

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19589

研究課題名（和文）一細胞CRISPRスクリーニング法を駆使した機能的GWAS-SNP検出法の確立

研究課題名（英文）Development of a functional GWAS-SNP detection method using single-cell CRISPR screening method

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゲノム編集と一細胞RNA-seqを統合したエンハンサースクリーニング法を用いて、ゲノムワイド関連解析（GWAS）データから表現型に寄与するSNP近傍のエンハンサー領域を効率的に選別する手法の開発を行った。骨疾患との関連が疑われるSNP近傍のエンハンサーに着目し、エンハンサースクリーニングを行った結果、有望なエンハンサーとしてOBEnhを同定した。OBEnhはin vitroにおいて、骨芽細胞の分化とともに活性が亢進し、マウスにおいて骨組織特異的に転写活性を示した。以上より骨疾患と関連する可能性があ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

近年、人の遺伝病や生活習慣病を対象としたゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study; GWAS）が活発に行われ、疾患との関連が示唆される一塩基多型（SNP）のビッグデータが蓄積している。そこで本研究では、これら疾患と関連するSNP（GWAS-SNP）が集積しているエンハンサー領域に着目し、疾患と関連する機能的なエンハンサー領域を効率よく選別する手法の開発に取り組んだ。その結果、骨疾患と関連する可能性があるエンハンサー領域を得た。今後、本研究結果を基盤に、さらなる大規模解析を行うことで、骨疾患と関連のあるエンハンサー群を包括的に解析することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method to efficiently select SNPs-associated regions contributing to phenotypes from GWAS (genome-wide association studies) data using an enhancer screening method integrating genome editing and single-cell RNA-seq. We focused on enhancers near SNPs suspected to be associated with bone diseases and performed enhancer screening. The analysis identified the OBEnh as a promising enhancer. OBEnh showed increased transcription activity with osteoblast differentiation in vitro and the activity was specific in bone tissue in mice. These results suggest that the identified enhancer is associated with bone diseases.

研究分野：ヒト骨発生学

キーワード：エンハンサー 1細胞解析 CRISPR GWAS

1. 研究開始当初の背景

近年、人の遺伝病や生活習慣病を対象としたゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study ; GWAS) が活発に行われ、疾患との関連が示唆される一塩基多型 (SNP) のビッグデータが蓄積している。これらの多くは一般公開され、情報を自由に使えるものの、GWAS-SNP データベースから、病気と関連する SNP を選別する手法はほとんど開発されていない。最近の研究で、これら疾患と関連する SNP (GWAS-SNP) の多くが遺伝子制御領域であるエンハンサー領域に集積していることが分かってきた。SNP 近傍のエンハンサー活性の変化が疾患と深く関連することが示唆されている (Nat Genet. 49(12):1664, 2017)。しかし、SNP 関連エンハンサー領域の中で、疾患と関連する機能的なエンハンサー領域を効率よく選別することは容易ではない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、研究代表者がこれまでに取り組んできた、ゲノム編集と一細胞 RNA-seq を統合したエンハンサースクリーニング法を用いて、GWAS-SNP データから表現型に寄与する SNP 近傍のエンハンサー領域を効率的に選別する手法の開発を目指した。さらに、その proof of concept を示すため、骨格系疾患に関する GWAS-SNP データベースから骨疾患や骨量と関連する SNP 近傍領域の同定と機能検証を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定

ヒト GWAS-SNP データ骨関連疾患への関与が疑われる SNP の中で、骨芽細胞特異的なエンハンサー領域に位置する候補を選定した。ヒト骨芽細胞エンハンサープロファイルを得るため、研究代表者らが開発したヒト骨発生モデルを用いた (Cell Rep. 42(4):112276,2023)。ヒト多能性幹細胞から骨組織を誘導し、一細胞マルチオーム解析(scATAC-seq + scRNA-seq)解析、もしくは骨芽細胞特異的なレポーター細胞を用いた bulk ATAC-seq 解析を行った。以上のヒト骨芽細胞エンハンサーデータセットと SNP データセットの統合解析により、エンハンサー候補領域を得た。

