

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19636

研究課題名(和文)ゲノム編集技術と一細胞RNA-seq解析を融合した機能的エンハンサー探索法の開発

研究課題名(英文)Development of functional enhancer screening system by integrating genome editing technology with single-cell RNA-seq

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨発生をモデルに機能的エンハンサースクリーニング法の構築を目指した。エンハンサー候補群に対してガイドRNAライブラリーを構築し、Cas9を恒常的に発現する骨芽細胞株に感染させた。骨芽細胞分化誘導後、細胞を回収し一細胞RNA-seq解析を実施した。ガイドRNA配列をメッセンジャーRNAの一部として検出可能なDNAベクターを用いることで、Genotype(ガイドRNA配列)とPhenotype(遺伝子発現プロファイル)を同時に一細胞単位で検出することが可能となった。以上の解析により、骨芽細胞の分化に寄与するエンハンサーを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の発現を規定する転写ネットワークは、器官発生や細胞の分化決定だけでなく、疾患の分子病態の理解の根底をなすと考えられています。当該分野において、これまで、「転写ネットワークの全貌解明」を目指す研究が活発に進められてきましたが、「転写ネットワークの中で、どこが重要であるか」を生物学的な実験で効率よく抽出する方法は十分に確立していませんでした。本研究では、転写ネットワークを制御するエンハンサーに着目して、重要なエンハンサーを同定する手法を確立しました。本手法を応用することで、生物発生の成り立ちやヒトの病気のメカニズムの解析に役立つことが期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at establishment of enhancer screening system by using osteoblast differentiation as a model. We constructed guide RNA library that targets putative osteoblast enhancers. We then expressed the library DNA into osteogenic cells that stably expressed Cas9. After osteoblast induction, cells were isolated and single cell RNA-seq was performed. In the assay, we enabled to detect "genotype" as guide RNA sequencing and "phenotypes" as gene expression profile simultaneously at single cell resolution. Through this analysis we identified a functional enhancer for osteoblast differentiation.

研究分野：骨発生・骨再生

キーワード：エンハンサー ゲノム編集 一細胞解析

### 1. 研究開始当初の背景

個体発生や細胞の運命決定において、マスター転写因子群が中心的な役割を果たす。これらの蛋白質は、エンハンサー領域と呼ばれるゲノム上の特定の転写制御領域に作用することで、標的遺伝子の発現を制御し生物学的機能を発揮する。次世代シーケンサー (Next generation sequencing: NGS)を用いたクロマチン免疫沈降—シーケンス法の発展により、マスター転写因子群の結合部位がゲノムスケールで明らかになってきた。研究代表者らは、これまで骨格発生を制御する転写ネットワークに関する研究に一貫して取り組んできた。近年では NGS を駆使したゲノムワイド解析により、骨格形成におけるマスター転写因子である Sox9 と Sp7/Osterix の骨格系細胞における作動様式を解析し、その研究成果を発表してきた (Dev Cell 37:238, 2016; Trends Genet 32:774, 2016; Development 143:3012, 2016, Cell Rep 12:229, 2015; 2015 年米国骨代謝学会 Young Investigator Award)。

一方、次世代シーケンサーにより得られる大量のデータから、真に機能的な転写制御領域を抽出することは難しく、その機能解析は、少数の領域を対象を限定せざるを得ない状況にあった。転写制御領域をスクリーニングする手法は、ごく少数報告されていたが、当時はスクリーニングの検出を細胞増殖やマーカー染色等の雑多な表現型に頼らざるを得なかった。そのような中で、研究代表者らは 2016 年末に発表された Crispr/Cas9 システムと分子バーコードを利用した遺伝子ノックアウト法である Perturb-seq 法 (Cell 167:1853 2016) をエンハンサースクリーニングに応用できないかと着想を得て、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術、分子バーコードおよび一細胞 RNA-seq 解析技術を融合することで、転写制御領域の機能を一細胞単位で網羅的に解析する新しい研究手法の確立を目指した。研究代表者らがこれまで取り組んできた骨発生におけるマスター転写因子群による骨形成転写ネットワークをモデルに、一細胞エンハンサースクリーニング法を開発し、機能的な骨形成転写ネットワークの構築を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨発生エンハンサー候補選定

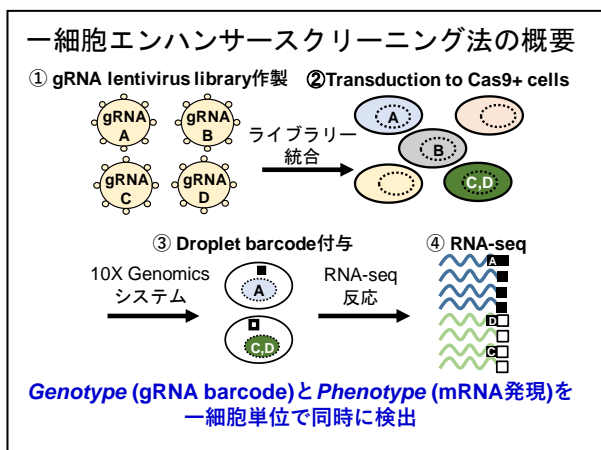
骨形成を担う骨芽細胞において、マスター転写因子群のゲノム結合部位データ、エピゲノムデータ、転写産物データおよび脊椎動物ゲノム配列保存情報を統合することで、骨発生において特異的にはたらくエンハンサー候補を探索した。

#### (2) ガイド RNA レンチウイルスライブラリーの作製

各エンハンサー候補領域を標的とするガイド RNA ウィルスライブラリーを作製した。ガイド RNA 配列を一細胞 RNA-seq プラットホームで解析可能な CROP ベクターを用いた。当初、分子バーコードを有する別のウィルスベクターを使用予定であったが、文献に基づく検討の結果、CROPseq ベクター (Nat Methods. 14(3):297,2017) を用いることとした。これにより、分子バーコードとガイド RNA 配列の対応付けにかかる煩雑な実験と解析を回避できた。各エンハンサー候補に対して 3 種類の異なるガイド RNA (sgRNA) 配列を有するベクターを構築後、これらを統合し、ウィルスパッケージング用ベクターおよび組み換え用ベクターと一緒に 293T 細胞に遺伝子導入し、レンチウイルスライブラリーを作製した。ポジティブコントロールとして、Runx2 遺伝子に対する sgRNA を 3 種類、ネガティブコントロールとして、ゲノム上に標的配列を有していない sgRNA 配列を 4 種類準備した。

#### (3) 一細胞バーコード付与と一細胞 RNA-seq 解析

Cas9 を恒常的に発現する骨芽細胞株を作製し、構築したレンチウイルスライブラリーを感染させた。CROPseq ベクターにはピューロマイシン耐性遺伝子がコードされているため、ウイルス感染細胞をピューロマイシンにより選別した。その後、リコンビナントヒト Bone morphogenetic protein2(rhBMP2)を一週間曝露し骨芽細胞の分化を誘導した。酵素処理により細胞を単離後、一細胞ごとに 10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞バーコード (Droplet バーコード) 付与を行い、一細胞 RNA-seq 解析を行った。



#### (4) 検証実験 (in vitro, in vivo)

これまでに選別された有望エンハンサー候補領域に対して、CRISPR/Cas9 システムを用いたエンハンサー欠損骨芽細胞株を作製し、骨芽細胞分化における候補エンハンサーの寄与を検討した。次に同定したエンハンサー領域に対する Runx2 の作用機序を検討する目的で、同定エンハンサー領域とルシフェラーゼレポーター遺伝子を有するレポーターアッセイを行った。また、Runx2 タンパク質と標的エンハンサー内コンセンサス Runx モチーフの結合を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で検討した。さらに、in vivo 解析として、遺伝子エンハンサー候補領域と lacZ レポーター遺伝子を有するレポータートランスジェニックマウスを作成し、エンハンサー活性の組織特異性を検討した。また、エンハンサー欠損マウスを作成し、骨量解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨発生エンハンサー候補選定

骨芽細胞マスター転写因子 Runx2 のクロマチン免疫沈降—シーケンス法と骨芽細胞における ATAC-seq (an assay for transposase-accessible chromatin using sequencing; Buenrostro JD et al., Nat Methods 2013) 解析により、骨芽細胞において Runx2 がはたらくエンハンサー候補領域を得た。さらにモチーフ解析と脊椎動物間の Conservation 解析により、Runx コンセンサスモチーフを有し脊椎動物間でよく保存されている領域を有望なエンハンサー候補として選別した。

