

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19744

研究課題名(和文)ゲノムワイドアプローチによる骨再生用細胞遊走因子の同定と応用に関する探索的研究

研究課題名(英文) Identification of regulatory factors contributing to migration or recruitment of osteoblast progenitors by genome-wide approach and the application for bone repair

研究代表者

高戸 毅 (Takato, Tsuyoshi)

東京大学・医学部附属病院・名誉教授

研究者番号：90171454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨修復過程における骨芽細胞前駆細胞の遊走・補充の制御因子を同定し、それを活性化させる化合物を用いることで、最小限の介入による骨再生医療の確立を目指した。エピゲノムプロファイルと遺伝子発現プロファイルおよび遺伝子オントロジーデータセットの統合解析を行い、有望因子を絞り込んだ。さらに、有望因子の転写制御領域を同定し、本領域を組み込んだレポーターアッセイによる化合物スクリーニングを行った。その結果、骨芽細胞前駆細胞の遊走・補充を活性化させる化合物候補が見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨組織修復過程において、骨格系前駆細胞を骨修復部位に積極的に動員させるための制御因子はほとんど分かっていませんでした。本研究では、その制御因子とその因子の発現を高める化合物の同定を目指しました。将来的に本研究がさらに進めば、骨修復を早める治療薬の開発に寄与する可能性を秘めています。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a therapeutic strategy of bone regeneration by minimal intervention, this study aimed at identification of regulatory factors which contribute to migration or recruitment of osteoblast progenitors in bone repair processes. By integrating epigenetic profile, gene expression profile and gene ontology database, we obtained a set of candidate genes that may regulate migration or recruitment of osteoblast progenitors. We further identified gene regulatory elements of a candidate gene and used the element in reporter assay for drug screening. Through these analysis, we obtained candidates of small compound which may enhance migration or recruitment of osteoblast progenitors.

研究分野：骨再生

キーワード：細胞遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な原因で生ずる組織欠損に対する治療は焦点の課題であり、その治療法として組織再生療法が注目を浴びて久しい。組織再生療法とはホストの自然治癒能力を効率的に引き出すアプローチであると位置づけられる。口腔外科領域においては、歯周疾患や炎症・外傷により破壊された歯槽骨の再建が大きな治療ニーズである。研究代表者らは、効率的な骨再生法の開発を目指して、基礎研究と応用研究を両輪として研究開発を進めてきた。以下の通り、骨格形成に関する基礎的知見に基づいて同定された遺伝子や低分子化合物を用いることで、細胞を移植することなく骨再生を誘導できるプラットフォームが開発された。

1. ヘッジホッグシグナル、bone morphogenetic protein (BMP) シグナルによる骨格系細胞運命決定と分化機構の解析：マウス遺伝学と分子生物学的手法を用いて、上記二つのシグナルが骨格形成の一連の過程において、細胞運命決定とそのあとの分化促進に段階的に作用することを明らかにした (Ohba et al. *Dev Cell*, 2008; Hojo et al. *J Biol Chem*, 2012; *J Biol Chem*, 2013)。

2. 骨形成性遺伝子・低分子化合物による骨再生法：骨形成性シグナルの最適化を通じて、BMP受容体 IB と転写因子 Runx2 の過剰発現により、線維芽細胞から骨形成性細胞への direct reprogramming が可能であることを世界に先駆けて見出した (FASEB J, 2007)。さらに、高分子ナノミセルによる遺伝子送達、mRNA 送達が骨格組織再生・修復を誘導できることを報告した (Itaka, Ohba et al. *Mol Ther*, 2007; Aini et al. *Sci Rep*, 2016)。また、骨芽細胞の後期分化を促進する低分子化合物を同定し (Ohba et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007)、この化合物をリン酸カルシウム人工骨に搭載させることで骨形成性薬剤溶出型人工骨を開発した (Maeda, Hojo et al. *Biomaterials*, 2013)。