(2) ガイド RNA レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製

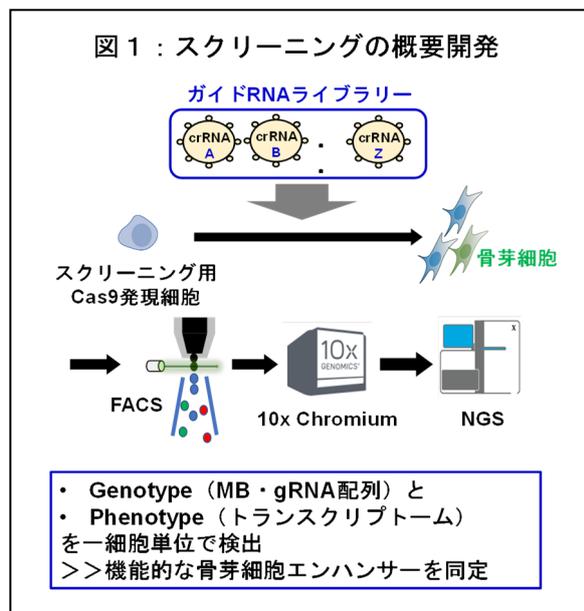
各エンハンサー候補領域を標的とするガイド RNA ウイルスライブラリーの作製のため、CROPseq ベクターを用いた。本ベクターからレンチウイルスを作製しスクリーニングに用いた。Cas9 が恒常的に発現する骨芽細胞株を用いた。骨芽細胞の分化過程を蛍光タンパク質で可視化するため、骨芽細胞特異的なレポーター活性を有する Col2.3Ob-GFP の利用を検討した。

(3) エンハンサースクリーニング (図1)

樹立した CRISPR 細胞にガイド RNA ウイルスライブラリーを感染させた後、骨芽細胞への分化誘導を行い、細胞を単離した。CROP 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。そのため、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 protein (rhBMP2) を含む骨芽細胞分化誘導培地で一週間培養し、骨芽細胞分化誘導を行った。細胞を回収し 10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。

(4) エンハンサーの機能検証

エンハンサースクリーニングにより得られた有望エンハンサーについて、機能検証としてルシフェラーゼアッセイを行った。エンハンサー領域依存的にルシフェラーゼ遺伝子が発現するレポーターベクターを作製後、異なる細胞に発現させ、その転写活性を検討した。また、エンハンサー活性の組織特異性を検討するため、エンハンサー配列と lacZ レポーター遺伝子を有するレポーターコンストラクトを構築し、マウスゲノムの safe harbor 領域にノックインしたマウスを作出した。作出したノックインマウスの胎生期における Whole mount X gal 染色によりエンハンサー候補の組織特異性を検討した。Genotyping によりノックインマウスを識別した。



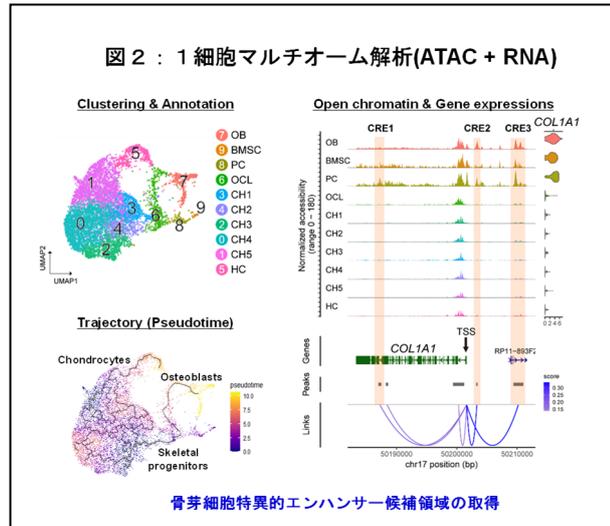
また、エンハンサー活性の組織特異性を検討するため、エンハンサー配列と lacZ レポーター遺伝子を有するレポーターコンストラクトを構築し、マウスゲノムの safe harbor 領域にノックインしたマウスを作出した。作出したノックインマウスの胎生期における Whole mount X gal 染色によりエンハンサー候補の組織特異性を検討した。Genotyping によりノックインマウスを識別した。

4. 研究成果

(1) ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定

ヒト GWAS-SNP データとして、GWAS catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) データベースから骨関連疾患との関与が疑われる SNP プロファイルを取得した。"bone density", "bone disease", "bone mineral content measurement", "bone fracture"を含む 10 個のカテゴリー中で報告があった SNP セットを用いた。

