

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23689079

研究課題名(和文) クロマチン免疫沈降シーケンス法と遺伝学的手法による骨形成性転写ネットワークの解明

研究課題名(英文) Identification of osteogenic transcriptional networks by chromatin immunoprecipitation sequencing and genetic approaches

研究代表者

大庭 伸介 (Ohba, Shinsuke)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20466733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨形成過程において必須の転写制御因子が前駆細胞の分化を制御する分子メカニズムを明らかにすることを目指している。マウス初代骨芽細胞・軟骨細胞においてクロマチン免疫沈降シーケンシング(ChIP-seq)と発現プロファイリングを行い、各因子の結合領域とその標的遺伝子をゲノムワイドで明らかにした。バイオインフォマティクスによるデータ解析の結果、各因子の作動様式とその生物学的意義に関するゲノムワイドな知見を得た。これらの知見は、骨格形成を制御するメカニズムの理解へとつながり、骨格再生医療へと展開する基礎的知見となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to determine molecular mechanisms through which transcriptional regulators that are required for skeletal formation regulate differentiation of skeletal progenitors. Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) and expression profiling in mouse primary osteoblasts and chondrocytes identified binding regions and target genes of the regulators in a genome-wide manner. Bioinformatic analyses of the data set provided genome-wide evidences for modes of action of each factor and its biological significance. These findings may help us understand mechanisms underlying the regulation of skeletal formation and lead to basic knowledge to achieve skeletal regenerative medicine.

研究分野：骨軟骨生物学

キーワード：骨芽細胞 転写

1. 研究開始当初の背景

胎生期の骨芽細胞の形成は、ヘッジホッグ (Hedgehog-Hh) シグナルが Sox9 陽性の骨軟骨前駆細胞に作用し、転写因子 Runx2 陽性の骨芽細胞前駆細胞が形成されることで始まる。前駆細胞から骨芽細胞への分化 (骨芽細胞分化の中期から後期) においては、転写因子 Runx2、転写因子 Osterix (Osx) および Wnt/ β -catenin 経路が必須の因子である。Runx2 ノックアウト (KO) マウス、および Osx KO マウスにおいては骨形成が完全に消失する (Cell 89:755-64, 1997; Cell 108:17-29, 2002)。Wnt/ β -catenin 経路に関しては、 β -catenin の組織特異的 KO の解析から、Runx2・Osx 陽性の骨芽細胞前駆細胞の成熟と骨芽細胞への最終分化に必須とされている (Development 133:3231-44, 2006)。

一方、軟骨分化については、転写因子 Sox9 がマスターレギュレーターとして働き (J Bone Miner Metab 29:390-5, 2011) その後の肥大化には Runx2 が必須であることが分かっている (Genes Dev 18:952-63, 2004)。

Hh、Sox9、Runx2、Osx、Wnt/ β -catenin 経路は、骨格系における重要な役割が、reverse genetics と forward genetics の両面から立証されている数少ない因子であり、密接に関連しながら骨格系細胞分化を段階的に制御していると考えられる。しかし、実際に前駆細胞の分化を調節する際の標的遺伝子や、相互作用の機序に関しては未だ不明な点が多い。その解明には、網羅的かつ生理的状態を反映した解析と、系統的なデータ処理が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、骨形成の一連の過程において、必須の分化調節因子が分化を制御する分子メカニズムを明らかにするため、特に分化中期から後期に着目して、これらの因子と標的遺伝子群により形成される骨形成性転写ネットワークを解明することを目的としている。

Wnt/ β -catenin 経路については、下流の転写複合体の構成要素である β -catenin を解析対象とする。これらの因子の下流ではたらく新しい骨格形成性遺伝子や、前駆細胞特異的なマーカー遺伝子の転写制御メカニズム

の解明、発現・機能解析を通じて、一連の分子群が骨形成を制御するメカニズムを分子レベルから個体レベルに渡って明らかにし、骨格再生医療へと展開する基礎的知見を収集することが最終目標である。

