

# 破骨細胞における代謝エピジェネティック制御遺伝子の分子機能解明と骨粗鬆症治療戦略

所属：徳島大学大学院医歯薬学研究部 口腔顎顔面矯正学分野

助成対象者：井澤 俊

共同研究者：

## 概要

骨粗鬆症検体を用いたゲノムワイド関連解析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 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。本研究では破骨細胞活性化因子として知られている RANKL (Receptor Activator of NF-κB Ligand) シグナルと代謝エピジェネティック制御遺伝子 ASXL1 のシグナルクロストークによる破骨細胞分化や活性化・維持機構を明らかにした。骨粗鬆症により骨折し、寝たきりになることでさらに骨量が減少し、骨折治癒までもが遅延してしまう負のスパイラルに陥ってしまうことが問題となっている、骨量を回復し骨質を改善することで患者の QOL を回復することが期待される。

## abstract

The additional sex comb like (ASXL) pathway plays an important role in RANKL-mediated osteoclastogenesis. However, the mechanism underlying the regulation of ASXL expression in osteoclasts and the signaling pathway through which ASXL controls osteoclastogenesis remain unclear. In response to RANKL, bone marrow macrophages transfected with ASXL1 shRNA exhibited upregulated phosphorylation of Akt and MAPK as well as NF- $\kappa$ B, whereas their response to M-CSF remained unchanged. Taken together, the present results suggest that the RANKL/ASXL1 signaling axis plays a critical role in osteoclastogenesis, thereby identifying the potential of

ASXL1 in treating pathological disorders of the bone such as osteoporosis and rheumatoid arthritis.

## 研究内容

「背景」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 (Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) 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や関節リウマチ (RA: Rheumatoid Arthritis) や変形性関節症 (OA: Osteo Arthritis) 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 (オステオ免疫学分野) を報告してきた (1-5)。さらに最近、内分泌攪乱物質ダイオキシン受容体として知られる核内レセプター AhR シグナルと RANKL シグナルクロストークの解明による破骨細胞分化機構を明らかにしている (6)。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チロシンキナーゼ c-Src が破骨細胞に必須のレセプター RANK とインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  との複合体を形成し破骨細胞による細胞骨格を制御していることを明らかにし (7)、さらに最近、ヒストンのメチル化を調節する核に存在するタンパク Asx12 (Additional sex comb like 2) 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 (8)。Asx11 は Asx12 と同じヒストンのメチル化を調節する核に存在するタンパクでありポリコム群遺伝子の一つである。骨粗鬆症検体を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) やマウス細胞のクラスター解析を用いたこれまでの研究では Asx11 がミエロイド系マクロファージの分化に重要な役割を果たすことが報告されている (9)。そこで今回、マクロファージや破骨細胞における Asx11 と RANK/RANKL シグナルとのシグナルクロストーク機構を解析することを目的とするとともに RA や骨折モデルを用いた病的状況下に集積するマクロファージ・破骨細胞の骨芽細胞、骨細胞とのカップリング機構や臓器連関、Asx11 をターゲットとする免疫療法開発の可能性について解明することを着想するに至った。破骨細胞前駆細胞でもあるマクロファージは炎症の発症から収束に至るまで様々な様式で炎症に関わっている。病態初期に関与するマクロファージは、M1 マクロファージと呼ばれ、一方で炎症後期に炎症修復に関与するマクロファージは M2 マクロファージと呼ばれる。そこで RA や骨粗鬆症発症を骨組織での慢性炎症という観点からマクロファージ・破骨細胞を中心に解析し、Asx11 を介したマクロファージの浸潤・機能促進、増殖などを明らかにすることに

よる RA や骨粗鬆症発症の機序解明を目的とする。

「目的」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 Asx11 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 Asx11 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、Asx11 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、Asx11 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ことを予想される。

「結果」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 Asx11 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 Asx11 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 Asx11 との関係を詳細に解析する。一方、Asx11 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、Asx11 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、Asx11 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- $\kappa$ B のサブユニットであるリン酸化 p65、リン酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  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  $\beta$  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 $\kappa$ B $\alpha$ 、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 Asx11、BaP1 の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。

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 *Asx11* 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。さらに申請者らは、*Asx11* 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 (8)、*Asx11* 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 *Asx11* 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 *Asx11* 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 *Asx11* 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。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、*Asx11* は RANKL 刺激によって誘導されるが、*Asx11* 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、*Asx11* ノックダウンによる *Jmjd3* の約 40 倍の発現上昇を認めた。「今後」これらの結果は *Asx11* 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 *Asx11* 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。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。

#### 引用文献

- 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) 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.

9)Farber CR, Bennett BJ, Orozco L, Zou W, Lira A, Kostem E, Kang HM, Furlotte N, Berberyan A, Ghazalpour A, Suwanwela J, Drake TA, Eskin E, Wang QT, Teitelbaum SL, Lusk AJ. (2011) Mouse genome-wide association and systems genetics identify *Asxl2* as a regulator of bone mineral density and osteoclastogenesis. *PLoS Genet* 7:e1002038.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

Hutami IR, Tanaka E, Izawa T. Crosstalk between Fas and S1P<sub>1</sub> signaling via NF- $\kappa$ B in osteoclasts controls bone destruction in the TMJ due to rheumatoid arthritis. *Japanese Dental Science Review* 2018 in press.

[口頭発表]

なし

[ポスター発表]

Izawa T, Arakaki R, Tanaka E, Ishimaru N. Signal crosstalk between cytokine RANKL and AhR signaling in osteoclasts controls bone homeostasis. *IMMUNOLOGY 2018*, 米国免疫学会、Austin, USA 2018年5月

井澤 俊、田中 栄二. AhR は RANK/c-Fos シグナル伝達経路を介して破骨細胞の分化を制御する. 第4回日本骨免疫学会 2018年6月

井澤 俊、田中 栄二. 樹状細胞による Fas 非依存的 T細胞のアポトーシスが MRL/*lpr* マウスにおける自己免疫性関節炎を制御する. 第36回日本骨代謝学会学術集会 2018年7月

Hutami IR, Mori H, Khurel-Ochir T, Mino-Oka A, Iwasa A, Tanaka E, Izawa T. HIF-1 $\alpha$  regulates the palatal wound healing through M1/M2 macrophage reprogramming. 96<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, LONDON, ENGLAND 2018年7月

井澤 俊. AhR は RANK/c-Fos シグナル伝達経路を介して破骨細胞の分化を制御する. 第60回歯科基礎医学会学術大会 2018年9月

Hutami IR, Tanaka E, Izawa T. Fas/S1P1 crosstalk via NF- $\kappa$ B activation in osteoclasts controls subchondral bone remodeling in murine TMJ arthritis. American Society for Bone and Mineral Research 2018 Annual Meeting, Montreal, Canada 2018年9月

[その他] なし