ヒト多能性幹細胞由来骨組織から細胞を単離後、一細胞マルチオーム解析を行った(図2)。クラスタリング解析と細胞アノテーション解析により、骨芽細胞で特異的にはたらくオープンクロマチン領域を同定した。さらに、Col2.3Ob-GFP をノックインしたヒト ES 細胞を用いてヒト骨組織を誘導した後、FACS により GFP 陽性の骨芽細胞を回収し、bulk ATAC-seq 解析を行い、骨芽細胞におけるオープンクロマチンプロファイルを得た。以上のデータセットから、骨芽細胞において活性が高いエンハンサー候補領域を抽出した。本データセットと前述の SNP データセットを統合解析することで、骨疾患や骨量に関連する SNP 近傍のエンハンサー候補領域を得た。



(2) ガイド RNA レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製

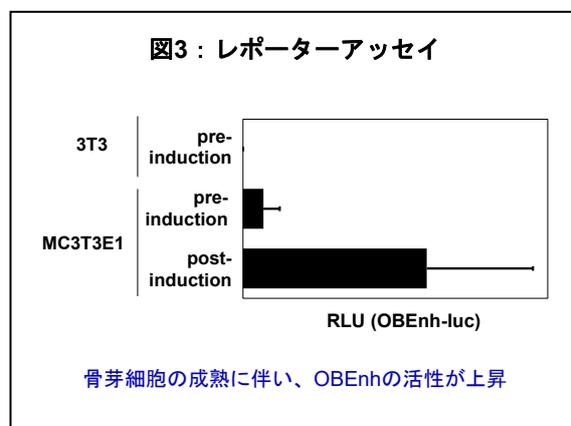
ゲノム編集技術を用いて、ヒト間葉系細胞の safe harbor 領域に Col2.3Ob-GFP 細胞をノックインした細胞を作製した。しかし、GFP 発現が、骨芽細胞分化誘導前から認められたため、スクリーニングに用いることは不適切であると判断した。そのため、本研究では、既にスクリーニングで機能することを確認していたマウス骨細胞株 Cas9-MC3T3E1 細胞を用いることとした。1 で同定した骨格系疾患に関連する SNP 近傍エンハンサー候補領域の中で、マウスにおいても配列が保存された有望領域 50 領域選定し、それぞれの領域に対するガイド RNA を設計した。各 gRNA 配列を CROP ベクターにクローニングし、ベクターライブラリーを作製した。293T 細胞へのトランスフェクションにより、レンチウイルスガイド RNA ライブラリーを調整した。

(3) エンハンサースクリーニング

Cas9-MC3T3E1 細胞に CROP ベクター由来レンチウイルスを感染させた。薬剤セレクションおよび骨芽細胞分化誘導を行った後、細胞を回収し、10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。本解析では、一細胞ごとに Chromium システムによる一細胞分子バーコード付与を行った後、遺伝子発現解析を行うことで、各分子バーコードに対する遺伝子発現プロファイルとガイド RNA プロファイルを取得可能である。パイオインフォマティクス手法を用いて、各細胞における Genotype (エンハンサー欠損部位) と、Phenotype (遺伝子発現プロファイル) を対応付けることで、どのエンハンサー候補群が、骨芽細胞の分化に寄与するか絞り込んだ。解析の結果、有望な候補としてエンハンサーとして、OBEnh を同定した。

(4) エンハンサー領域の機能検証とメカニズム解析

OBEnh の機能検証を行うため、OBEnh のエンハンサー配列を有するルシフェラーゼレポーターベクターを、線維芽細胞と骨芽細胞に導入してレポーターアッセイを行った。その結果、線維芽細胞および分化誘導前の骨芽細胞に比べて、分化誘導後の骨芽細胞では、レポーター活性が顕著に促進することが確認された(図3)。さらに、エンハンサー活性の組織特異性を検討するため、レポーターノックインマウスを用いた解析を行った。マウス胎児を用いた Whole mount X gal 染色の結果、骨組織特異的にレポーター活性が認められた。



