

平成 30 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：2014～2017

課題番号：26713054

研究課題名(和文)ヘッジホッグシグナルによる骨格系細胞運命決定におけるエピゲノム・転写ダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of epigenome and transcription during the Hedgehog signaling-mediated specification of skeletal cells

研究代表者

大庭 伸介 (Ohba, Shinsuke)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：20466733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホッグ(Hedgehog-Hh)-Gli誘導性の骨形成性細胞への運命決定機構を、エピゲノム・転写ダイナミクス・遺伝子制御ネットワークの観点から理解することが本研究の目的である。マウス胚性幹細胞の骨芽細胞分化誘導系を用いて、Hh-Gli誘導性の運命決定期の細胞の同定と分子特性の解析を行い、この細胞集団におけるクロマチン免疫沈降-シーケンス(ChIP-seq)と遺伝子発現プロファイリングを通じて、Hh刺激による骨芽細胞への運命決定の背景にある分子メカニズムに関する知見を得た。これらは、Hhシグナルを骨再生療法の標的分子とする際に、有効性と安全性を保障する強力な分子基盤となる。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal of this project is to understand the mechanism underlying the Hedgehog (Hh)-Gli-mediated specification of progenitors into bone-forming osteoblasts, in terms of dynamics of epigenome, transcription, and gene regulatory networks. Cell populations being at the specification phase were identified in the osteoblast differentiation system of mouse embryonic stem cells, and molecular characteristics of the populations were determined. Findings on molecular mechanisms underlying the Hh-Gli-mediated osteoblast specification were obtained by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) and transcriptional profiling in the identified population. These findings will help us establish the genome-wide molecular basis of efficacy and safety of Hh signaling in bone regenerative therapies.

研究分野：骨軟骨生物学

キーワード：ヘッジホッグ 骨形成

1. 研究開始当初の背景

細胞運命の決定と細胞の分化・成熟は器官形成の根幹を成す。正常な骨形成過程においては、間葉系細胞の運命が「骨形成性細胞」へと規定され、転写因子 Runx2・Sp7 陽性の前駆細胞を経て骨芽細胞へと分化することで、骨形成が誘導される。申請者は、骨再生における適切な分化誘導刺激を明らかにすることを目指して、この一連の骨格形成過程の分子メカニズムの解明に一貫して取り組んできた。これらの知見を取り入れながら、骨格形成過程初期に起こる骨形成性細胞への運命決定に関しても検討を進めてきた。特に、ヘッジホッグ (Hedgehog-Hh) シグナルとその下流の転写因子 Gli の「抑制型と活性型の使い分け」に注目し、その役割を個体から組織・細胞レベルで明らかにしてきた。その結果、「Hh シグナルが骨形成性細胞への運命決定のマスター制御因子」であり、「Hh 入力応答性に転写因子 Gli の抑制型と活性型が協調的に遺伝子発現を制御」することで、軟骨細胞分化の抑制と骨芽細胞分化の促進を図り、骨形成性細胞への運命決定がなされることが示された (Long F, Ohba S et al. *Development*, 2004; Ohba S et al. *Dev Cell*, 2008; Hojo H, Ohba S et al. *J Biol Chem*, 2012; Hojo H, Ohba S et al. *J Biol Chem*, 2013)。さらに、「骨再生医療戦略としての Hh 誘導性運命決定機構の活用の proof of concept」を提示した (Maeda Y, Ohba S et al. *Biomaterials*, 2013)。しかし、その根底にある Gli の標的遺伝子・転写制御機構への包括的な理解には至っていない。これらの理解は、Hh シグナルを骨再生療法の標的分子とする際に、有効性と安全性を保障する強力な分子基盤となる。

以上より、Hh 応答性の「エピゲノム変化」と「抑制型 Gli から活性型 Gli へのスイッチング」というダイナミックな現象に着目し、Gli を中心とした遺伝子制御ネットワークをゲノムレベルで理解することが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

Hh-Gli 誘導性の骨形成性細胞への運命決定機構を、エピゲノム・転写ダイナミクス・遺伝子制御ネットワークの観点から理解することで、Hh シグナルを骨再生療法の標的分子とする際の有効性と安全性に関するゲノムワイドな分子基盤を確立することが本研究の目的である。本目的を達成するため、

