

<研究課題> 要介護リスクを高める骨粗鬆症に対するエピジェネティック代謝遺伝子 ASXL を標的とした診断・治療・予防法の開発

代表研究者 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教 井澤 俊

【まとめ】

骨粗鬆症検体を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) を用いて造血幹細胞と相関があると見出されてきた核に存在するタンパク ASXL (Additional sex comb like) は、最近になってマクロファージをはじめとする一部の免疫細胞にも高発現していることが明らかになってきた。本研究課題では RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) シグナルと Asxl1 シグナルクロストークによる破骨細胞分化機構を明らかにした。骨量を回復し骨質を改善することで骨粗鬆症患者の QOL を回復することが期待される。

1. 研究の目的

超高齢化社会に突入した我が国において認知症のみならず骨粗鬆症の診断薬および治療薬の開発は急務である。近年、サイトカイン RANKL の発見によって、同じ血球系由来の破骨細胞および強力な抗原提示細胞である樹状細胞の分化・活性化機構の解明が急速に進歩してきており、免疫系細胞が骨代謝疾患の病態における骨・軟骨破壊機構に密接に関与していること (オステオイムノロジー分野) を報告してきた (1-8)。また米国ワシントン大学 Steven L. Teitelbaum 教授との共同研究によりヒストンのメチル化を調節する核に存在するタンパク Asxl2 が糖代謝、脂質代謝、及び骨代謝を調節していることを明らかにした (9)。近年の癌治療薬の開発研究において、エピジェネティック制御を創薬標的として利用する試みが注目されている。GWAS やクラスター解析を用いて造血幹細胞と相関があると見出されてきた核に存在するタンパク Asxl1 は、最近になってマクロファージをはじめとする一部の免疫細胞にも高発現し、ミエロイド系細胞の分化に重要な役割を果たすことが明らかになってきた (10)。本研究では破骨細胞活性化因子として知られている RANKL シグナルとエピゲノム制御遺伝子 Asxl1 とのシグナルクロストーク解明によるマクロファージから破骨細胞への

分化や活性化・維持機構を明らかにし、新たな骨粗鬆症に対する創薬標的として利用可能かどうかを検討する。さらに、骨折、骨粗鬆症や関節リウマチなどの病的状況下での、近年同定されたヘルパーT 細胞中の Th17 細胞サブセット、M1/M2 マクロファージ、カップリング因子にも焦点をあて、ASXL の影響解明、多臓器連関および新たな骨代謝疾患の診断や治療法の開発を目的とする。これらのことが明らかになれば、臨床へのアウトカムとして破骨細胞を標的とした骨吸収抑制剤の開発において、Asxl1 を中心としたエピジェネティック創薬は有効なアプローチのひとつになることが考えられ、新たな分子標的治療の創出につながる事が予想される。

2. 研究方法と経過

2-1 マウス破骨細胞誘導：マウス大腿骨骨髓腔から骨髓細胞を採取し、洗浄後、10%FBS 含有 α -MEM にて 5×10^5 /mL の細胞濃度となるよう調節し、100 mm dish に播種した。M-CSF 添加培地にて3日間培養後、RANKL、M-CSF を添加した培地にてさらに6日間培養し、成熟破骨細胞へと分化誘導した。また、破骨細胞誘導と同様に、マウス骨髓細胞を採取し、M-CSF 添加培地にて3日間培養後、さらにM-CSF、RANKL サイトカイン添加培地にて3-4日間培養し分化誘導したものを破骨前駆細胞として研究に用いた。

2-2 ウェスタンブロット法：Lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% sodium dextran sulfate, 0.1% SDS, 10 mg/ml aprotin, 50 mg/ml leupeptin, 1mM phenylmethanesulfony fluoride) で細胞を溶解した後、微量高速遠心機にて遠心分離し、得られた上清を試料とした。引き続き BCA Protein Assay Reagent (Thermo, Rockford, MA, USA) を用いてタンパク質の濃度を測定した後、各タンパク質 50 μ g 等量をドデシル酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (以下 SDS-PAGE と略す) にて展開し、ポリ