以上、本研究により、骨格系疾患 SNP と関連するヒト骨芽細胞エンハンサーを同定した。今後、OBEnh のノックアウトマウスを作成し、その機能を in vivo で検討予定である。今後、さらなる大規模解析を行うことで、骨疾患と関連のあるエンハンサー群を包括的に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tani Shoichiro, Okada Hiroyuki, Onodera Shoko, Chijimatsu Ryota, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Xin Xiaonan, Rowe David W., Saito Taku, Tanaka Sakae, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori	4. 巻 42
2. 論文標題 Stem cell-based modeling and single-cell multiomics reveal gene-regulatory mechanisms underlying human skeletal development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112276 ~ 112276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112276	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 21
2. 論文標題 Runt-related Transcription Factors and Gene Regulatory Mechanisms in Skeletal Development and Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Osteoporosis Reports	6. 最初と最後の頁 485 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11914-023-00808-4	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 Nakayama Mika, Okada Hiroyuki, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori	4. 巻 21
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing unravels heterogeneity of skeletal progenitors and cell-cell interactions underlying the bone repair process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 9 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.05.001	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 -

1. 著者名 Hojo Hironori, Saito Taku, He Xinjun, Guo Qiuyu, Onodera Shoko, Azuma Toshifumi, Koebis Michinori, Nakao Kazuki, Aiba Atsu, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Okada Hiroyuki, Tanaka Sakae, Chung Ung-il, McMahon Andrew P., Ohba Shinsuke	4. 巻 40
2. 論文標題 Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111315 ~ 111315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111315	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 Doi Tomomitsu, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Obayashi Kunie, Endo Motoyoshi, Ishizaki Toshimasa, Katoh Akira, Kouji Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of activator protein-1 family members in -catenin and p300 association on the genome of PANC-1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08890 ~ e08890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e08890	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 Lui Julian C., Raimann Adalbert, Hojo Hironori, Dong Lijin, Roschger Paul, Kikani Bijal, Wintergerst Uwe, Fratzl-Zelman Nadja, Jee Youn Hee, Haeusler Gabriele, Baron Jeffrey	4. 巻 13
2. 論文標題 A neomorphic variant in SP7 alters sequence specificity and causes a high-turnover bone disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28318-4	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 Wang JS, Kamath T, Mazur CM, Mirzamohammadi F, Rotter D, Hojo H, Castro CD, Tokavanich N, Patel R, Govea N, Enishi T, Wu Y, da Silva Martins J, Bruce M, Brooks DJ, Boussein ML, Tokarz D, Lin CP, Abdul A, Macosko EZ, Fiscoletti M, Munns CF, Ryder P, Kost-Alimova M, Byrne P, Cimini B, Fujiwara M, Kronenberg HM, Wein MN	4. 巻 12
2. 論文標題 Control of osteocyte dendrite formation by Sp7 and its target gene osteocrin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26571-7	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 該当する

1. 著者名 Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Takao Tomoka, Takihira Shota, Yoshida Aki, Kawai Shunsuke, Miura Akihiro, Ming Lu, Yoshitomi Hiroyuki, Gozu Mai, Okamoto Kumi, Hojo Hironori, Kusaka Naoyuki, Iwai Ryosuke, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Toguchida Junya, Takarada Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Induction and expansion of human PRRX1+ limb-bud-like mesenchymal cells from pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 926 ~ 940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-021-00778-x	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 Kanazawa Sanshiro, Okada Hiroyuki, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Iwata Junichi, Komura Makoto, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 11
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells in the bone marrow niche consist of multi-populations with distinct transcriptional and epigenetic properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94186-5	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shoichiro Tani, Hiroyuki Okada, Taku Saito, Sakae Tanaka, Ung-il Chung, Hironori Hojo and Shinsuke Ohba
2. 発表標題 "Gene regulatory networks underlying human endochondral bone formation "
3. 学会等名 ICORS 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hironori Hojo
2. 発表標題 Understanding a mechanism underlying bone repair process and application for bone regeneration
3. 学会等名 SICEM 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北條宏徳
2. 発表標題 骨格形成における遺伝子制御ランドスケープの解明
3. 学会等名 17th Meeting of Bone Biology Forum (招待講演)
4. 発表年 2021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	岡田 寛之 (Okada Hiroyuki) (10883481)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教 (12601)	
研究 分担者	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke) (20466733)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	
研究 分担者	関 真秀 (Sekai 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
---------	---------