Hh-Gli 誘導性の運命決定期の細胞集団においてクロマチン免疫沈降 - シークエンス (ChIP-seq) 法・RNA シークエンス (RNA-seq) 法により Hh 応答性の Gli 結合部位・エピゲノム変化・遺伝子発現変化に関するゲノムワイドデータの取得を目指す。得られたデータから、バイオインフォマティクス (生物情報学) 的手法を駆使して、エピゲノム・転写ダイナミクス・遺伝子制御ネットワークを明らかにする。これらの生理的意義を、遺伝子改変マウスや分子生物学・生化学手法により in vivo 及び in vitro において検証し、その知見の骨再生医療への応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) Hh-Gli 誘導性の骨形成性細胞への運命決定期の細胞の同定・取得・分子特性の解析
マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を Hh 誘導性に骨芽細胞へと分化させる培養法において、骨形成性転写因子 Runx2 と Hh 標的遺伝子 Gli1 の mRNA 発現を時系列で解析した。

(2) ChIP-seq 法・RNA-seq 法による Gli 結合・遺伝子発現変化の解析

FLAG タグ融合 Gli1 が Rosa26 遺伝子座より発現する Rosa26-Gli1-FLAG マウス ES 細胞を (1) の分化系で培養し、Hh-Gli 誘導性の運命決定期において FLAG タグに対する ChIP-seq を行った。RNA-seq 解析も行い、運命決定前後の遺伝子発現プロファイルに関するデータもあわせて取得した。

(3) 骨形成性細胞への運命決定における Hh-Gli 応答性エピゲノム・転写ダイナミクス・遺伝子制御ネットワークのモデル構築

バイオインフォマティクス的手法を駆使して、(2) の ChIP-seq と RNA-seq から得られた大規模データの解析を行った。遺伝子の機能は GREAT (*Nat Biotech* 28:495-501, 2010) にて探索した。この領域に存在する de novo モチーフ解析も行った。

(4) モデルの生理的意義の検証

(3) で同定されたモデルの妥当性を、マウス遺伝学・分子生物学・生化学的手法により検証した。

4. 研究成果

(1) Hh-Gli 誘導性の骨形成性細胞への運命決定期の細胞の同定・取得・分子特性の解析

無血清培地で低分子化合物のみを用い、中胚葉分化を經由してマウス ES 細胞から Hh 誘導性に骨芽細胞へと分化させる培養法の開発に成功した (発表論文 1, 10; 学会発表 2, 9, 12, 15, 19, 20, 21, 25, 26)。この分化系において、Runx2 と Gli1 の mRNA 発現を解析したところ、発現上昇期が存在することが判明した。この時期を Hh-Gli 誘導性の骨形成性細胞への運命決定期とし、以降の解析に使用することとした。

(2) ChIP-seq 法・RNA-seq 法による Gli 結合・遺伝子発現変化の解析、及び (3) 骨形成性細胞への運命決定における Hh-Gli 応答性エピゲノム・転写ダイナミクス・遺伝子制御ネットワークのモデル構築

背景の項で述べた発生段階での Hh シグナルの作用に加えて (従来の知見を整理し、発表論文 5, 9; 図書 1, 2; 学会発表 13, 27 にて報告) Hh 作動薬による Hh シグナルの活性化が成体の骨折治癒を促進すること (発表論文 4; 学会発表 3) さらに Gli ファミリー転写因子のうち、活性型 Gli である Gli1 が成体骨代謝に関わることを見出した (発表論文 5, 11; 学会発表 23)。また、骨格系転写制御因子の ChIP-seq 解析において、FLAG タグ融合蛋白質に対する抗 FLAG 抗体を用いた実験系を用いることで高品質なデータ取得が可能であることが分かった (発表論文 7; 学会発表 17)。

以上より、Gli のゲノム標的の解析においては、まず Gli1 に着目して FLAG タグを用いた ChIP を行うこととした。Rosa26-Gli1-FLAG マウス ES 細胞を (1) の骨芽細胞分化誘導系で培養し、中胚葉系細胞のステップと Hh 誘導性の骨芽細胞運命決定のステップにおいて、抗 FLAG 抗体を用いて Gli1 に対する ChIP-seq を行った。その結果、中胚葉系細胞期と骨芽細胞運命決定期において Gli1 結合領域を同定した。

