

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21049

研究課題名（和文）次世代シーケンシングによるHmga2の骨形成制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the bone development mechanism of Hmga2 by next-generation sequencing

研究代表者

根岸 翼（Negishi, Tsubasa）

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：70963031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：構造的転写因子High mobility group A2（Hmga2）遺伝子は幹細胞や腫瘍細胞に発現する遺伝子として知られているが、Hmga2ノックアウト（KO）マウスでは骨と体脂肪の形成が著しく減少し、体躯が矮小化したピグミー表現型を示す。ヒトHmga2遺伝子の異常でも同様の症状を呈することから、Hmga2の骨形成への関与が予想されるが、その役割は全く不明である。本研究ではHmga2による骨芽細胞分化誘導機構に焦点を当て、RNA-seq・ChIP-seqといった次世代シーケンス技術を用いてHmga2の働きを網羅的に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会に突入した現在は骨代謝不調が原因となりQOLが低下するケースが急激に増加しており、骨形成制御機構を解明することは、骨折治療促進や骨再生療法確立に貢献するとともに、骨粗鬆症等の代謝性骨疾患の治療法開発にも極めて重要である。本研究により、Hmga2依存性の骨芽細胞分化関連遺伝子発現制御機構の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：An architectural transcription factor, high mobility group A2 (Hmga2), is known to be expressed in stem cells and tumor cells. Knock-outing Hmga2 gene causes a pygmy phenotype with bone growth reduction and fat hypo-formation in mice, and it appears consistent with human. Although these strongly suggest that Hmga2 plays an important role in bone development, studies on the molecular pathway are completely unknown. In this study, we focused on the mechanism of osteoblast differentiation by Hmga2, and comprehensively analyzed the functions of Hmga2 using next-generation sequencing technologies such as RNA-seq and ChIP-seq.

研究分野：生化学

キーワード：Hmga2 骨芽細胞分化 MC3T3-E1 RNA-seq ChIP-seq

1. 研究開始当初の背景

本研究で焦点を絞る構造的転写因子 Hmga2 は、胎生初期の未分化間葉細胞に特異的な転写因子として長期間みなされてきたが、最近の研究により、癌細胞の上皮-間葉移行や各種幹細胞の誘導と形質維持に働く因子として注目されている。Hmga2 ノックアウト (KO) マウスでは骨と体脂肪の形成が著しく減少し、体躯が矮小化したピグミー表現型を示す。ヒトにおいて Hmga2 の点突然変異や欠失は体躯や顎顔面骨の矮小化を招き、逆位による過剰発現は巨大化をきたす。Hmga2 遺伝子の異常は Silver-Russell 症候群や 12q18-microdeletion syndrome 等のヒト遺伝性疾患の原因であると言われ、未分化間葉細胞を介して骨芽細胞分化、および骨形成に重要な役割を果たすと予想されるが、その分子機構には曖昧な点が多く残る。

2. 研究の目的

これまでに申請者はマウス顔面骨における Hmga2 の影響と、MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化における Osterix、アルカリフォスファターゼ等の骨芽細胞分化関連遺伝子と Hmga2 の関与を示唆する結果を得ている。しかし、mRNA 発現をベースにする qRT-PCR や、タンパク質発現をベースにするウェスタンブロット等の解析手法では副次的な影響を含んでいる可能性があり、また対象も限定的である。

本研究は Hmga2 依存性の骨芽細胞分化メカニズムの詳細を RNA-seq・ChIP-seq といった次世代シーケンス技術を用いて網羅的に解析し、Hmga2 による骨形成制御機構を解明することを目指すとする。

3. 研究の方法

本研究課題は、Hmga2 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムで KO したマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 (Hmga2KO 細胞) とその野生型細胞を用いて実施する。骨芽細胞分化誘導は細胞播種後、通常培地 (MEM + 10%FBS + 1%PS) で 1 週間培養を行い、サブコンフルエントに達した時点を day0 とし、骨分化誘導培地 (通常培地 + 50 μ g/ml L-アスコルビン酸 + 10 mM β -グリセロフォスファターゼ) への交換を行う。

(1) Hmga2 標的遺伝子の同定

RNA-seq

骨芽細胞分化誘導 0、4、7 日後の細胞から RNA を抽出し、Hmga2KO による発現遺伝子変動を RNA-seq で網羅的に同定する。

ChIP-seq

骨芽細胞分化誘導 0、4 日後の細胞から DNA を抽出し、抗 Hmga2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行う。Hmga2 が直接的に結合している遺伝子プロモーター領域を ChIP-seq で網羅的に同定する。

上記 Hmga2 依存性遺伝子発現のデータと 遺伝子とプロモーターの距離的關係やリード数から標的遺伝子を抽出する。それらを階層的クラスター解析や Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析等で検討し、骨芽細胞分化に関連する Hmga2 標的遺伝子を候補化する。

(2) Hmga2 標的遺伝子発現の確認

上記で候補化された遺伝子の経時的発現をウェスタンブロットや ChIP、定量的 RT-PCR で測定し、Hmga2 との関連性を確認する。また関連性が確認できた標的遺伝子について、Hmga2KO 細胞の Hmga2 レスキュー時の挙動や、マウス組織染色等で多角的に解析する。