ビニリデンジフルオライド膜（以下 PVDF 膜と略す）（Millipore, Bedford, MA, USA）に転写後、10% Tween-20 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)を含むトリス緩衝液（以下 TBS-T と略す）中に溶解した 5%スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った。次に、1 次抗体として各々 1,000 倍希釈した抗 Asxl1 抗体、抗 NFATc1 抗体、抗 Integrin β_3 抗体、抗 c-Src 抗体、抗 Cathepsin K 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体、抗リン酸化 p38 抗体、抗リン酸化 p65 抗体、抗リン酸化 I κ B α 抗体を用い 4°C で一晩反応させた。さらに、PVDF 膜を洗浄後、2 次抗体として 1,000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling) または 10,000 希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Millipore) を用いて室温で 1 時間反応させ、PVDF 膜を TBS-T で洗浄後、LumiGLO (Cell Signaling) を用いて化学発色法にてバンドの検出を行った。

2-3 統計学的解析：統計解析は Student *t* test、one-way ANOVA test を用いた。

3. 研究の成果

3-1 これまでの申請者らの予備検討でマクロファージを RANKL 刺激後に Asxl1 の発現が急激に上昇するというデータを得ており、破骨細胞への分化・活性化の過程で Asxl1 が極めて重要な役割を果たしていることが示唆されることより RANKL シグナルと Asxl1 との関係の詳細に解析する。一方で、Asxl1 の発現がどのように調節されているのか、またその調節に関与する因子の本体についてもよく判っていない。さらに、Asxl1 の直接のターゲットである BaP1、Ezh2、あるいは核内ホルモンレセプターとの結合と破骨細胞分化に関する研究も実施した。その結果、Asxl1 をノックダウンしたマクロファージでは RANKL 刺激により破骨細胞形成能の著しい亢進がみられ、また細胞内シグナル伝達においてリン酸化 Akt、MAP キナーゼの一つであるリン酸化 p38、NF- κ B のサブユニットであるリン酸化 p65、リン酸化 I κ B α の亢進を認めた。一方で BaP1 をノックダウンしたマクロファージでは破骨細胞形成の著しい減少がみられ、NFATc1、Integrin β_3 、c-Src、Cathepsin K などの破骨細胞分化マーカー及び RANKL によるリン酸化 Akt、リン酸化 I κ B α 、リン酸化 JNK の発現が著しく減弱していることが明らかとなった。破骨細胞形成には 2 つのサイトカイン RANKL、M-CSF が必須であることが知られているが Asxl1、BaP1 をノックダウンしたマ

クロファージではコントロールと比較して M-CSF 刺激においては細胞内シグナル伝達に差がみられなかった。これらの結果より Asxl1 はブレーキ役、BaP1 はアクセルとして分子複合体を形成しミエロイド系マクロファージから破骨細胞の分化に重要な役割を果たすことが示唆された。

3-2 破骨細胞は単球・マクロファージ系細胞から融合・多核化されて形成される。RANKL 刺激によって誘導されるヒストン脱メチル化酵素である Jmjd3 により、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 プロモーター上のヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 K27me3 が脱メチル化され、遺伝子発現が誘導されることが知られている。H3K27 のトリメチル化 (H3K27me3) は、ES 細胞などにおいて、分化誘導にかかわる遺伝子の発現抑制にかかわるヒストン修飾とされており、トリメチル化が外れることによって遺伝子発現が誘導される。ChIP シークエンスを用いた検討から、RANKL 刺激によって NFATc1 遺伝子の転写開始点付近における H3K27me3 の発現が低下していることが明らかになった。そこで破骨細胞前駆細胞 RAW264.7 細胞を用いた予備的検討を行ったところ、Asxl1 は RANKL 刺激によって誘導されるが、Asxl1 のノックダウンによって H3K27me3 の脱メチル化が減少し、RANKL による破骨細胞分化が誘導されることが判明した。さらに、Asxl1 ノックダウンによる Jmjd3 の約 40 倍の発現上昇を認めた。