骨格系転写制御因子の結合領域は、遺伝子の転写開始点近傍と (Class I) 遺伝子から離れた遠位 (Class II) に分けられることを見出したため (発表論文 2, 3, 6, 8; 学会発表 1, 5, 6, 16, 18, 22, 24) Gli1 結合領域も Class I と Class II に分類した。続いて、中胚葉系細胞期と骨芽細胞運命決定期の Class II Gli1 結合領域を比較したところ、骨芽細胞運命決定期特異的な Gli1 結合エンハンサーの候補領域を取得した。

これらの Gli1 結合エンハンサー領域の機能的な意義を探るため、GREAT (Genomic

Regions Enrichment Tool) 解析を行ったところ、ある特徴的な機能に關与する遺伝子群の転写に關わる可能性が示された。また、他の組織と比較して、骨芽細胞特異的な Gli1 の作動様式を明らかにするため、すでに報告されている神経管における Gli1 結合領域 (*Genes Dev* 26:2802, 2012) との比較を行った。その結果、骨芽細胞特異的な Gli1 結合エンハンサーの候補領域を取得した。これらの領域に対して再び GREAT 解析を行うと、上記と同様の特徴的な機能を有する遺伝子群が標的遺伝子候補として見いだされた。

以上より、Hh 刺激による骨芽細胞への運命決定の背景には、活性型 Gli によるこれらの遺伝子群の転写制御が存在することが示唆された。この点についてさらに検証するために、マウス ES 細胞を上記の骨芽細胞分化誘導系で培養し、中胚葉系細胞のステップと Hh 誘導性の骨芽細胞運命決定がおこるステップにおいて RNA-seq を行い、遺伝子発現データを取得した。現在、ChIP-seq データとの統合的解析が進行中である。

活性型 Gli のゲノムにおける作動様式を明らかにするため、上記の Gli1 結合領域に対して、de novo モチーフ解析を行った。その結果、Gli1 結合領域における Gli コンセンサス配列の強いエンリッチメントが認められた。したがって、活性型 Gli の主たる作動様式は、これまでに提唱されたモデルの通り、ゲノム上に存在する Gli コンセンサス配列への直接結合であることが示唆された。

研究の進展に伴い、骨形成に關わる Hh リガンドである Indian hedgehog (Ihh) の発現制御に關わるエンハンサー領域についても知見を得ることができた。エピゲノム (H3K4me2, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3) と転写コンポーネント (RNA pol II, p300) に關する ChIP-seq データを解析した結果、Ihh 遺伝子周囲に存在する 5 つのエンハンサー候補領域を見出した。そのうちの一つは、骨格組織特異的なエンハンサー活性を有し、その活性化機構に複数の転写因子が關わることを明らかとなった (学会発表 4, 7, 8, 10, 11, 14)。

(4) モデルの生理的意義の検証

ChIP-seq により取得したエンハンサー候補領域の生理的意義・生体における活性を検証する手法として、レポーター遺伝子のトランスジェニックマウスを用いた実験系を開発した (発表論文 7; 学会発表 17)。現在、レポータートランスジェニックマウスとゲ

ノム編集によるエンハンサー欠失マウスの解析を通じて、Gli1 結合エンハンサーの候補領域と領域中に存在するGli コンセンサス配列の生理的意義、Ihh 発現制御エンハンサーの生理的意義と骨格組織変性疾患発症への関与、を検証している。

また、エンハンサーの活性化機構については、ゲルシフトアッセイによる蛋白質 - DNA 相互作用や共免疫沈降による蛋白質 - 蛋白質相互作用の解析を中心に進めている。

(5) まとめ

一連の解析により、Hh 刺激による骨芽細胞への運命決定の背景にある転写ダイナミクスの少なくとも一端を明らかにしつつあると考えている。現在、上記の解析から得られた仮説を検証するために、マウス遺伝学・分子生物学・生化学的手法による解析が進行中である。エピゲノムダイナミクスとの関連を含めた全容解明を目指して、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 11 件)