3. 研究の方法

(1) Biotin-3xFLAG タグノックインマウスの作出

Biotin-3xFLAG 複合タグ (BioFL タグ) が骨形成調節因子の各遺伝子座 C 末に挿入されたノックインマウス 4 系統を、それぞれ作出する。このノックインマウスから細胞を採取し、タグを用いたクロマチン免疫沈降を行うことで、各標的タンパクの生理的な発現レベル・パターン・機能を保持したままで、特異的かつ効率的な ChIP-seq が可能となる。Biotin タグは、大腸菌のピオチンリガーゼ BirA により配列中のリジンがピオチン化される配列である。アビジンとの強力な結合を利用し、ピオチン化蛋白を特異的に精製できる利点を有する。3xFLAG タグについては、高性能な抗体が市販され、免疫沈降に広く使われている。

(2) 骨形成調節因子に対するクロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq)

BioFL ノックインマウス新生仔から骨芽細胞・軟骨細胞を採取し、骨形成調節因子に対する ChIP を行う。Solexa Genome Analyzer によるシーケンシングを行い、ChIP DNA の配列データを得る。クロマチン構造に基づいた転写活性化・抑制領域のプロファイリングを行うために、抗 H3K4me2・H3K4me3・H3K27ac・p300・RNA pol II・H3K27me3・H3K36me3 抗体を用いた ChIP-seq も行う。

(3) 遺伝子発現プロファイリング

野生型マウスより得た骨芽細胞・軟骨細胞から回収した mRNA をマイクロアレイ実験に供する。従来型 3' 末端発現アレイよりも正確な発現の全体像が得られる、全転写発現アレイシステムを用いる。

(4) データ処理

Eland software を用い、ChIP-seq より得られた ChIP DNA の配列データを、ゲノム上

へマッピングする。有意に取得された領域（ピーク）の検出は、Cis Genome software (Nat Biotech 26: 1290-300, 2008) 上で行う。各ピーク領域において転写因子モチーフの解析も行う(de novo モチーフ検索)。また、ChIP-seq より得られる結合領域・標的遺伝子候補リストとマイクロアレイより得られる発現変動遺伝子リストを比較し、各因子の結合領域と標的遺伝子のリストを作成する。さらに Gene ontology term も併用して、各因子の標的遺伝子とその機能及び転写を調節する領域(結合領域)が一元化されたリストを作成する。

(5) in vitro 及び in vivo による検証

ChIP-seq より明らかとなった転写調節領域をレポーター遺伝子に接続させたトランスジェニックマウスを作成し、レポーター活性を解析することにより、その領域の生体における機能を検証する。また、ゲルシフトアッセイや in vitro におけるルシフェラーゼアッセイも併用し、転写調節領域への各因子の結合の直接性・結合力の程度や、変異体を用いた結合の特異性の検証・結合領域の絞り込みを行う。de novo モチーフ検索から、協働因子の存在が示唆された場合は、共免疫沈降による蛋白相互作用の検出も行う。また、in situ hybridization 及び免疫染色による骨組織における発現解析と、分子生物学的・遺伝学的手法を用いた in vitro および in vivo による機能解析も併用する。

4. 研究成果

(1) Biotin-3xFLAG タグノックインマウスの作出

マウス胚性幹細胞(ES細胞)における遺伝子ターゲティング法により、Runx2, Osx, β -catenin (Ctnnb1)の各遺伝子座 C 末に BioFL タグが挿入されたノックインマウス 3 系統をそれぞれ作出した(未発表)。ノックインアレルからの遺伝子発現が正常レベルであり、タグ化された各因子は正常に機能することを確認した。したがって、Runx2, Osx, β -catenin に関しては、BioFL タグを用いた ChIP-seq を行うこととした。一方、Sox9 に関しては、ノックイン ES 細胞の樹立に成功したものの、germline transmission が認め

られなかったため、マウス系統の樹立まで進まなかった。しかし、ChIP に使用可能な抗 Sox9 抗体が市販されていたため、こちらを使用して ChIP-seq を行うこととした。

(2) 骨形成調節因子に対する ChIP-seq

Sox9 に関しては、野生型マウス新生仔の肋軟骨・鼻中隔軟骨より採取した初代軟骨細胞において、抗 Sox9 抗体を用いた ChIP-seq を行った。

Runx2 に関しては、(1)で樹立した Runx2-BioFL ノックインマウス新生仔の頭蓋骨より採取した初代骨芽細胞、及び肋軟骨より採取した初代軟骨細胞に対して、抗 FLAG 抗体及びストレプトアビジンビーズを用いた ChIP-seq を行った。

Osx 及び β -catenin に関しては、それぞれ Osx-BioFL、Ctnnb1-BioFL ノックインマウス新生仔の頭蓋骨より採取した初代骨芽細胞において、抗 FLAG 抗体及びストレプトアビジンビーズを用いて ChIP-seq を行った。

また、軟骨細胞においては H3K4me2・H3K4me3・H3K27ac・p300・RNA pol II・H3K27me3・H3K36me3 に対する ChIP-seq を、骨芽細胞においては、H3K4me2・H3K4me3・RNA pol II に対する ChIP-seq を行った。各データの詳細は、下記(4)のデータ解析の項で述べる。

(3) 遺伝子発現プロファイリング

上記(2)と同様に採取した、初代軟骨細胞及び骨芽細胞において、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。データの詳細は、下記(4)のデータ解析の項で述べる。

(4) データ処理及び in vitro 及び in vivo による検証

Sox9

抗 Sox9 抗体を用いた ChIP-seq より、軟骨細胞における Sox9 の結合領域 27,656 箇所を同定した。このうち、転写開始点近傍に存在するものをクラス I、転写開始点から離れて存在するものをクラス II とした。

クラス I 領域では、Sox9 と H3H4me3・RNA ポリメラーゼ II・p300 それぞれの ChIP-seq シグナルの相関が認められ、Sox モチーフのエンリッチメントが認められないことから、Sox9 の転写開始点近傍への結合は直接的な

ものではなく、蛋白 - 蛋白相互作用を介したものであると示唆された。また、クラス I 領域の近傍には細胞の基礎活動に關与する遺伝子が有意に存在し、Sox9 の ChIP-seq シグナル強度はそれらの遺伝子の発現量を反映していた。

一方、クラス II 領域は軟骨關連遺伝子周辺に認められ、H3K4me2 や H3K27ac といった活性型エンハンサーのヒストン修飾を伴っていた。ゼブラフィッシュを用いたトランスジェニックレポーターアッセイにおいて、クラス II 領域は軟骨特異的なエンハンサー活性を示した。クラス II 領域においては Sox ダイマーモチーフのエンリッチメントが認められたが、その配列のバリエーションが大きかった。軟骨關連遺伝子周辺で認める複数の Sox9 結合によるクラスター形成、及びゲルシフトアッセイの結果から、Sox9 は準最適モチーフを介して複数のエンハンサー領域へ結合することで、軟骨關連遺伝子の発現を高レベルで維持していることが示唆された。

四肢体幹の軟骨は中胚葉に由来する一方、頭頸部の軟骨細胞は外胚葉を起源とする神経堤細胞に由来する。由来の違いによる Sox9 の転写プログラムを検証するために、マウス胎仔鼻中隔軟骨より採取した軟骨細胞においても、Sox9 に対する ChIP-seq と発現プロファイリングを行い、肋軟骨のデータと比較した。軟骨細胞における Sox9 プログラムは由来によらずほぼ同一であったが、少数の領域における結合の違いを認め、これらの領域は各系統に特徴的な遺伝子と關連していた。

以上の研究成果については、Cell Reports 誌への掲載が確定している (5. 雑誌論文 1、2015 年 6 月 9 日現在 出版日未定)。

Sox ダイマーモチーフのみならず AP-1 モチーフもクラス II 領域に有意に存在していたことから、Sox9 と AP-1 の協調作用が示唆された。そこで、軟骨細胞において発現が認められる cJun に対する ChIP-seq も行った。すると、Sox9 の結合領域の多くが cJun の結合領域と重複しており、重複領域近傍には軟骨關連遺伝子が有意に存在した。Sox9 と AP-1 の相互作用が軟骨細胞分化に与える影響に關しても新たな知見が得られた (投稿準備中)。

Osx

BioFL タグを用いた ChIP-seq により、骨芽細胞における Osx 結合領域約 3,000 箇所を同定した。Osx 結合領域は、その多くが転写開始点から 5 kb 以上離れた位置に存在し、骨芽細胞關連遺伝子との有意な相関を示した。また、結合領域における転写因子モチーフを検索すると、従来の報告のような GC-rich な Sp コンセンサス配列とは異なる、他の転写因子のモチーフのエンリッチメントを認めた。このモチーフを含む Osx 結合領域の骨芽細胞特異的なレポーター活性をトランスジェニックレポーターマウス及び *in vitro* レポーターアッセイで確認した。そのレポーター活性は Osx 及びモチーフ依存的であった。

以上より、骨芽細胞において Osx は他の転写因子と協働していることが示唆された。現在、その協働因子に關する解析も加え、論文投稿を準備している。

Runx2

BioFL タグを用いた ChIP-seq により、骨芽細胞における Runx2 結合領域約 5,000 箇所を同定した。約 15%が転写開始点近傍 (+/- 5 kb 以内) に、約 70%が転写開始点から 5 kb 以上離れた位置に存在していた。Runx2 結合領域は骨芽細胞關連遺伝子との有意な相関を示した。

Runx2 は軟骨細胞の肥大化に必須の因子であることから、軟骨細胞における Runx2 プログラムの検証も行った。肋軟骨由来軟骨細胞において、BioFL タグを用いた ChIP-seq を行い、Runx2 結合領域約 4,000 箇所を同定した。骨芽細胞における Runx2 結合領域と比較した結果、軟骨細胞特異的 Runx2 結合領域 (約 2,300 領域)、骨芽細胞特異的 Runx2 結合領域 (約 3,500 領域)、軟骨・骨芽細胞共通 Runx2 結合領域 (約 1,400 領域) を同定した。それぞれにおいて、約 50%前後の Runx2 結合領域で Runx モチーフのエンリッチメントを認めた。また、軟骨細胞特異的領域は軟骨細胞關連遺伝子と、骨芽細胞特異的領域は骨芽細胞關連遺伝子と關連していた。これらの細胞特異的な遺伝子との相関は、ChIP-seq シグナルが強い領域 (上位 500 領域) において、顕著であった。一方、共通領域は、細胞の基礎活動に關連する遺伝子と關連していた。以上より、骨格形成において、Runx2 は骨格系細胞に共通の基礎活動を担う遺伝子の転写を制御す

るほか、骨芽細胞・軟骨細胞特異的な遺伝子の転写に関与することが示唆された。引き続き、骨芽細胞と軟骨細胞における Runx2 の機能の共通点と相違点に着目した解析を進めている。

-catenin

BioFL タグを用いた ChIP-seq により、骨芽細胞における -catenin 結合領域約 1,200 箇所を同定した。Runx2 や Osx の結合領域と比較すると、-catenin 結合領域のうち、約 80% が -catenin に特異的な結合であり、残りは Runx2 と Osx の両方、あるいはどちらかと重複していた。また、-catenin 結合領域では -catenin と協働する転写因子である Tcf の結合モチーフのエンリッチメントを認めた。-catenin の ChIP-seq データの品質は、他の因子のものとは比較すると高くないため、その改善方法を含めて現在検討している。具体的には、研究代表者らが開発した ES 細胞の骨芽細胞分化系 (5. 雑誌論文 3) を用いることで、Ctnnb1-BioFL ES 細胞において ChIP-seq を行い、解析細胞数を増やすことを試みている。

Hh

本研究の目的である骨形成性転写ネットワークの同定のために、上記までの骨形成調節因子に関する ChIP-seq 解析に加え、Runx2 陽性の骨芽細胞前駆細胞形成に必須の因子である Hh シグナル (1. 背景参照) の作用に関する遺伝学的・分子生物学的検討を行なった。その結果、Hh シグナルの下流では転写因子 Gli1 が Gli2 及び Gli3 と協調することで、骨軟骨前駆細胞から骨芽細胞前駆細胞・軟骨細胞への運命決定に関わることが示された (5. 雑誌論文 4,5)。また、Gli1 は成人の骨量維持や骨折治癒にも関わることも見出した (5. 雑誌論文 2)