研究代表者らは、組織修復過程における最も重要なイベントを、分子レベルで特異的にコントロールできれば、最小限の介入で生体の自然治癒能力を最大化し、骨再生効率を飛躍的に高めることが可能となると考えた。前述の通り、これまでの研究により、発生過程における骨格系細胞の運命決定や細胞分化機構の理解が進み、組織修復部位の局所において骨格系細胞の分化を制御できる可能性が示唆されてきた。そこで本研究では、これまでその制御方法が十分に理解されていなかった、骨修復過程における「骨芽細胞前駆細胞の遊走・補充」に焦点を絞り、その制御因子の同定と、それを活性化する基盤技術の開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究では、骨修復過程における「骨芽細胞前駆細胞の遊走・補充」のマスター制御因子を同定し、それを活性化する方法を検討することで、最小限の介入による骨再生医療 (bone regeneration by minimal intervention) の基盤技術の開発を目指すこととした。具体的には以下の2点を目的とした：

(1) ゲノムワイドアプローチによる骨芽細胞前駆細胞の遊走・補充促進因子の同定

骨発生過程において転写制御因子 Sp7/Osterix 陽性の骨芽細胞前駆細胞は遊走能を有し、骨髄形成に寄与することから、Sp7 標的遺伝子が細胞遊走に関与すると考えられた。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて取得したビッグデータとバイオインフォマティクス解析を駆使して、骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の同定を目指した。

(2) エピゲノムデータ、遺伝子発現データに基づく、骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の発現を誘導する生理活性物質の同定と骨再生効果の検証

ゲノムワイドなエピゲノムプロファイルの取得とその解析を通して、(1)で同定した骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の転写制御領域 (エンハンサー領域) の同定を目指した。さらに候補エンハンサー領域を用いた細胞センサーを作製し、低分子化合物ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングを行うことで、骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の発現を誘導する生理活性物質の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) ゲノムワイドアプローチによる骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の同定

Sp7 標的遺伝子の同定のため、研究代表者らが以前取得した骨芽細胞における Sp7 ChIP-seq データと Sp7 陽性骨芽細胞における RNA-seq データ (Hojo, Ohba et al. *Dev Cell*, 2016) を活用した。Sp7 ゲノム結合領域から標的遺伝子の推定には GREAT: Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool を用いた。得られた有望遺伝子に対する機能喪失実験には、Crispr/Cas9 システムを用いた。具体的には、標的遺伝子の第一エクソン周辺にガイド RNA を設計し、ガイド RNA オリゴ DNA をレンチウイルス型の Cas9-ガイド RNA カセットベクターに組み込んだ。本ウイルスベクターを 293T 細胞に導入し、ウイルスを産生させた後、骨芽細胞株 MC3T3E1 に感染させた。薬剤セレクションの後、サンガーシーケンシングおよび RT-qPCR により、標的ゲノム領域の欠失と遺伝子発現の減少を確認した。細胞遊走アッセイには、2D Gap Closure アッセイ法および Boyden Chamber アッセイ法を用いた。

(2) エピゲノムデータに基づく、骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の発現を誘導する生理活性物質の同定と骨再生効果の検証

骨芽細胞におけるエピゲノム情報を得るため、オープンクロマチン領域を同定する ATAC-seq

(an assay for transposase-accessible chromatin using sequencing; Buenrostro JD et al., *Nat Methods* 2013) を行った。既報のプロトコール通り実験を行い、ライブラリーを作製した後、illumina社の次世代シーケンサー (HiSeq) で DNA 配列を取得した。得られたデータを基に、東大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を行った。ゲノム配列のマッピングには bowtie, ピークコーリングには Cisgenome のパッケージを利用した。次に、(1) で同定した骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進遺伝子候補の周囲 100 kb にわたって、この遺伝子の転写活性化に関わるエンハンサー候補領域を検索した。エンハンサー候補の転写活性化の確認のため、候補エンハンサー領域とプロモーター領域の下流にルシフェラーゼをつなげたレポーター DNA を作製した。エンハンサー領域欠損マウスの作出のため、エンハンサーの両端にガイド RNA を設計し、CRISPR/Cas9 システムを用いた。有望エンハンサーに対しては、上記ルシフェラーゼレポーター遺伝子を骨格系細胞に導入した後、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) ゲノムワイドアプローチによる骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の同定