全て査読有

1. Zujur D, Kanke K, Lichtler AC, Hojo H, Chung UI, [Ohba S \(corresponding author\)](#): Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. *Science Advances* 3(5):e1602875, 2017 (doi: 10.1126/sciadv.1602875)
2. Hojo H, Chung UI, [Ohba S](#): Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration. *Regenerative Therapy* 6:100-107, 2017 (doi: org/10.1016/j.reth.2017.04.001)
3. Hojo H, McMahon AP, [Ohba S \(corresponding author\)](#): An emerging regulatory landscape for skeletal development. *Trends in Genetics* 32(12):774-787, 2016 (doi: 10.1016/j.tig.2016.10.001)
4. Kashiwagi M, Hojo H, Kitaura Y, Maeda Y, Aini H, Takato T, Chung UI, [Ohba S \(corresponding author\)](#): Local administration of a hedgehog agonist accelerates fracture healing in a mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479(4):772-778, 2016 (doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.134)
5. [Ohba S \(corresponding author\)](#): Hedgehog signaling in endochondral ossification. *Journal of Developmental Biology* 4(2):20, 2016 (doi: 10.3390/jdb4020020)
6. He X, [Ohba S \(co-first\)](#), Hojo H, McMahon AP: AP-1 family members act with Sox9 to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* 143(16):3012-3023, 2016 (doi: 10.1242/dev.134502)
7. Hojo H, [Ohba S](#), He X, Lai LP, McMahon AP: Sp7/Osterix is restricted to bone-forming vertebrates where it acts as a Dlx co-factor in osteoblast specification. *Developmental Cell* 37(3):238-253, 2016 (doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.002)
8. [Ohba S \(corresponding author\)](#), He X, Hojo H, McMahon AP: Distinct transcriptional programs underlie Sox9 regulation of the mammalian chondrocyte. *Cell Reports* 12(2):229-243, 2015 (doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.013)
9. Hojo H, [Ohba S](#), Chung UI: Signaling pathways regulating the specification and differentiation of the osteoblast lineage. *Regenerative Therapy* 1:57-62, 2015 (doi: 10.1016/j.reth.2014.10.002)
10. 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(6):751-760, 2014 (doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.016)
11. 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)

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 大庭伸介: 骨格形成における遺伝子発現機構をゲノムスケールで理解する. 第 17 回日本再生医療学会総会 - シンポジウム「インフォマティクスが拓く再生医療」, 2018 (招待講演)
2. Zujur DC, Hikita A, Kanke K, Hojo H, Chung UI, Ohba S: Modeling of bone remodeling by three-dimensional co-culture of mouse embryonic stem cell-derived osteoblasts and osteoclast precursors. Joint meeting of the Australian & New Zealand Bone and Mineral Society & the International Federation of Musculoskeletal Research Societies, 2017
3. Kashiwagi M, Hojo H, Kitaura Y, Maeda Y, Aini H, Takato T, Chung UI, Ohba S: Hedgehog agonist promotes callus formation in a mouse fracture model. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, 2017 (Young Investigator Award)
4. Yamakawa A, Hojo H, Chung UI, Ohba S: Enhancer network for Ihh transcription in chondrocytes. Orthopaedic Research Society (ORS) 2017 Annual Meeting, 2017
5. 大庭伸介: 骨格形成における遺伝子発現機構をゲノムスケールで理解する. 第59回歯科基礎医学会学術大会・総会 - 先端歯学スクールシンポジウム「骨格形成の分子機構」, 2017 (招待講演)
6. 大庭伸介: Distinct transcriptional program underlie Sox9 regulation of the mammalian chondrocyte. 第 30 回軟骨代謝学会, 2017 (第 22 回軟骨代謝学会賞受賞口演)
7. 山川晃, 北條宏徳, 鄭雄一, 大庭伸介: 軟骨細胞におけるエンハンサーネットワークを介した Indian hedgehog の発現制御機構. 第 30 回軟骨代謝学会, 2017
8. 山川晃, 北條宏徳, 鄭雄一, 大庭伸介: 軟骨細胞特異的な Ihh のエンハンサーの同定と Sox9 によるその活性化機構. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017 (優秀演題賞)
9. 小野寺晶子, 東俊文, 齋藤暁子, 長谷川大悟, 片倉朗, 野村武史, 小崎健次郎, 鄭雄一, 大庭伸介: Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化能の異常とその分子メカニズム. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017
10. 山川晃, 北條宏徳, 鄭雄一, 大庭伸介: 軟骨細胞におけるエンハンサーネットワークを介した Indian hedgehog の発現制御機構. 第 90 回日本整形外科学会学術総会, 2017
11. Yamakawa A, Chung UI, Ohba S: Regulatory mechanisms underlying Ihh transcription in chondrocytes. 38th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2016 (Young Investigator Award)
12. Zujur DC, Kanke K, Chung UI, Ohba S: Differentiation of mouse pluripotent stem cells in three-dimensional cultures under defined conditions. International Society for Stem Cell Research 14th Annual Meeting, 2016
13. 大庭伸介: 骨形成の分子メカニズムとその骨再生への応用. 日本セラミックス協会 - 第 29 回秋季シンポジウム「生体との調和を生み出すセラミックスの開発と評価」, 2016.9.8, 広島 (招待講演)
14. 山川晃, 北條宏徳, 鄭雄一, 大庭伸介: 軟骨細胞における Indian hedgehog の発現制御機構. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016
15. Ohba S: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using small molecules under defined conditions. 2015 International Congress of Osteoporosis (ICO), 2015 (招待講演)
16. Ohba S, He X, Hojo H, McMahon AP: Distinct modes of Sox9 action in the transcriptional regulation of developing mammalian chondrocytes. 37th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2015
17. Hojo H, Ohba S, He X, Lai LP, McMahon AP: An Sp7/Dlx transcriptional complex specifies mammalian osteoblasts. 37th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2015
18. He X, Ohba S, Hojo H, McMahon AP: AP-1 factor interacts with Sox9 during mammalian chondrocyte hypertrophy. 37th Annual Meeting of the American