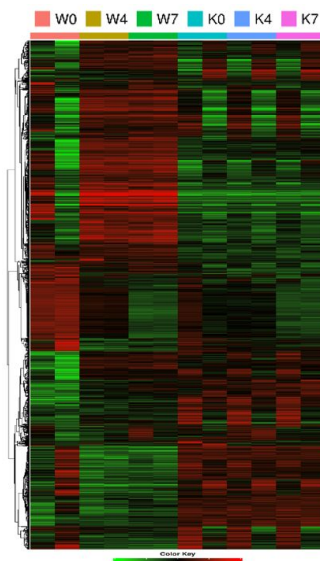
4. 研究成果

(1) Hmga2 標的遺伝子の同定

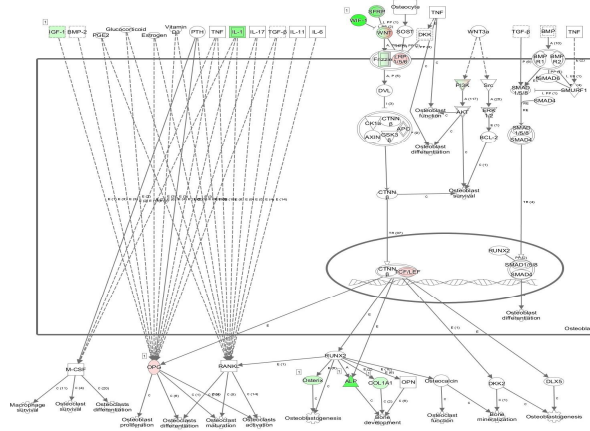
RNA-seq クラスター解析

リードカウントを edgeR をもちいて正規化し、一元配置分散分析と同様の方法を用いてサンプル間 (n=2, 6 区画) での変動が見られた 1,745 遺伝子を抽出し、クラスター解析を行った。Hmga2KO 細胞群と対照群間で大きく変動がみられる。対照群間においては day0 と day4・7 の変動が大きく、KO 群間においてはサンプル間の差異は多少みられるものの、時系列において変動はあまり確認できない (図 1)。対照群では day4 にて骨芽細胞分化誘導が起こり、細胞の遺伝子発現変動が起こったことに対し、KO 群では骨芽分化誘導がされず、細胞の形質をそのまま維持している結果と考えられる。

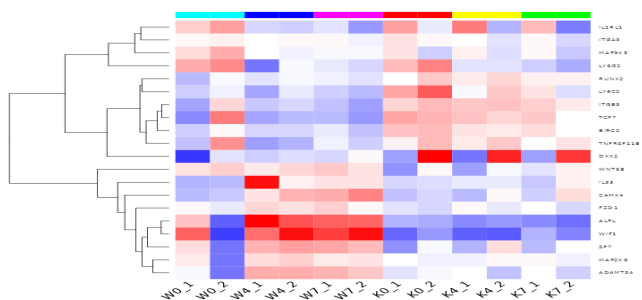
図 1 RNA-seq 結果のクラスター解析
W: 対照群, K: Hmga2KO 細胞群を示し、0, 4, 7 は骨芽分化誘導後のタイムポイントを表す。



各群間の同タイムポイントにおいて、ソフトウェア DESeq2 を用いて、リードカウントの値をもとに RLE 正規化を行い、サンプル間の発現量差 $[\log_2(\text{FoldChange})]$ を算出し、 $|\log_2\text{FC}| > 1$, $p\text{-value} < 0.05$ 条件で発現変動遺伝子 (DEG: Differentially expressed Gene) の抽出を行った。抽出結果を IPA にて解析したところ、骨芽細胞分化関連遺伝子のうち、Sp7、ALPL、Col1A1 などのほか、Wnt5b, Wif1 等 Wnt 関連遺伝子群に変動が多く確認された (図 2)。

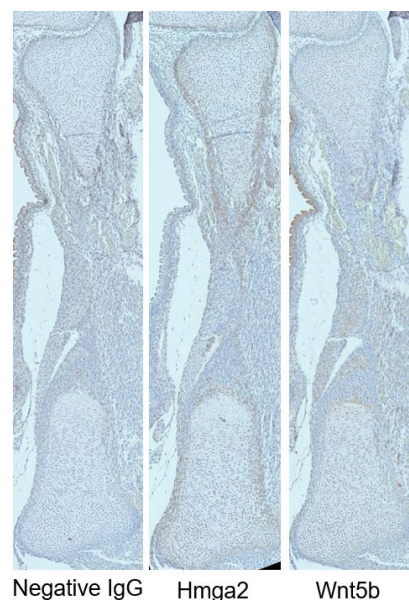
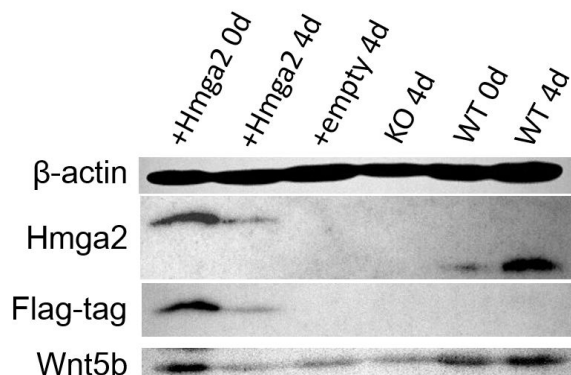


ChIP-seq



(2) Hmga2 標的遺伝子発現の確認

マウス免疫組織染色において、Hmga2 はマウス脛骨の骨膜部、骨端部に局在がみられ、Wnt5b は肥大軟骨細胞層から石灰化部辺縁にて局在がみられる。骨膜と石灰化部辺縁の接触部にて Hmga2 と Wnt5b の重複が確認でき、関与の可能性が示唆される。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 根岸翼、美原希美、今井一志
2 . 発表標題 High mobility group AT-hook 2によるマウス顔面骨形成 および骨芽細胞分化の制御
3 . 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4 . 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------