

長寿医療研究開発費 平成24年度 総括研究報告

骨粗鬆症治療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->流動研究員）

研究要旨

エピジェネティック因子の適確な制御は骨芽細胞系列において不可欠であり、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、骨芽細胞系列クロマチン高次構造を明らかにし、様々なクロマチンタンパクや転写制御因子が形成する制御分子機構を解明する。ポリコーム遺伝子群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する。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とから、ポリコーム遺伝子群タンパクの骨芽細胞系列における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制御の分子機構を解析する。ポリコーム遺伝子群タンパクは、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遺伝子群タンパクの骨芽細胞系列制御分子機構を明らかにする。3年計画2年目の平成24年度は、昨年度に引き続き、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の作製のために、flox/frt マウス作製を進めた。一方、ChIP-Sequence、RNA-Sequenceをはじめとする全ゲノムを対象とした実験解析を開始した。

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->流動研究員）

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

骨芽細胞系列の造骨機能には、クロマチン上のエピジェネティック因子が関わるのが、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。ポリコム遺伝子群メンバー *Cbx2 null* 型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。*Cbx2 null* 型ノックアウトマウス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（主任研究者昨年度学会発表）。類似の表現型は同じポリコム遺伝子群メンバーである *Bmi1 null* 型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、ポリコム遺伝子群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。ポリコム遺伝子群タンパクは、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ム遺伝子群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ム遺伝子群タンパクの機能を解明し、当該因子をターゲットとする新たな創薬研究の基盤整備を推進する。

## B. 研究方法

本研究課題では骨組織におけるポリコム遺伝子群タンパクの機能を明らかにする。計画2年度目の平成24年度は、昨年度に引き続き、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)マウスの作製のための *Cbx2 flox/rt* マウス作製を進める。一方、ChIP-Sequence、RNA-Sequenceをはじめとする全ゲノムを対象とした実験解析を行なう。

（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 マウス作製・導入（主任研究者）

IMSR で作製された *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、予定通りの相同組み換え体であることが確認できた 2 系統の ES 細胞ライン(*Cbx2*\_F12 および *Cbx2*\_G09)を用いて、平成 24 年 2 月、4 月、6 月にキメラマウス作製のためのマイクロインジェクションをおこなった。3 回のマイクロインジェクションの結果、被毛色より判断して 50%以上のキメラ率であるオスキメラマウス数は合計 3 匹 (*Cbx2*\_G09 キメラ率 90%, *Cbx2*\_F12-18 キメラ率 95%, *Cbx2*\_F12-19 キメラ率 95%)であった。研究終了に伴い相同組み換え遺伝子の germ line transmission の確認を中断し、当該キメラマウスを US DAVIS より国立長寿医療研究センター動物実験施設棟に導入した。

### ・ ChIP-sequence 解析およびその他クロマチン解析技術の基盤の整備（分担研究者）

ChIP-sequence 解析系は昨年度確立したところであるが、更にこの技術基盤を基に、新たなクロマチン解析方法として、MNase を用いたクロマチン断片化条件、ならびに FAIRE-sequence によるオープンクロマチン領域の同定の実験系および情報処理法の条件を検討した。一方、微量 (200 ng) total RNA からの mRNA-sequence の実験系を確立している。この系においては、*Cbx2* null 型ノックアウトマウス骨髄より抽出した total RNA を用いて本研究課題主任研究者との共同研究が進行している。これまでアノテーションさえされていなかった新規トランスクリプトの重要な機能が、次々と明らかになってきている。そのため、total RNA からの RNA-sequence の実験系である ribo-depleted RNA を用いた RNA-sequence の実験系および新規トランスクリプト同定のための情報処理法も確立した。

### ・ ChIP-sequence 解析に用いるクロマチン精製条件の検討（主任研究者）

上記解析に用いるクロマチン、RNA 分離法に検討を加えた。マウス骨髄由来の間葉系細胞

あるいはマウス胎児繊維芽細胞(MEF)クロマチンの分断化は、ES細胞あるいは胚組織と異なる独自の条件設定が必要であった。自然科学研究機構・基礎生物学研究所との平成24年度個別共同利用研究によって、抗Cbx2および特異的ヒストン修飾抗体を用いた至適な分断条件を *Ink4a* 遺伝子座に注目して決定した。また、*Cbx2 null* 型ノックアウトマウス骨髄 total RNA の抽出には Bio-Analyzer (Agilent) を用いたクオリティーコントロールを行なった結果、genotype 済の凍結サンプルからの精度良い RNA 抽出が可能となった。

#### D. 考察と結論

・ 成体特異的ノ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段階として、*Cbx2 flox/frt* ES細胞を用いたキメラマウスを作成した。相同組み換え遺伝子の germ line transmission を確認中であったが研究事業を平成24年度10月に中止するため、一部交配前ではあったが、交配を中止して国立長寿医療研究センター動物実験施設棟にマウスを導入した（マウス納品にて完了となるため）。

・ ChIP-Sequence 解析を行うため、骨髄由来間葉系細胞あるいはマウス胎児繊維芽細胞からのクロマチン調整法について実験条件を確立した。

・ ポリコム遺伝子群タンパクのクロマチン上の集積状態と遺伝子発現をゲノム上にマッピングする技術的基盤が整備した。保有する抗 Cbx2 抗体の ChIP 解析への有用性は既に確認されていることから、本研究課題で構築された基盤技術を用いて骨組織に留まらず様々な組織において、Cbx2 タンパクの遺伝子発現制御分子機構解明が可能である。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes.

Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, Tsutsui K, Morohashi KI.

Mol Endocrinol. Nov 2. [Epub ahead of print] (2012)

2) Maml1 deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal leydig cells but permits normal genital and reproductive development.

Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T.

Endocrinology: 153: 6033-6040 (2012)

3) Steroid hormones and the development of reproductive organs.

Morohashi K, Baba T, Tanaka M.

Sex Dev.: 7: 61-79 (2013)

.

2. 学会発表

1) 第 85 回日本内分泌学会 (名古屋、平成 24 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、大竹博之、宮林香奈子、嶋雄一、佐藤哲也、木村宏、大川恭行、須山幹太、諸橋憲一郎

2) 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡、平成 24 年 12 月)

ワークショップ 2W12II 「生命現象をエネルギー代謝から理解する」

馬場 崇、大竹 博之、佐藤 哲也、宮林 香奈子、宍戸 祐里菜、嶋 雄一、木村 宏、大川 恭行、須山 幹太、諸橋 憲一郎

3) Sixth International Symposium on The Biology of Vertebrate Sex Determination.

(HAWAII, April, 2012)

Identification of Ad4BP/SF-1 Target Genes By mRNA-Seq and ChIP-Seq in Y-1 Adrenocortical Cells

Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Kanako Miyabayashi, Yuichi Shima, Tetsuya Sato, Yasuyuki Ohkawa, Mikita Suyama, Ken-ichirou Morohashi.

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