- Society for Bone and Mineral Research, 2015
19. 大庭伸介: 多能性幹細胞の段階的骨芽細胞分化誘導とその応用. 第 26 回日本小児整形外科学会学術集会 - パネルディスカッション 4 「小児整形での組織移植・再生医療」, 2015 (招待講演)
 20. 大庭伸介: 多能性幹細胞の段階的骨芽細胞分化誘導法の開発とその応用. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 - シンポジウム 3 「骨・軟骨疾患の基礎と臨床の最先端」, 2015 (招待講演)
 21. 菅家康介, 齋藤琢, 高戸毅, 鄭雄一, 大庭伸介: 低分子化合物 4 種と無血清培地を用いた多能性幹細胞からの骨芽細胞分化誘導法の開発. 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015
 22. Ohba S: Identification of distinct modes of Sox9 action in chondrocytes. 4th International SOX Research Conference, 2014 (招待講演)
 23. Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, Takato T, Chung UI, Ohba S: Gli1 haploinsufficiency disrupts postnatal bone homeostasis under physiological and pathological conditions. 36th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2014
 24. Askary A, He X, Mork L, Ohba S, McMahon AP, Crump G: The Iroquois transcription factors Irx7 and Irx5a promote the zebrafish hyoid joint by arresting chondrocytes at an early state of maturation. 11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics, 2014
 25. Kanke K, Masaki H, Saito S, Komiyama Y, Hojo H, Lichtler AC, Nakauchi H, Takato T, Chung UI, Ohba S: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting, 2014
 26. 大庭伸介: 低分子化合物を用いた多能性幹細胞の骨芽細胞分化誘導法の開発とその応用の可能性. 第 68 回日本口腔科学会学術集会 - シンポジウム 「iPS 細胞が拓く未来の医療 骨/軟骨研究の進歩」, 2014 (招待講演)

27. 大庭伸介: ヘッジホッグシグナルによる骨形成の制御. 第 87 回日本内分泌学会学術総会 - シンポジウム 9 「骨軟骨代謝ネットワークと細胞連関」, 2014 (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

1. 大庭伸介: 15 章 3 節 骨形成と転写制御, 遺伝子発現制御機構 クロマチン・転写制御・エピジェネティクス (田村隆明, 浦聖恵編), 164-166, 東京化学同人, 東京, 2017
2. 大庭伸介, 鄭雄一: 第 11 章 Hedgehog シグナル, サイトカイン・増殖因子キーワード事典 (宮園浩平, 秋山徹, 宮島篤, 宮沢恵二編) 375-383, 羊土社, 東京, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp/ohba-tei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大庭 伸介 (OHBA, Shinsuke)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 20466733

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

北條 宏徳 (HOJO, Hironori)
アンドリュー マクマホン (MCMAHON, Andrew)
シンジュン ヒ (HE, Xinjun)
鄭 雄一 (TEI, Yuichi)
菅家 康介 (KANKE, Kosuke)
北浦 義昭 (KITAURA, Yoshiaki)
柏木 美樹 (KASHIWAGI, Miki)
デニス ズフル (ZUJUR, Denise)
山川 晃 (YAMAKAWA, Akira)
ガル ウェニン ペルマタサリ (PERMATASARI, Galuh Wening)