骨芽細胞前駆細胞における Sp7 ゲノム結合領域プロファイルを ChIP-seq 解析により、Sp7 陽性骨芽細胞前駆細胞の転写産物プロファイル RNA-seq 解析により取得し、遺伝子オントロジーデータベースとの統合解析を行った。細胞遊走に関連する遺伝子オントロジーリスト、Sp7 の標的遺伝子候補および、骨芽細胞において高発現 (FPKM5 以上) 遺伝子リストを統合し、その全てを満たす遺伝子群を同定した (図 1)。さらに、創薬への展開を想定し、本遺伝子リストの中から、シグナルパスウェイのリガンド、受容体、転写因子を抽出し、さらに文献検索から有望な候補を絞り込んだ。

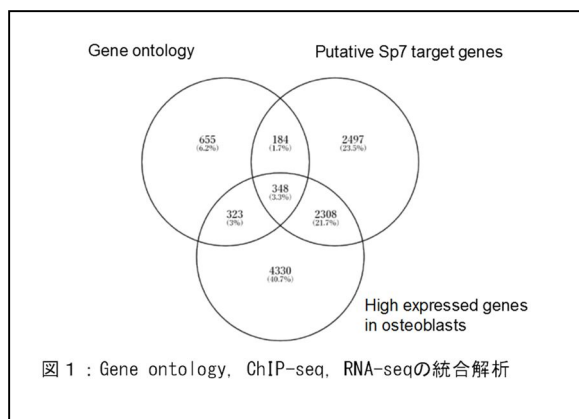


図 1 : Gene ontology, ChIP-seq, RNA-seqの統合解析

同定した候補の中で、シグナル関連因子に関しては、既にそのリガンドが組み換えタンパク質として入手可能であったため、細胞遊走への関与を検討した。転写因子に関しては、Crispr 法を用いた機能喪失実験を検討したものの、ゲノム編集効率は低く、遺伝子発現の減少も十分でなかった。そのため、クローニングすることで、遺伝子欠損細胞のみを選別し実験を行うこととした。現在その準備を進めている。

(2) エピゲノムデータに基づく、骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の発現を誘導する生理活性物質の同定と骨再生効果の検証

Sp7 陽性骨芽細胞において ATAC-seq 解析を行い、骨芽細胞において、ゲノムワイドな転写制御領域を同定した。次に(1)で同定した骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進候補遺伝子の転写制御領域の同定を検討した。候補遺伝子の周囲 100 kb にわたって、上記エピゲノムマーカーの分布を指標に、骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進候補遺伝子の転写活性化に関わるエンハンサー候補領域を検索した (図 2)。得られた候補領域に対して、その DNA 領域とルシフェラーゼ遺伝子を有するレポーター遺伝子を合成し、骨格系細胞に導入した。その結果、線維芽細胞に比較して、骨格系細胞において高い転写活性化を有していることが確認された。同定したエンハンサー候補領域の in vivo 骨形成に対する効果を検証するため、エンハンサーノックアウトマウスの作製に着手した。

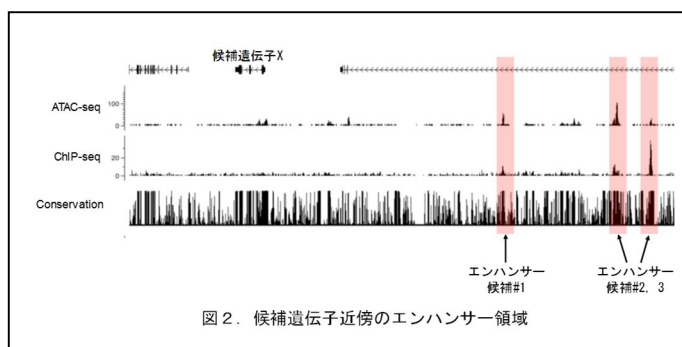


図 2. 候補遺伝子近傍のエンハンサー領域

次に、候補遺伝子の転写を誘導する低分子化合物を同定するため、上記ルシフェラーゼレポーター遺伝子を骨格系細胞に導入して化合物スクリーニングを検討した。レポーター細胞を 96 well プレートに播種し、観察することで、有望な低分子化合物の同定を目指した。化合物の毒性により細胞が死滅した場合は、化合物濃度を 10 分の 1 に希釈し同様の実験を行うこととした。これまでの解析の結果、レポーターを活性化させる化合物が複数見つかり、現在その検証実験を開始している。

