

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05106

研究課題名(和文) 転写因子Runx2を中心とする階層的骨形成転写ネットワークの解明と応用

研究課題名(英文) Understanding of Runx2-mediated hierarchical gene regulatory network in bone formation and application of the network for bone regeneration

研究代表者

北條 宏徳 (Hojo, Hironori)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：80788422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Runx2は骨芽細胞の運命決定と軟骨細胞の肥大化に必須である。本研究では、新生仔マウスのin vivo骨芽細胞・軟骨細胞ゲノムにおいて、Runx2-DNA結合と細胞種特異的なエピジェネティックランドスケープとの統合解析を行った。これにより、骨芽細胞・軟骨細胞特異的なRunx2標的エンハンサー候補を同定した。さらに、その一部について機能検証を行い、骨形成におけるRunx2を介した転写制御機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子Runx2は骨を形成する骨芽細胞の分化決定・成熟化を促進する作用と、軟骨組織に存在する軟骨細胞の分化・肥大化を進める作用を有しており、これらのメカニズム解明は、骨格組織の再生医療法の確立や疾患の分子病態の理解に必須である。本研究では、Runx2の骨芽細胞と軟骨細胞に対する作用メカニズムの一端を、ゲノムワイドな転写制御機構の観点から明らかにし、骨格再生に向けた基礎的知見を取得した。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is an essential transcription factor for both osteoblast specification and chondrocyte hypertrophy. In this study, we performed integrative analysis of Runx2-DNA binding profile and cell-type distinct epigenetic landscape profile in mouse neonatal osteoblasts and chondrocytes. We identified cell-type specific putative enhancers targeted by Runx2 in osteoblasts and chondrocytes, and confirmed a biological function of these. Through this study, we identified a Runx2-mediated gene regulatory program in skeletal development.

研究分野：骨発生・再生学

キーワード：転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、生活の質(QOL)の高い健康寿命を延ばすことは喫緊の課題である。失われた組織に対する再建法の確立や、疾患に対する分子病態の解明には、転写制御機構の理解が必要である。過去20年間にわたるマウス発生工学とヒト遺伝学の発展により、骨形成に必須な転写因子群が生体レベルで明らかになっている。この中で、Runx2とSp7/Osterixは骨形成に必須であり、(Komori T, et al., *Cell* 1997; Nakashima K, et al., *Cell* 2002) Sox9は軟骨形成に必須である(Akiyama H, et al., *Genes Dev.* 2002)。申請者らは、これらマスター転写因子の中で、Sp7とSox9について、その標的遺伝子と作動様式を、*in vivo* 初代細胞を用いてゲノムワイドに解析し、その研究成果を世界に先駆けて報告してきた(Hojo H, et al., *Dev. Cell* 2016; Ohba S, He X, Hojo H, et al., *Cell Rep.* 2015; He X, Ohba S, Hojo H, et al., *Development* 2016)。

一方、Runx2に関しては、ゲノムワイド解析は*in vitro* 骨芽細胞株を用いたものに限られており、生体レベルでの解析が待たれていた。これまでの研究で、Runx2は骨芽細胞だけでなく、分化・肥大化した軟骨細胞にも強く発現していること、しかしながら、両細胞における機能は異なっていることが示唆されており(Takeda S, et al., *Genes Dev* 2001など)その複雑な転写制御機構の存在が予想されていた。

転写制御機構の理解は、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析により大きく発展してきた。これまでの研究で、転写には少なくとも3つの階層の制御機構が存在していることが明らかになってきた(Perino M & Veenstra GJ. *Dev. Cell* 2016)。1次元的な制御機構：転写因子のDNA配列(モチーフ)特異的結合機構。2次元的な制御機構：クロマチンアクセシビリティをはじめとしたエピゲノム機構。3次元的な制御機構：クロマチンの三次元構造を介したトポロジカルドメイン機構。しかしながら骨格形成におけるこれらの制御機構はほとんど理解されておらず、その解析が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究では、骨格形成におけるRunx2の作用メカニズムを、階層的転写制御機構の観点から多角的に解析することで、骨芽細胞・軟骨細胞における特異的・機能的な転写ネットワークの解明を目指した。これまでの解析でRunx2は骨芽細胞にはたらき骨形成促進作用を発揮する一方、軟骨細胞の分化・肥大化の促進作用を介して、関節軟骨組織において軟骨破壊を引き起こすことが知られていた。そのため、骨・軟骨組織において細胞種特異的にRunx2のはたらきを制御することができれば、目的に応じた副作用の少ない治療戦略の確立に寄与できるのではと考えた。

3. 研究の方法

(1)骨芽細胞・軟骨細胞におけるRunx2ゲノム結合部位の同定

In vivo 骨芽細胞・軟骨細胞におけるRunx2クロマチン免疫沈降-シーケンシング(ChIP-seq)解析を行った。*In vivo* 骨芽細胞・軟骨細胞におけるRunx2 ChIP-seq解析において、特異的抗体を用いた免疫沈降の効率を最大限高めるため、Runx2遺伝子座にタグ(Biotinと3xFlagの融合ペプチドをコードする遺伝子)をノックインしたマウス(Runx2-BioFLAG)を用いた。

(2)骨発生における*in vivo* エピゲノム・トランスクリプトーム解析

各種レポーターマウスを用いて、骨芽細胞と軟骨細胞におけるエピゲノム・トランスクリプトームプロファイルを取得した。具体的には、骨芽細胞: Osterix/Sp7-GFP(Rodda SJ et al., *Development* 2006); 軟骨細胞: Col2-ECFP(Chokalingam K et al., *Tissue Eng Part A* 2009); 肥大軟骨細胞: Col10-mcherry(Maye P et al., *Genesis* 2011)を用いた。

(3)細胞種特異的・機能的Runx2標的エンハンサーの探索

同定した、骨芽細胞・軟骨細胞におけるRunx2ゲノム結合部位(1次元情報)、エピゲノム・遺伝子発現プロファイル(2次元情報)に加えて、クロマチン三次元構造TAD(3次元情報)を統合して、機能的Runx2標的エンハンサーを探索した。TADは細胞種間で保存されていると考えられているため(Dixon JR et al., *Nature* 2012)、公共データベース上で利用可能な複数の細胞におけるTADマップ(<http://promoter.bx.psu.edu/hi-c/view.php>)を活用した。

4. 研究成果

(1)骨芽細胞・軟骨細胞におけるRunx2ゲノム結合部位の同定

Runx2-BioFLAGマウス新生仔頭蓋骨および肋軟骨からそれぞれ骨芽細胞・軟骨細胞を単離し、ChIP-seq解析を行った。得られたシーケンシング情報を、東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータSHIROKANEを用いたバイオインフォマティクス解析により、Runx2ゲノム結合領域をピークとして検出した。その結果、骨芽細胞におけるRunx2ピークとして10,241箇所、軟骨細胞におけるRunx2ピークとして15,380箇所を同定した。骨芽細胞・軟骨細胞いずれにおいても、ピーク全体のおよそ30%が遺伝子の転写開始点(transcription start site; TSS)近傍500bpに位置しており、それより遠位に位置するピークが70%ほどであった。得られたRunx2ピークの生物学的意義を検証するため、Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool(GREAT, *Nat Biotechnol* 28, 495-501, 2010)を用いたGene ontology解析を行った。その結果、骨芽細胞において、TSS近傍Runx2ピークはProtein foldingなどの細胞の基本機構に関わる遺伝子群と高い関連が認められ

た一方、遠位 Runx2 ピークは骨格形成に関わる遺伝子群と高い関連が認められた。軟骨細胞においても同様で、TSS 近傍 Runx2 ピークは細胞の基本機構、遠位 Runx2 ピークは軟骨形成に関わる遺伝子群とそれぞれ高い関連を示した。次に、Runx2 ピークにおける *de novo* モチーフ解析 (Mol Cell 38(4):576-589, 2010) により、ピーク内配列において統計学的に有意に存在する転写因子結合モチーフを探索したところ、細胞種・TSS からの距離に関わらず Runx のコンセンサスモチーフが最も有意に存在していた。以上より、Runx2 は骨芽細胞・軟骨細胞いずれにおいても、主に遺伝子から遠位のゲノム領域に Runx モチーフを介して作用し、細胞種特異的な遺伝子発現に関わることが示唆された。

(2)骨発生における in vivo エピゲノム・トランスクリプトーム解析

レポーターマウス新生仔頭蓋骨 (Sp7-GFP) および肋軟骨 (Col2-EGFP, Col10-mcherry) から酵素処理により細胞を回収後、蛍光蛋白質を指標に FACS によりレポーター陽性細胞を単離し、ATAC-seq (an assay for transposase-accessible chromatin using sequencing; Buenrostro JD et al., Nat Methods 2013) および RNA-seq を行った。ChIP-seq の場合と同様に SHIROKANE を用いたバイオインフォマティクス解析により、オープンクロマチンプロファイルと遺伝子発現

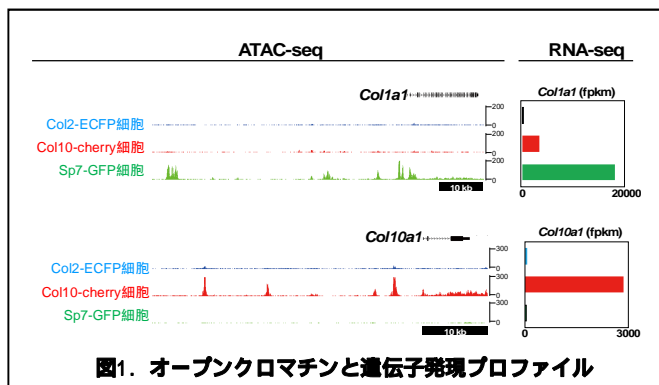


図1. オープンクロマチンと遺伝子発現プロファイル

プロファイルを取得した。まず、得られたデータの妥当性を検証する目的で主成分分析を行った。その結果、いずれのプロファイルにおいても、細胞種間で異なるオープンクロマチン・遺伝子発現プロファイルを示した。次に、ゲノムブラウザを用いて、得られたオープンクロマチン領域をピークとして可視化した。その結果、骨芽細胞分化マーカーの一つ Col1a1 遺伝子近傍では、Sp7-GFP 由来骨芽細胞において複数の ATAC-seq ピークが認められたのに対して、Col2-EGFP, Col10-mcherry 細胞由来軟骨細胞ではほとんどピークは認められなかった (図 1)。このような細胞種特異的な ATAC-seq ピークの分布は、成熟軟骨細胞分化マーカーの一つ Col10a1 遺伝子近傍においても同様で、Col10-mcherry 細胞由来軟骨細胞において複数の ATAC-seq ピークが認められたのに対して、それ以外の細胞種ではほとんど発現が認められなかった。これらのオープンクロマチンシグナチャーと相関して、Col1a1 および Col10a1 の遺伝子発現は、それぞれ骨芽細胞、肥大軟骨細胞で高いことが確認された。

(3)細胞種特異的・機能的 Runx2 標的エンハンサーの探索

まず、骨芽細胞・軟骨細胞における Runx2 - DNA 結合プロファイルとオープンクロマチンプロファイルを統合して、Runx2 により制御される細胞種特異的エンハンサー領域の同定を目指した。統合解析の結果、骨芽細胞特異的 Runx2 結合領域と軟骨細胞特異的 Runx2 結合領域を同定した。得られたエンハンサー候補領域の生物学的意義を検証するため、GREAT を用いた Gene ontology 解析を行った。その結果、両データセットとも骨格形成に関連する遺伝子群と高い相関が確認された (図 2)。

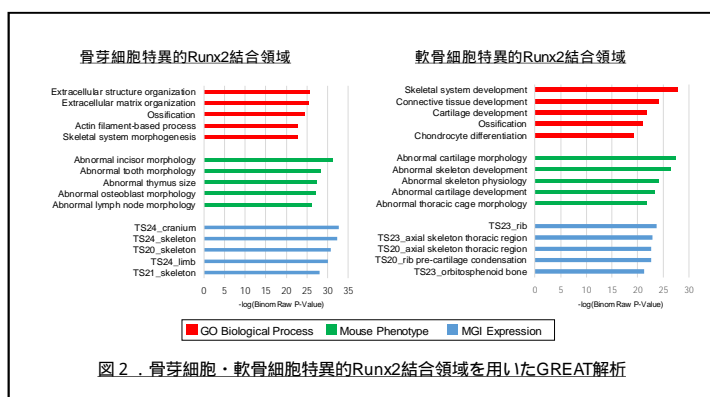


図2. 骨芽細胞・軟骨細胞特異的Runx2結合領域を用いたGREAT解析

次に、Runx2 の機能的エンハンサー候補に対して、in vivo エンハンサー活性を検証した。候補エンハンサー配列と lacZ::GFP レポーター遺伝子を有する合成遺伝子を発現するレポータートランスジェニックマウスを作成し、胎生 16 日齢マウスにおける whole mount x-gal 染色を行った。その結果、骨格組織特異的なエンハンサー活性が確認された。次に、本レポーターマウスの頭蓋骨および脛骨を用いた免疫組織学的解析を行った。その結果、検討したいずれの組織においても、エンハンサー活性が認められ、エンハンサー活性を有する細胞は、Runx2 および Osterix 陽性であった。さらに、本エンハンサー領域の骨芽細胞分化に対する影響を検討するため、Cas9 恒常的発現骨芽細胞株に、候補エンハンサー領域の両端を標的とするガイド RNA をレンチウイルスシステムで導入した。クローニングおよびジェノタイプングによりエンハンサー欠損骨芽細胞株を作製した。本細胞を用いた骨芽細胞分化誘導培地による骨芽細胞分化実験の結果、本欠損細胞は骨芽細胞分化の指標である ALP 染色の染色性の低下と骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現の減少が確認された。

以上より、本解析を通して、骨格発生における Runx2-DNA 結合プロファイル、エピゲノム・トランスクリプトームプロファイルを取得し、骨格発生における Runx2 を介した転写制御ネットワークの一端が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Zujur Denise, Kanke Kosuke, Onodera Shoko, Tani Shoichiro, Lai Jenny, Azuma Toshifumi, Xin Xiaonan, Lichtler Alexander C., Rowe David W., Saito Taku, Tanaka Sakae, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Chung Ung-il, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 20
2. 論文標題 Insights into Gene Regulatory Networks in Chondrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6324 ~ 6324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20246324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Xuan Fengjun, Yano Fumiko, Mori Daisuke, Chijimatsu Ryota, Maenohara Yuji, Nakamoto Hideki, Mori Yoshifumi, Makii Yuma, Oichi Takeshi, Taketo Makoto Mark, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Chung Ung-il, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 21
2. 論文標題 Wnt/ -catenin signaling contributes to articular cartilage homeostasis through lubricin induction in the superficial zone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-019-2041-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawata Manabu, Mori Daisuke, Kanke Kosuke, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Chung Ung-il, Yano Fumiko, Masaki Hideki, Otsu Makoto, Nakauchi Hiromitsu, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 13
2. 論文標題 Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 530 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Junichi, Ogawa Miho, Hojo Hironori, Kawashima Yusuke, Mabuchi Yo, Hata Kenji, Nakamura Shiro, Yasuhara Rika, Takamatsu Koki, Irie Tarou, Fukada Toshiyuki, Sakai Takayoshi, Inoue Tomio, Nishimura Riko, Ohara Osamu, Saito Ichiro, Ohba Shinsuke, Tsuji Takashi, Mishima Kenji	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06469-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hojo H, Chung UI, Ohba S	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 100-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2017.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zujur D, Kanke K, Lichtler AC, Hojo H, Chung UI, Ohba S	4. 巻 12
2. 論文標題 Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 e1602875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.1602875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujii Yasuyuki, Kawase-Koga Yoko, Hojo Hironori, Yano Fumiko, Sato Marika, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Chikazu Daichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s13287-018-0783-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Hojo H, Ohba S, Yamakawa A, Guo Q, He X, Saito T, Onodera S, Azuma T, Chung UI, McMahon AP.
2. 発表標題 Cell-type-distinct regulatory action of Runx2 on the genome underlies its distinct roles in osteoblasts and chondrocytes.
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lui J, Raimann A, Dong L, Hojo H, Roschger P, Fratzl-Zelman N, Jee YH, Haeusler G, Baron J
2. 発表標題 De novo missense mutation in SP7 in a patient with cranial hyperostosis, long bone fragility, and increased osteoblast number.
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wang JS, Mirzamohammadi F, Hojo H, Rotter D, Castro Andrade CD, Fiscoletti M, Kronenberg HM, Wein MN
2. 発表標題 A Novel SP7/OSTN Axis Controls Osteocyte Morphology and Function
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1.北條宏徳、山川晃、齋藤琢、小野寺晶子、東俊文、鄭雄一、大庭伸介
2. 発表標題 Runx2は骨格発生において細胞種特異的な転写制御領域に作用する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamakawa A, Hojo H, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 Identification of a chondrocyte-specific Indian hedgehog enhancer and Sox9-mediated mechanisms of the enhancer activation
3. 学会等名 OARSI World Congress on Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mirzanohammadi F, Hojo H, Enishi T, Govea N, Kronenberg HM, Wein MN
2. 発表標題 Role of Osterix (SP7) in Regulating Osteocyte Biology and Dendrite Formation
3. 学会等名 2018 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zujur DC, Hikita A, Kanke K, Hojo H, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 Modeling of bone remodeling by three-dimensional co-culture of mouse embryonic stem cell-derived osteoblasts and osteoclast precursors
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 15th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Zujur DC, Kanke K, Hojo H, Onodera S, Azuma T, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 In vivo bone formation by osteoblasts generated from human induced pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions
3. 学会等名 39th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ichsan M, Kanke K, Hojo H, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 A system level investigation to unravel mechanisms and potential direct targets of the osteogenic small molecule TH
3. 学会等名 EMBL Conference: Mammalian Genetics and Genomics (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke)		
研究協力者	鄭 雄一 (Tei Yuichi)		
研究協力者	アンドリュー マクマホン (McMahon Andrew)		