J Clin Invest, 2012)。 *Cbx7* KO は体格が大型化していることから、骨組織において *Cbx2* と拮抗する *Cbx7* 機能が推察できる。実験計画記載のとおり、ゲノム構造確認済 *Cbx7* flox/frt ラインの導入手続きは、飼育施設のキャパシティー、*Cbx2* flox/frt ライン導入の進捗状況および新動物飼育施設を考慮して検討する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, Owaki A, Baba T, Shima Y, Kidokoro T, Kanai Y, Schedl A, Wilhelm D, Koopman P, Okuno Y, Morohashi K. *Cbx2*, a polycomb group gene, is required for *Sry* gene expression in mice. *Endocrinology*. 153: 913-924. (2012)

2) Kataoka M, Yamamori S, Suzuki E, Watanabe S, Sato T, Miyaoka H, Azuma S, Ikegami S, Kuwahara R, Suzuki-Migishima R, Nakahara Y, Nihonmatsu I, Inokuchi K, Katoh-Fukui Y, Yokoyama M, Takahashi M.

A single amino acid mutation in SNAP-25 induces anxiety-related behavior in mouse. *PLoS One*. 2011;6(9): 6: e25158. (2011)

3) Shima Y, Miyabayashi K, Baba T, Otake H, Oka S, Zubair M, Morohashi K
Identification of enhancer specific for fetal Leydig cells in Ad4BP/SF-1 gene.

Endocrinology 153, 417-425. (2012)

4) Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi K, Takeuchi T, Iguchi T

WNT family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbesterol exposure in mice

Toxicology 296, 13-19. (2012)

5) Hoivik EA, Bjaneyoy TE, Mai O, Okamoto S, Minokoshi Y, Shima Y, Morohashi K, Boehm U, and Bakke M

DNA methylation of intronic enhancers directs tissue-specific expression of Steroidogenic Factor 1/Adrenal 4 Binding Protein (SF-1/Ad4BP).

Endocrinology 152, 2100-2112. (2011)

2. 学会発表

1) 日本基礎老化学会第34回大会（東京、平成23年6月）

早期老化症様表現型を示すポリコームグループ遺伝子 *Cbx 2* ノックアウトマウス
福井 由字子、今井 剛、他（主任研究者：筆頭責任著者）

2) 第34回日本分子生物学会年会（横浜、平成23年12月）

Identification of Ad4BP/SF-1 target genes by ChIP-Seq in Y-1 adrenocortical cells.

馬場 崇、諸橋 憲一郎、他（分担研究者：責任著者）

3) 第4回性差生物医学研究会（山口、平成23年11月）

RNA-Seq および ChIP-Seq 法による Ad4BP/SF-1 標的遺伝子の同定

馬場 崇、諸橋 憲一郎、他（分担研究者：責任著者）

4) 第 85 回日本内分泌学会（名古屋、平成 23 年 4 月） 教育講演
胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞の異質性について
諸橋 憲一郎

5) 第 85 回日本内分泌学会（名古屋、平成 23 年 4 月）
シンポジウム 核内受容体のエピジェネティクスと内分泌代謝疾患
核内受容体 Ad4BP/SF-1 の副腎皮質における新たな機能
馬場崇、諸橋憲一郎、他（分担研究者：責任著者）

6) 第 6 回日本生殖内分泌学会（東京、平成 23 年 11 月） 招待講演
生殖腺におけるステロイドホルモン産生
諸橋 憲一郎

7) 第 84 回日本内分泌学会 （神戸、平成 23 年 4 月）
シンポジウム 核内受容体と内分泌代謝疾患 update
胎仔型ライディッヒ細胞の生理学的機能の解明
嶋雄一、諸橋憲一郎（分担研究者：責任著者）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし