

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15779

研究課題名(和文)新規ゲノム編集クローニング技術を活用した軟骨細胞転写ネットワークシステムの解明

研究課題名(英文) Investigation of transcriptional network system of chondrocytes by novel gene-editing cloning technique

研究代表者

西村 理行(Nishimura, Riko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：60294112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞の分化過程においては、転写因子Sox9、Runx2、Osterixが必須的役割を果たしており、その機能制御機構も明らかになりつつある。一方、Sox9あるいはRunx2の発現の制御機構は未だ不明である。研究代表者らは、骨形成因子BMP2が軟骨細胞分化を誘導するとともに、様々なBMP2依存性early-responsive遺伝子の発現を制御していることを見出している。そこでゲノム編集技術を活用して、これら遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子の同定に成功し、その発現がユビキチン-プロテアソーム経路で制御されていること、当該遺伝子の欠損マウスがdwarfを呈することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transcription factors, Sox9, Runx2 and Osterix play critical and central roles in chondrocyte differentiation. It is also getting clearer how these transcription factors regulate chondrocytes differentiation through complex formation with several transcriptional regulators. In contrast, molecular mechanisms that controls expression of Sox9 and Runx2 have been still known. We found that bone morphogenetic protein 2 (BMP2) induced several early-responsive genes expression along with chondrocyte differentiation. To address the mechanisms, we attempted to establish a gene cloning approach based on Cas9 genome editing system. Using the established gene cloning system, we successfully isolated the transcription factor that directly interacts with the BMP2-responseive gene promoter region. Interestingly, we found that the expression of the transcription factor is regulated by ubiquitin-proteasome system. Moreover, we observed that the knockout mice of the transcription factor showed dwarf.

研究分野：分子生物学

キーワード：軟骨細胞 転写因子 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の軟骨細胞の分化過程においては、転写因子 Sox9、Runx2、および Osterix/Sp7 が必須的かつ中心的役割を果たしていることが明らかにされている(Nishimura et al. J Biochem 2012)。これら転写因子の発現および機能には、BMP2 シグナルが密接に関与していることが示されており、このことは BMP2 が強い軟骨形成能力を発揮できることに符合する。また Sox9、Runx2、あるいは Osterix が軟骨細胞分化促進能を発揮するためには、Sox5、Sox6 および Wwp2、Cbfb、ATF4、C/EBPβ などの転写因子との機能的連携が不可欠であることも報告されている。研究代表者らは、Sox9 と転写複合体を形成する転写制御因子 p54^{nrb}、Arid5a、Arid5b ならびに Znf219 を同定し、これらの分子が軟骨細胞分化を時空間的に制御していることを明らかにしている。さらに、Osterix の上流ならびに転写複合体形成に Runx2 が必須であることも見出している。このように軟骨細胞分化過程におけるこれら転写因子の機能メカニズムの解明は、飛躍的に進展し、軟骨形成における役割が益々注目されている。特にこれら軟骨分化のマスター遺伝子の発現を人為的にコントロールすることが可能になれば、軟骨および関節疾患に対する新規治療法の開発が格段に発展すると期待されている。しかしながら Sox9 および Runx2 の発現がどのように制御されているかは、未だ不明である。さらに BMP2 は、数多くの BMP2 誘導性 early-responsive 遺伝子の発現に深く関与していることが示されているが、それら遺伝子の発現調節に関わる転写ネットワークシステムにおける Sox9、Runx2 および Sox9 の関与には、未知な点が多々残されていると推察されている。

2. 研究の目的

BMP2 による軟骨細胞分化誘導過程における分子メカニズムをさらに理解するために、BMP2 誘導性 early-responsive 遺伝子の発現制御機構の解明を目指した。

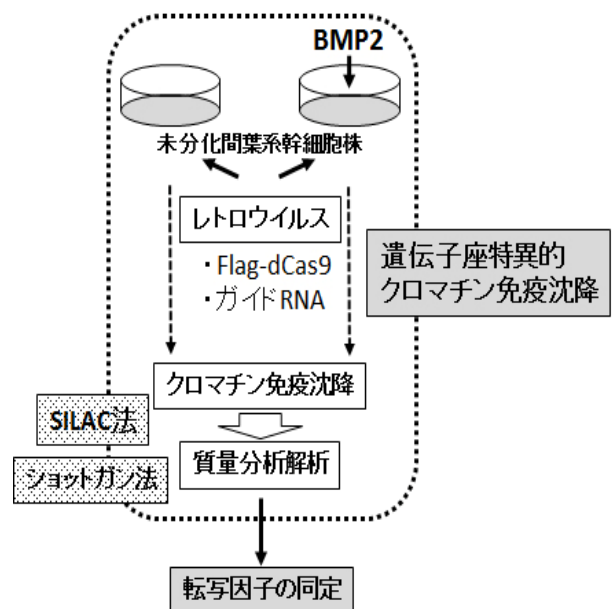
そこで研究代表者らは、最新のゲノム編集技術を活用して、BMP2 の下流で機能し、early-responsive 遺伝子の発現を制御する未知の転写因子の同定することを目指した。次に、細胞生物学的手法および分子生物学的アプローチを駆使して、軟骨細胞の分化過程における、同定された転写因子の機能的役割を明らかにすることを目的とした。さらに、同定された転写因子の生体における機能を明らかにするために、当該遺伝子のノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。究極的には、軟骨細胞分化過程における、BMP2 を中心とした転写ネットワークシステムの理解を深めることを目指して研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) BMP2 誘導性 early-responsive の発現を制御する転写因子のクローニング方法アルシアンブルー染色、アリザリンレッド解析、軟骨細胞分化マーカーの発現

One-hybrid 法などの転写因子クローニング法が開発されてきたが、特定の遺伝子の発現制御に関わる転写因子の同定は、困難とされてきた。特に、同定する転写因子の cis エレメントが不明な場合は、その同定は不可能であると考えられている。最近、この従来の概念を大きく展開させる方法として注目されている、ゲノム編集技術を応用した遺伝子特異的クロマチン免疫沈降法を基盤にして、遺伝子クローニングを行った。

下図に示すように、切断活性を欠失するも DNA 結合能を保持する Cas9 と、BMP2 誘導性遺伝子のプロモーター領域に相当するガイド RNA を、BMP2 を添加あるいは非添加した未分化細胞株 C3H10T1/2 にレトロウイルスを用いて遺伝子導入した。その後、抗 Flag 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、BMP2 誘導性遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質を質量分析にて解析した。質量分析法を行う前処理として、SILAC 法およびショットガン法の両者を並行して実施した。



(2) BMP2 誘導性 early-responsive の発現を制御する転写因子の発現検討

whole mount in situ ハイブリダイゼーション法にてマウスにおける同定された転写因子の発現パターンを解析した。また胎生 14.5 日齢のマウスより軟骨組織を含む各種臓器あるいは組織を採取し、RT-qPCR 法によりその発現分布を解析した。次に、軟骨分化過程における発現機構を検討するために、ウエスタンブロッティングならびに RT-qPCR を実施した。

(3) BMP2 誘導性 early-responsive の発現

を制御する転写因子の *in vitro* における機能解析

同定された転写因子のレトロウイルスあるいはレンチウイルスを作製し、C3H10T1/2細胞あるいは ATDC5 細胞にて過剰発現実験を行い、軟骨細胞分化に対する効果をアルシアンブルー染色、アリザリンレッド染色、軟骨細胞分化マーカーの発現を検索した。

同定された転写因子に対する shRNA を設計し、レトロウイルスに組み込み、C3H10T1/2 細胞に導入した。ノックダウン効果は、当該遺伝子の発現にて確認した。BMP2 誘導性の軟骨細胞に対する効果は、アルシアンブルー染色、アリザリンレッド染色、軟骨細胞分化マーカーの発現の抑制を指標に検索した。

同定された転写因子の分子機能を明らかにするために、クロマチン免疫沈降法およびルシフェラーゼレポーターアッセイ法を実施した。

(4) BMP2 誘導性 early-responsive の発現を制御する転写因子の *in vivo* における機能解析

同定された転写因子の生体における役割解析するために、Cas9 ゲノム編集法を用いて、当該遺伝子のノックアウトマウスの作製を行った。ノックアウトマウスの作製にあたっては、2箇所あるいは4箇所のガイド RNA を設計し、効率的にゲノム編集を行えるようにした。また受精卵への Cas9 タンパク質およびガイド RNA の導入は、マイクロインジェクション法ならびにエレクトロポレーション法にて実施した。

4. 研究成果

(1) BMP2 誘導性 early-responsive の発現を制御する転写因子の同定

BMP2 誘導性 early-responsive 遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質のデータを SILAC 法ならびにショットガン法で得たデータを比較し、目的とする転写因子、BMP-responsive transcription factor (BRTF) を同定した。

(2) BMP2 誘導性 early-responsive の発現を制御する転写因子の発現

E11 日齢のマウスを用いて、whole mount *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、2型コラーゲンならびに Sox9 が発現する肢芽領域に特異的に BRTF が発現することが示された。マウスの組織を用いた RT-qPCR 解析においても軟骨組織における BRTF の発現を確認した。

次に C3H10T1/2 細胞に BMP2 を添加し、軟骨細胞への分化を誘導した際に、その発現を検討した結果、RT-qPCR では変化を認めなかった。一方、ウエスタンブロッティング法にて解析したところ、BMP2 非存在下では BRTF の発現を認めなかったものの、BMP2

添加によりその有意な発現を認めた。したがって、BRTF の BMP2 による発現上昇は、mRNA レベルでなく、タンパク質レベルでの発現変動であることが見出された。そこで、ユビキチン-プロテアソーム経路の関与が推定されたので、プロテアソーム阻害剤を添加すると、BRTF のタンパク質の発現が観察できた。さらに、BRTF は BMP2 の非存在下では、ユビキチン化されていることも示された。以上の実験結果より、BMP2 は、BRTF のユビキチン化を阻害することにより、当該タンパク質を安定化させ、その発現を増加させる機序が想定された。

(3) BMP2 誘導性 early-responsive の発現を制御する転写因子の機能解析

BRTF を C3H10T1/2 細胞に過剰発現させると、軟骨細胞分化が軽度ながら促進された。
□ shRNA を用いて、BRTF をノックダウンすると、BMP2 誘導性の軟骨細胞分化が抑制された。

BRTF を過剰発現させると、BMP2 誘導性 early-responsive の遺伝子発現を誘導した。

BMP2 誘導性 early-responsive 遺伝子を付与したルシフェラーゼコンストラクトを導入した C3H10T1/2 細胞において、BRTF を過剰発現すると、ルシフェラーゼ活性が有意に上昇することが明らかとなった。

□ C3H10T1/2 細胞に BMP2 を添加すると、BRTF が、BMP2 誘導性 early-responsive 遺伝子のプロモーター領域に直接的に結合することがクロマチン免疫実験法により見出された。

(4) BMP2 誘導性 early-responsive の発現を制御する転写因子の *in vivo* における機能解析

Cas9 ゲノム編集法を用いて、BRTF 遺伝子ノックアウトマウスの作製を行った。4日所のガイド RNA を同時に用いた場合には、マイクロインジェクション法でもエレクトロポレーション法にて産仔を得ることはできなかった。この原因としては、4箇所のガイド RNA を用いたことにより、すべての受精卵で BRTF の両アリルが切断され、ホモ遺伝子欠損となり、胎生致死となった可能性が推測された。

そこで、用いるガイド RNA を2箇所に変更したところ、産仔が得られた。これらの産仔を PCR にてゲノタイピングを実施したところ、この内の多くがヘテロ遺伝子欠損マウスであった。この遺伝子変異が伝達されるか否かを検証するために、PCR 解析にて陽性であった F0 マウスと野生型 C57BL/J マウスを交配し、F1 マウスを得た。F1 マウスのテールを採取し、PCR にてゲノタイピングすると、germ transmission されていることが確認できた。得られた F1 ヘテロ遺伝子マウス同士を交配し、ホモ遺伝子欠損マウスの獲得を試みた結果、生下時に死亡するマウスが認めら

れた。このマウスをゲノタイピングすると、ホモ遺伝子欠損マウスであることが確認された。このマウスは、野生型マウスあるいはヘテロ遺伝子欠損マウスに比較して、明確な dwarf 様病態を示していた。

これらの in vivo の解析により、BRTF は骨格形成、特に軟骨形成過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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, Takahata Y, Murakami T, Nakamura E, Yagi H. Regulation of cartilage development and diseases by transcription factors. (2017) J Bone Metab 24(3): 147-153 DOI: 10.11005/jbm.2017.24.3.147 査読あり

(2) Nishimura R, Hata K, Nakamura E, Murakami T, Takahata Y. Transcriptional network systems in cartilage development and disease. (2018) Histochem Cell Biol 149(4): 353-363 DOI: 10.1007/s00418-017-1628-7. 査読あり

(3) 西村 理行、波多 賢二、中村 恵理子 . (2018) 軟骨の発生と恒常性維持機構のメカニズム Clinical Calcium 28: 353-359 査読なし

[学会発表] (計 2 件)

(1) Riko Nishimura. Regulation of endochondral ossification by transcription factors and diseases. 5th Seoul Symposium on Bone Health & 29th Spring Scientific Congress of Korean Society for Bone and Mineral Research. 2017年5月19日. Sejong University Convention Center (ソウル・韓国)

(2) 西村 理行 . 関節軟骨の生体恒常性の維持および破綻機構の統合的理解に基づく革新的医療技術の開発. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会シンポジウム 2017年9月18日. 松本歯科大学 (松本市・長野県)

[図書] (計 0 件)

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

(4) 研究協力者

高畑 佳史 (TAKAHATA YOSHIFUMI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 60635845