まとめ

以上一連の解析により、Hh シグナルによる骨芽細胞・軟骨細胞への運命決定とそれに引き続いて形成される転写ネットワーク (骨芽細胞: Runx2, Osx, Wnt/ -catenin 経路; 軟骨細胞: Sox9, Runx2) の少なくとも一端を明らかにすることができたと考えている。一部進行中の研究や遂行における問題点が判

明した研究もあるものの、転写ネットワークの全容を明らかにすることを目指して、引き続き検討を続けていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Ohba S (corresponding author), He X, Hojo H, McMahon AP (corresponding author): Distinct transcriptional programs underlie Sox9 regulation of the mammalian chondrocyte. *Cell Rep* (掲載確定)
2. Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, Takato T, Chung UI, Ohba S (corresponding author): Gli1 haploinsufficiency leads to decreased bone mass with an uncoupling of bone metabolism in adult mice. *PLoS ONE* 9(10):e109597, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0109597.
3. Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S (corresponding author): Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports* 2:751-760, 2014 doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.016.
4. Hojo H (corresponding author), Ohba S (corresponding author), Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem* 288(14):9924-9932, 2013 doi: 10.1074/jbc.M112.409342.
5. Hojo H (corresponding author), Ohba S (corresponding author), Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 protein participates in the hedgehog-mediated

specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem* 287(21):17860-69, 2012
doi: 10.1074/jbc.M112.347716.

6. Yamamoto K, Hojo H, Koshima I, Chung UI, Ohba S (corresponding author): Famotidine suppresses osteogenic differentiation of tendon cells in vitro and pathological calcification of tendon in vivo. *J Orthop Res* 30(12):1958-1962, 2012
doi: 10.1002/jor.22146.
7. Ohba S (corresponding author), Hojo H, Chung UI: Bioactive factors for tissue regeneration: State of Art. *Muscles Ligaments Tendons J* 2(3):193-203, 2012
8. Ohba S, Hojo H, Chung UI: Current progress on tissue engineering of bone and cartilage. *Endocrinol Metab* 27(1):1-11, 2012

〔学会発表〕(計7件)

1. Ohba S: Identification of distinct modes of Sox9 action in chondrocytes. 4th International SOX Research Conference, 2014.9.11, Cleveland (OH)
2. 大庭伸介: 軟骨細胞ゲノムにおける Sox9 作動様式の解析. 第15回運動器科学研究会, 2014.9.5, ベルサール三田(東京)
3. 大庭伸介, Xinjun He, 鄭雄一, Andrew P. McMahon: Sox9による軟骨形成制御プログラムの同定. 第36回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-6, 神戸国際会議場(神戸)
4. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata H, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 Participates in the Indian Hedgehog-mediated Osteogenesis during Endochondral Ossification. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10.12-15, Minneapolis (MN)
5. Maeda Y, Ohba S, Hojo H, Shimohata N, Yano F, Yamamoto K, Hatano N, Takato T, Chung UI: Development of a Novel

Tetrapod-shaped Drug-eluting Artificial Bone. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10.12-15, Minneapolis (MN)

6. Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Osteo-chondrogenic Function of BMP is Directed Toward Osteogenesis by Hh-Gli1 in the Perichondrium. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10.12-15, Minneapolis (MN)
7. He X, Ohba S, McMahon AP: Understanding the Regulatory Networks in Chondrocyte Development. Cold Spring Harbor Asia Conferences Bone and Cartilage: from Development to Human Diseases, 2012.6.11-15, Suzhou (China)

〔図書〕(計1件)

1. 大庭伸介, 鄭雄一: 多能性幹細胞を使った骨再生, 再生医療叢書(日本再生医療学会監修)-6 骨格系(脇谷滋之, 鄭雄一編), 128-140, 朝倉書店, 東京, 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp/med/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大庭 伸介(OHBA, Shinsuke)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号: 2046673