以上、本研究では、ゲノムワイドなアプローチにより、骨芽細胞前駆細胞遊走・補充促進因子の候補因子を複数同定し、その一部についてその転写制御領域の同定と薬剤スクリーニングの検討を行い、有望な化合物を複数見出した。今後、さらなる解析により有望な化合物を選別し、in vivo 骨再生における検証に進みたい。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Komura Makoto, Komura Hiroko, Ishimaru Tetsuya, Konishi Kenichiro, Komuro Hiroaki, Hoshi Kazuto, Takato Tsuyoshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Tracheal cartilage growth promotion by intra-tracheal administration of basic FGF	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 33~41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-019-04576-0	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 Okubo Ryuji, Asawa Yukiyo, Watanabe Makoto, Nagata Satoru, Nio Masaki, Takato Tsuyoshi, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 11
2. 論文標題 Proliferation medium in three-dimensional culture of auricular chondrocytes promotes effective cartilage regeneration in?vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 306~315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.10.002	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 Sugiyama M, Nakatsuka T, Saijo H, Fujihara Y, Kanno Y, Hikita A, Takato T, Hoshi K	4. 巻 29
2. 論文標題 Clinical findings of a cantilever iliac bone graft for secondary correction of cleft lip-nose deformities	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Craniofac Surg	6. 最初と最後の頁 741-746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.0000000000004070	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 Mashiko T, Takada H, Wu SH, Kanayama K, Feng J, Tashiro K, Asahi R, Sunaga A, Hoshi K, Kurisaki A, Takato T, Yoshimura K	4. 巻 12
2. 論文標題 Therapeutic effects of a recombinant human collagen peptide bioscaffold with human adipose-derived stem cells on impaired wound healing after radiotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Tissue Eng Regen Med	6. 最初と最後の頁 1186-1194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/term.2647	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 Inaki R, Fujihara Y, Kudo A, Misawa M, Hikita A, Takato T, Hoshi K	4. 巻 8
2. 論文標題 Periostin contributes to the maturation and shape retention of tissue-engineered cartilage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 11210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29228-6	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 Kanke K, Abe T, Abe M, Mori Y, Hoshi K, Takato T	4. 巻 24
2. 論文標題 In-hospital surgical treatment for haemorrhage after aesthetic mandibular osteotomy performed as an office-based day surgery: A case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ann Med Surg (Lond)	6. 最初と最後の頁 15-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1016/j.amsu.2017.10.001	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 Fujii Y, Kawase-Koga Y, Hojo H, Yano F, Sato M, Chung UI, Ohba S, Chikazu D	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 Res Ther	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) org/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 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kazuto Hoshi
2. 発表標題 Tissue-engineered autologous cartilage for cleft lip-nose patients
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuto Hoshi
2. 発表標題 Three-dimensional tissue-engineered cartilage for the secondary repair of cleft lip-nose deformity
3. 学会等名 13th Asian Congress of Oral & Maxillofacial Surgery TAIPEI 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柏木美樹, 安部貴大, 藤原夕子, 小笠原徹, 西條英人, 星 和人, 高戸 毅
2. 発表標題 成人ステイル病患者に生じた顎関節症状に対する1治療経験
3. 学会等名 第30回日本顎関節学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菅家康介, 杉山 円, 五十嵐正樹, 川上 大, 西條英人, 星 和人, 高戸 毅
2. 発表標題 頬部膨隆を呈した乳児期の歯原性粘液線維腫の一例
3. 学会等名 第62回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
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)	
研究分担者	星 和人 (Hoshi Kazuto) (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	北條 宏徳 (Hojo Hironori) (80788422)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授 (12601)	