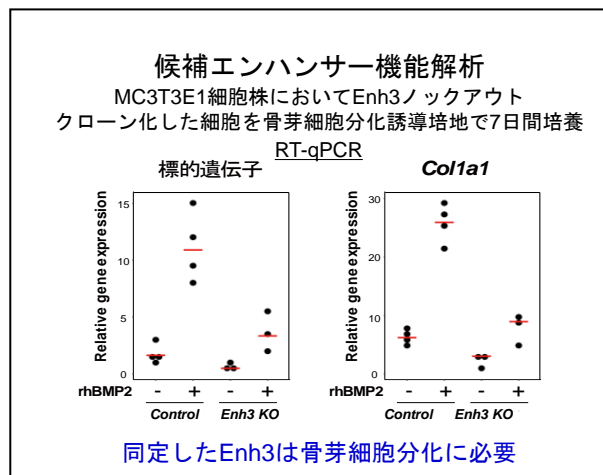
#### (2) ガイド RNA レンチウイルスライブラリーの作製

#### (3) 一細胞バーコード付与と一細胞 RNA-seq 解析

8810 細胞を用いた一細胞 RNA-seq 解析の結果、5754 細胞において一種類の sgRNA が検出された。実験系の妥当性を検証するため、ポジティブコントロールとして Runx2 遺伝子に対する sgRNA (sgRunx2) を発現する細胞集団と、ネガティブコントロール sgRNA (sgNC) を発現する細胞集団間で遺伝子発現比較解析を行った。その結果、sgRunx2 発現により有意に発現量に変化する 47 遺伝子が同定された。この中には、骨芽細胞の分化マーカーで Runx2 の標的遺伝子として知られている Bglap, Ibsp, Spp1, Colla1 などが含まれていた。sgRunx2 発現細胞で有意に発現が異なる遺伝子セットを用いて Gene ontology 解析を行った結果、石灰化や骨格発生に関連する遺伝子群がエンリッチすることが確認された。以上より、本手法により、sgRNA 配列の検出と、標的遺伝子の発現欠損により遺伝子発現プロファイルが変化することが確認された。次に、標的エンハンサー欠損による Runx2 依存的な遺伝子セットの発現変化を検討したところ、Enh3 において Runx2 遺伝子欠損と同様に有意な遺伝子発現減少を示した。以上より Enh3 は骨芽細胞分化に関わるエンハンサー領域である可能性が示唆された。

#### (4) 検証実験 (in vitro, in vivo)

選別された有望エンハンサー領域 (Enh3) に対して、CRISPR/Cas9 システムを用いたエンハンサー欠損骨芽細胞株 (Enh3 KO) を作製し、骨芽細胞分化における候補エンハンサーの寄与を検討した。その結果、野生型骨芽細胞株において、rhBMP2 曝露により骨芽細胞分化マーカーである *Col1a1* 発現が顕著に上昇したが、Enh3 KO 細胞においては、そのマーカー発現誘導効果は顕著に減少した (右図)。骨芽細胞分化の指標であるアルカリフォスファターゼ染色の結果、野生型骨芽細胞株と比較して Enh3 KO 細胞においては、染色性の減弱が確認された。また、候補エンハンサーの標的遺伝子に関しても、野生型骨芽細胞株と比較して Enh3 KO 細胞においてその発現は有意に減少していた。



メカニズム解析に関して、Enh3 レポーターコンストラクトを有するルシフェラーゼアッセイの結果、Runx2 の量依存的に Enh3 を介する転写活性が増加した。一方、Runx モチーフに変異を導入すると、Runx2 による転写活性化が減弱した。EMSA により Runx2 タンパク質が Enh3 内のコンセンサス Runx モチーフに直接結合することが確認された。

In vivo 解析において、Enh3 と lacZ::GFP レポーター遺伝子を有するレポータートランスジェニックマウスを作成し、胎生期骨組織において、Enh3 により誘導されるレポーター遺伝子発現を Whole-mount x-gal 染色により解析した。その結果、Enh3 は骨組織において特異的に活性化することが明らかになった。さらに、免疫組織学的解析により、Enh3 は Sp7 陽性骨芽細胞において活性化していることが確認された。最後に Enh3 欠損マウスを作成し組織学的解析とマイクロ CT を用いた骨量解析を行った。その結果、Enh3 欠損により骨髄中の骨量の減少が確認された。以上より、本スクリーニングにより、骨形成に寄与する新規エンハンサー領域を同定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 137
2. 論文標題 Gene regulatory landscape in osteoblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115458 ~ 115458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115458	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 Onodera Shoko, Saito Akiko, Hojo Hironori, Nakamura Takashi, Zujur Denise, Watanabe Katsuhito, Morita Nana, Hasegawa Daigo, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Nomura Takeshi, Shibahara Takahiko, Yamaguchi Akira, Chung Ung-il, Azuma Toshifumi, Ohba Shinsuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 125 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.05.008	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 Tani Shoichiro, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori	4. 巻 52
2. 論文標題 Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1166 ~ 1177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-020-0482-1	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 Tani Shoichiro, Okada Hiroyuki, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori	4. 巻 22
2. 論文標題 The Progress of Stem Cell Technology for Skeletal Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1404 ~ 1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031404	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 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 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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 北條宏徳、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クロマチンランドスケープを規定する
3. 学会等名 日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hironori Hojo, Taku Saito, Shoko Onodera, Toshifumi Azuma, Ung-il Chung, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Andrew P. McMahon, Shinsuke Ohba
2. 発表標題 Runx2 defines the osteoblast chromatin landscape in skeletal development
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

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 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

〔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 分 担 者	大庭 伸介  (Ohba Shinsuke)  (20466733)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授   (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	鈴木 穰  (Suzuki Yutaka)  (40323646)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授    (12601)	
連携研究者	関 真秀  (Seki Masahide)  (90749326)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	南カリフォルニア大学			