

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670807

研究課題名(和文)TALENゲノム編集法を用いた骨形成促進薬のスクリーニングシステムの開発

研究課題名(英文)Development of screening system for bone forming reagents by using TALEN genome engineering technique

研究代表者

西村 理行(Nishimura, Riko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60294112

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):骨形成を促進する低分子化合物をスクリーニングするために、TALENゲノム編集法にて蛍光遺伝子Venusとルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ細胞株を作製したが、陽性細胞株の選別が困難であることが明らかとなった。そこで、Cas9ゲノム編集法を用いたPITCh法を活用することにより、ガイドRNAならびにドナーベクターのプラスミドの作製が飛躍的に効率化できることが確認された。またドナーベクターに分泌型ルシフェラーゼ遺伝子とEGFP遺伝子の発現カセットをlox配列で挿入することにより、陽性細胞株の選択にも非常に効果的に行えることが示唆された。

研究成果の概要(英文): In order to develop effective screening system for bone forming reagents, we attempted to generate cell lines knock-ined both Venus and luciferase genes by using the Golden Gate TALEN genome engineering technique. Although the Golden Gate TALEN genome engineering technique is much more effective and useful than conventional TALEN system, selection of positive clone cells was still complicate. We, therefore, attempted to optimize a new genome engineering technique, PITCh method, which would be very powerful for knock-in of interested genes into to mammalian cells. First, we used Cas9-based PITCh technique, allowing us to generate guide RNA construct easily. Second, we designed and generated a PITCh donor vector, in which we introduced CLuc luciferase, Puromycin resistant genes with EGFP expression cassette. This optimization seems very effective and helpful for selection of the positive clone cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨形成 ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖、分化ならびに組織発生に深く関与するサイトカイン Wnt は、強い骨形成促進作用を有している。また最近、Wnt の細胞内シグナルとして、 $\beta$ -カテニン、LEF/TCF に加えて、転写調節因子 TAZ が骨芽細胞分化を促進するメカニズムも明らかにされた。一方、成熟骨芽細胞および骨細胞が、Wnt のアンタゴニストである Sclerostin (SOST) を産生、分泌し、Wnt による骨形成作用を負に制御することが知られている。近年、SOST に対するヒト型モノクローナル抗体が開発され、抗 SOST 抗体が、骨粗鬆症などの骨量減少を来す代謝性骨疾患の治療に非常に有効であることが、動物実験ならびに臨床治験の成績で示されつつある。しかしながら、抗 SOST 抗体は、生物学製剤であるため、高価であることが臨床上的大きな課題である。抗 SOST 抗体の有効性を踏まえて、骨組織における SOST の発現を阻害する低分子化合物が開発されれば、骨粗鬆症などに対する骨疾患の新規治療薬への応用が期待される。この開発のためには、SOST の発現を迅速かつ鋭敏に測定するハイスループットスクリーニングシステムの構築が必要不可欠である。研究代表者らは、骨芽細胞分化の分子メカニズムの解明に大きな貢献を果たし、新規動物細胞遺伝子発現クローニング法の開発にも成功し、そのシステムを活用して細胞分化に関わる転写制御因子群を数々と同定し、これら分子の機能解析も明らかにしてきた。そこで、これまでの研究代表者らの研究成果、知見、経験ならびに技術を基盤にして、骨芽細胞における SOST の発現をスクリーニングできるハイスループットアッセイを確立し、新しい骨形成促進治療薬の開発への貢献を目指して、本研究計画を開始した。

## 2. 研究の目的

Wnt シグナルを活性化し、骨形成を促進する低分子化合物を探索するハイスループットアッセイの構築に必要な基盤形成を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) マウス初代骨芽細胞を BMP2 で分化誘導すると SOST 遺伝子の発現が顕著に増加することを確認している。そこで、BMP2 により SOST 遺伝子の発現上昇効果を示す骨芽細胞株を RT-qPCR 法にて探索した。

(2) Wnt のアンタゴニスト Frzb の発現誘導に関わるサイトカインの存在を RT-qPCR 法にて検索した。

(3) Golden Gate システムを用いた TALEN ゲノム編集法に必要なプラスミドの作製を構築し、Frzb の発現をモニターできる細胞株の樹立を試みた。

(4) Cas9 ゲノム編集法では、長い挿入遺伝子のノックイン細胞株の作製は困難とされてきたが、PITCh 法 (Nakade et al. Nat Commun 10.1038/ncomms6560.) の開発により、Cas9 法の応用が可能となりつつある。そこで PITCh 法ドナーベクターの改良を図り、ゲノム編集に必要なコンストラクト作製の効率化とノックイン陽性細胞株の選別の合理化を図った。

(5) 免疫共沈降法、Wnt 標的遺伝子レポーターアッセイ、ならびに RT-qPCR 法を用いて、骨形成過底における Wnt シグナルの活性化機構の役割を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 骨芽細胞系細胞株 SaOS2 に BMP2 を作用させると、SOST 遺伝子の発現が顕著に増加することを示した。さらに SSA レポーターアッセイにより、SaOS2 細胞株が TALEN ゲノム編集法に適していることも確認できた。

(2) 軟骨細胞株 SW1353 に、インディアンヘッジホッグ、Wnt3a、あるいは BMP2 を作用させると、BMP2 が有意に FRZB 遺伝子の発現を上昇させることを見出した。一方、インディアンヘッジホッグおよび Wnt3a は、効果を示さなかった。

(3) Golden Gate システムを用いることにより、TALEN ゲノム編集法の標的コンストラクトの作製が従来の方法より効率化されることを確認した。しかしながら、ハイスループットアッセイに不可欠なレポーター遺伝子と薬剤耐性遺伝子を標的遺伝子にノックインするドナーベクターの Arm を長くする必要のあるために、ノックインされた陽性細胞株を PCR で検出することが困難であった。

(4) Cas9 ゲノム編集法を用いることに、標的遺伝子座に対するガイド RNA の作製は、TALEN 法に比べて、飛躍的に効率化できることが確認された。またドナーベクターの Arm を TALEN 法より遥かに短くできるため、PCR ならびに DNA シークエンス解析によるノックイン細胞の選別ならびに決定の合理化が可能となった。

(5) PITCh 法に必要なドナーベクターの最適化を図った結果、図のように、分泌型ルシフェラーゼ遺伝子 CLuc と Puromycin 耐性遺伝子を 2A ペプチド配列で連結することにより、ハイスループットアッセイシステムの簡易化と、ノックイン細胞株の選別の合理化が可能となった。さらに蛍光遺伝子 EGFP の発現カセットを loxP 配列で挟み込み、ドナーベクターに挿入することにより、陽性細胞株の可視化ができ、選別をより効率化するこ

とが可能となった。さらに、EGFP 発現カセットを loxP 配列で挟み込むことにより、Cre リコンビナーゼ処理による EGFP 発現カセットの除去が可能になり、これによる予期せぬ作用を阻止することができる。

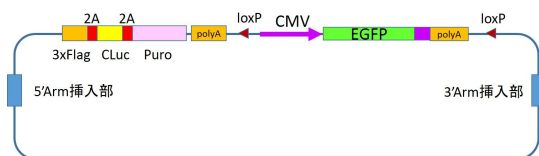


図 改良型 PITCh 用ドナーベクター

(6) Wnt の代表的リガンドであるある Wnt3a は、未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2、骨髄細胞株 ST2、骨芽細胞株 MC3T3-E1 のアルカリフォスファターゼ活性あるいは発現を有意に増加させた。しかしながら、Osterix、Runx2、オステオカルシン、骨シアロタンパク質等の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現に対しては、殆ど効果を示さなかった。この点は、BMP2 による骨芽細胞分化効果と大きく異なっていた。また Wnt3a は、 $\beta$  カテニン/LEF1 経路に加えて、TAZ 経路を活性化させること、両経路が Wnt3a によるアルカリフォスファターゼ遺伝子発現誘導効果に必要な不可欠であることが確認された。さらに、 $\beta$  カテニン/LEF1 経路と TAZ 経路は、クロストークすることにより、Wnt3a の骨芽細胞分化能を制御していることが示唆された。

(7) Wnt3a と BMP2 は、相乗的に骨芽細胞分化を誘導することが明らかになり、両者のシグナルは、LEF1 ならびに TAZ を作用点としていることが示され、この知見に基づく骨芽細胞に特異的な Wnt シグナルの創薬に寄与できると推測された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

(1) Nishimura R, Hata K, Ikeda F, Matsubara T, Amano K, Ono K, Takigawa Y, Takashima R, Yoshida M, Nakamura E, Yoneda T. (2015) Regulation of transcriptional network system during bone and cartilage development. *J Oral Bioscience* 57: 165-170 URL: <http://www.journaloforalbiosciences.org> 査読あり

(2) 西村 理行, 中村 恵理子, 木田 淳平, 八木 寛子, 波多 賢二 (2014) 間葉系幹細胞に由来する軟骨細胞の分化制御機構. *Clinical Calcium* 24:509-516 査読なし

[学会発表](計 14 件)

(1) Riko Nishimura. Regulation of

endochondral ossification by transcription factors 2015 年 12 月 11 日 International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases. 大阪大学大学院歯学研究科(大阪府・吹田市)

(2) 波多 賢二, 吉田 倫子, 中村 恵理子, 高畑 佳史, 村上 智彦, 井関 祥子, 山本 照子, 西村 理行. 転写因子 Foxc1 は Ihh-Gli2 シグナルを促進し内軟骨性骨形成を制御する. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 12 日 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

(3) 八木 寛子, 高畑 佳史, 村上 智彦, 波多 賢二, 西村 理行. BMP2 は転写因子 Osterix と Msx2 を介して変形性関節症創薬ターゲット, Wnt アンタゴニスト FRZB の発現を制御する. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 13 日 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

(4) 村上 智彦, 高畑 佳史, 波多 賢二, 西村 理行. 慢性炎症に関連する NLRP3 インフラマソームの活性化機構の解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 13 日(朱鷺メッセ(新潟県・新潟市))

(5) 森 裕美子, 萩野 弘将, 後藤 満帆, 長田 奈幹, 高畑 佳史, 村上 智彦, 波多 賢二, 西村 理行. ゲノム編集技術を用いた新規プロテインキナーゼの軟骨細胞分化における役割解明. 第 33 回日本骨代謝学会 2015 年 7 月 23 日 (京王プラザホテル東京(東京都・新宿区))

(6) 西村 理行. 骨形成過程における転写制御プログラムの統合的理解の解明. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 26 日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

(7) Yoshida M, Hata K, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. (2014) The Transcription Factor Foxc1 Regulates Chondrocyte Hypertrophy in a Synergistic cooperation with Runx2. The American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting. 2014 年 9 月 12 日 ヒューストン(アメリカ合衆国)

(8) Nakamura E, Hata K, Wakabayashi M, Yura Y, Yoneda T, Nishimura R. The transcription factor Zinc Finger Homeobox 4 (Zfhx4) is critical to late stage of endochondral ossification. The American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting. 2014 年 9 月 12 日 ヒューストン(アメリカ合衆国)

(9) Nagata Y, Tanaka S, Hata K, Hiasa

M, Nishimura R, Yoneda T. Ubiquitin-Specific Peptidase 45 (USP45), A Family Member of De-Ubiquitinating Enzyme, Controls Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer in Bone. The American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting. 2014年9月12日 ヒューストン(アメリカ合衆国)

(10) Nakamura E, Hata K, Wakabayashi M, Yura Y, Yoneda T, Nishimura R. The transcription factor zinc finger homeobox 4 (Zfhx4) plays a novel role in the regulation of endochondral ossification. 24th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS). 2014年9月8日 クイーンズタウン(ニュージーランド)

(11) Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Yamamoto-Takano T, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor Foxc1 controls endochondral ossification through the direct regulation of PTHrP and Col10a1 expression under the partnership with Gli2 and Runx2. European Calcified Tissue Society 2014年5月17日 プラハ(チェコ共和国)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 西村 理行 (2015) Osterix . 骨ペディア : 骨疾患・骨代謝キーワード事典 分担執筆 p84-85 , 羊土社

(2) 西村 理行 (2015) ヘッジホッグ . 骨ペディア : 骨疾患・骨代謝キーワード事典 分担執筆 p61-63 , 羊土社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

[http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission\\_000294.html](http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission_000294.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 理行 (NISHIMURA RIKO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号 : 60294112

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

波多 賢二 (HATA KENJI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号 : 80444496

村上 智彦 (MURAKAMI TOMOHIKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号 : 50510723