3-3 また、米国ワシントン大学 Steven L. Teitelbaum 教授との予備検討により破骨細胞前駆細胞特異的 (Lysozyme M-Cre) に Asxl1 を欠失させた 12 週齢マウスでは大腿骨遠位部海綿骨の著しい減少が観察され、骨粗鬆症を呈した。さらに研究代表者らは、Asxl2 欠損マウスの骨髄より誘導した破骨細胞がほとんど誘導されないのに対して (9)、Asxl1 欠損マウスでは破骨細胞がコントロールマウスと比較して約 10 倍亢進していることがみられ、この分化誘導に複数の転写因子が相互に関与していることを観察しており、さらに野生型マウスの骨折部位に集積したマクロファージの局在と Asxl1 との共局在を認めた。これらの研究とシグナル伝達の解析の結果より、核タンパク Asxl1 によるエピジェネティックな骨代謝調節メカニズムが解明されることが期待される。加えて血管新生や、マクロファージ、破骨細胞、骨芽細胞が仮骨の骨化・吸収といった骨創傷部のリモデリング・修復に複雑に関与する骨折の治癒過程や顎関節を含む全身の RA 病態にお

ける骨・軟骨破壊機構といった病的状況下における *Asxl1* の役割を詳細に検討することで、破骨細胞あるいは活性化リンパ球を中心とした単独でなされてきた従来の多くの研究とは違い、骨代謝と免疫系をリンクする骨免疫学全体の構図を考える上で極めて重要な研究といえる。

4. 今後の課題

これらエピジェネティック研究による結果は *Asxl1* による NFATc1 遺伝子プロモーター上のヒストン脱メチル化というエピジェネティックな修飾が、破骨細胞分化に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。そこで *Asxl1* ノックアウトマウス由来破骨細胞への *Jmjd3* のノックダウンによる NFATc1 転写活性をルシフェラーゼアッセイ、ChIP アッセイ、DNA 転写結合アッセイにより解析するとともに NFATc1 の遺伝子過剰発現を行い破骨細胞形成能も併せて多角的に評価する。

5. 研究成果の公表方法

今後しかるべきデータが出た時点で学術論文としてまとめ、論文投稿を行う。投稿先として *Journal of Bone and Mineral Research*、*Bone* などを検討している。

参考文献

1) Izawa T, Ishimaru N, Moriyama K, Kohashi M, Arakaki R, Hayashi Y. (2007) Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. *Blood* 110, 242-50.
2) Izawa T, Kondo T, Kurosawa M, Oura R, Matsumoto K, Tanaka E, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. (2012) Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice. *PLoS One* 7, e48798.
3) Izawa T, Mori H, Shinohara T, Mino-Oka A, Hutami IR, Iwasa A, Tanaka E. (2016) Rebamipide attenuates mandibular condylar degeneration in a murine model of TMJ-OA by mediating a chondroprotective effect and by downregulating

RANKL-mediated osteoclastogenesis. *PLoS One* 11, e0154107.

4) Mori H, Izawa T, Tanaka E. (2015) Smad3 deficiency leads to mandibular condyle degradation via the sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling axis. *Am J Pathol* 185, 2742-56.

5) Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y. (2004) Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinology* 145, 2384-91.

6) Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. (2016) The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis. *J Immunol* 197, 4639-50.

7) Izawa T, Zou W, Chappel JC, Ashley JW, Feng X, Teitelbaum SL. (2012) c-Src links a RANK/avb3 integrin complex to the osteoclast cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 32:2943-53.

8) Hutami IR, Tanaka E, Izawa T. (2018) Crosstalk between Fas and S1P₁ signaling via NF-κB in osteoclasts controls bone destruction in the TMJ due to rheumatoid arthritis. *Jpn Dent Sci Rev* in press.

9) Izawa T, Rohatgi N, Fukunaga T, Wang QT, Silva MJ, Gardner MJ, McDaniel ML, Abumrad NA, Semenkovich CF, Teitelbaum SL, Zou W. (2015) ASXL2 regulates glucose, lipid, and skeletal homeostasis. *Cell Rep* 11:1625-37.

10) Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C, Hess JL, Humphries RK, Brock HW. (2010) Loss-of-function additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood* 115, 38-46.

以上