

中山人間科学振興財団活動報告書 2013

2013年度研究助成

骨格系組織のエピゲノム動態の解明

大庭 伸介

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻

## 1. 研究の目的

胚性幹細胞（ES 細胞）からの骨芽細胞・軟骨細胞への *in vitro* 分化誘導系を新たに開発する。そして、この誘導系の各段階の細胞においてエピゲノムのクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq）解析と遺伝子発現プロファイリングを行うことで、骨格系細胞への分化過程におけるエピジェネティクス制御の一端を明らかにし、骨・軟骨再生医療へと展開する基礎的知見を収集することを旨とする。

## 2. 本研究課題の国内および海外での研究の現状と位置づけ

初期発生・腫瘍におけるエピゲノムは現在最も注目を集める研究分野の一つである。器官形成においては、神経・血液等の *vital organ* では盛んである一方、骨格系におけるエピゲノムへの理解は未だ不十分であると言わざるを得ない。これは、解析に十分な量の細胞を生体から単離することが困難であることによるところが大きい。間葉系幹細胞（*mesenchymal stem cells*- MSC）からの *in vitro* 分化系を用いた解析は存在するものの、この分化系が生理的な骨芽細胞分化を反映しているかは不明である。したがって、ES 細胞からの分化系を利用することで、生理的なエピゲノム動態をゲノムワイドで明らかにする試みは本研究が最初である。高齢化社会を迎え、単なる延命のみならず健康寿命の延伸が目標である現在の医療において、運動器の根幹をなす骨格系のエピゲノムへの理解は、骨粗鬆症・変形性関節症といった骨格系の変性疾患の病因解明と治療法開発に貢献すると考えられる。

## 3. 研究計画

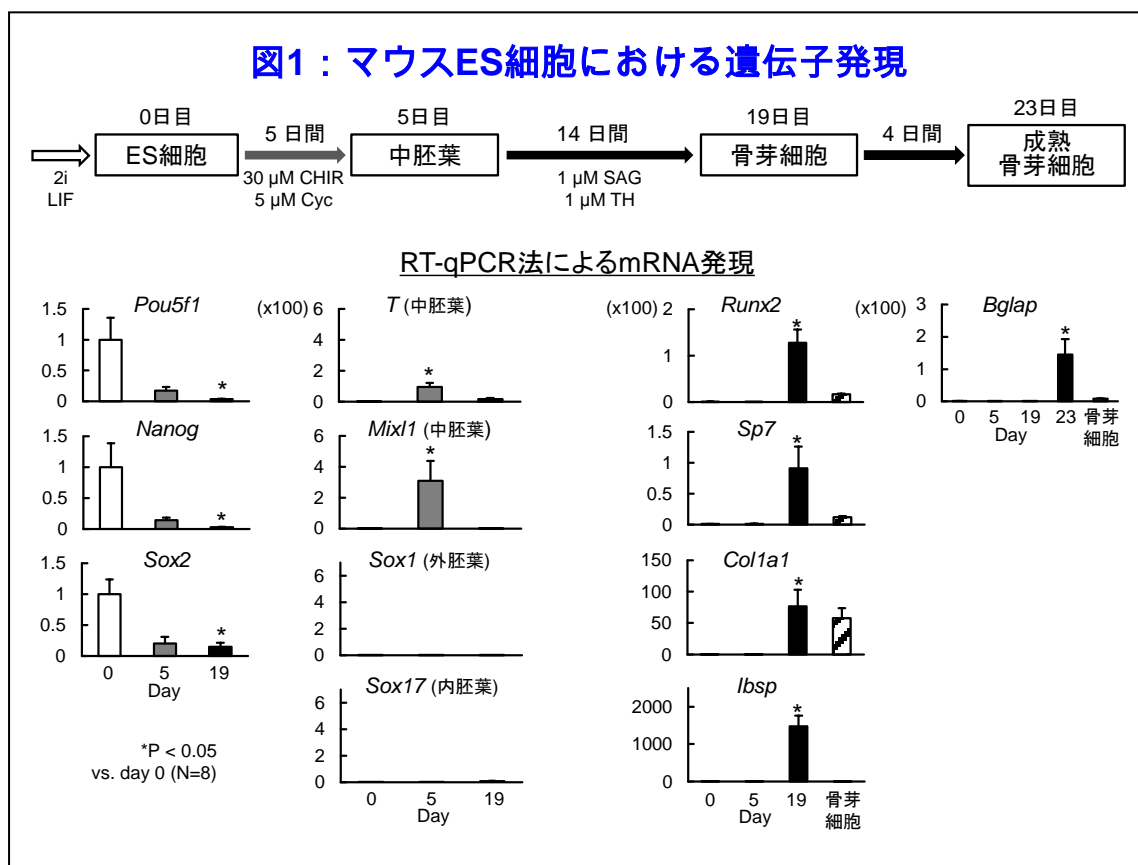
ChIP-seq 解析に十分な量の細胞を、各発生段階の生体（マウス胎仔）から取得することは不可能であるため、①生理的骨軟骨発生を模倣したマウス ES 細胞から骨芽細胞・軟骨細胞への段階的 *in vitro* 分化誘導系を新たに開発し、各分化段階の細胞を時系列に採取して、②ChIP-seq によるエピゲノムの解析と③トランスクリプトーム解析を行い、④各段階のエピゲノム状態と発現遺伝子の相関の解析から、骨格系細胞を規定するエピゲノムがいつどのように獲得され、各系統を特徴づける遺伝子発現をいかにして制御するかという点について仮説を構築する。最後に、⑤ *in vivo* 及び *in vitro* においてその仮説の妥当性と生理的意義の検証を行う。

## 4. 実施内容

本年度は、エピゲノム解析を目的とした、マウス ES 細胞から骨芽細胞への段階的 *in vitro* 分化誘導系の開発を行った。

四肢や体幹の骨格形成においては、外側中胚葉もしくは傍軸中胚葉から骨格前駆細胞が形成され、骨芽細胞や軟骨細胞へ分化する。我々は、ES細胞における転写ネットワークの解析を通じて、Wnt / $\beta$  カテニンシグナルが中胚葉への分化を誘導するメカニズムを明らかにした<sup>1</sup>。さらに、骨形成性シグナルとしてヘッジホッグ (hedgehog-Hh) シグナルに着目し、その骨格形成における役割<sup>2-5</sup>と骨再生における有用性<sup>6</sup>に関して報告してきた。以上の先行研究をもとに、これらのシグナルを調節することで、中胚葉に由来する骨形成を模倣しながら、マウス ES 細胞から骨芽細胞への分化を誘導する方法を開発した。

分化プロトコールは、①無血清・無フィーダーの 2i 培養系を利用した ES 細胞の維持 (多能性維持培養期)、②無血清培地における ES 細胞の中胚葉細胞への誘導 (中胚葉誘導期)、③無血清培地における骨芽細胞への誘導 (骨芽細胞誘導期)、④無血清培地における成熟骨芽細胞への誘導 (成熟骨芽細胞誘導期) という 4 つの段階から構成される (図 1)。



多能性維持培養期においては、無血清・無フィーダーでマウス ES 細胞の多能性を維持する、MEK 阻害剤 (PD0325901) と GSK3 阻害剤 (CHIR99021-CHIR) を用いた培養法 (2i 培養法)<sup>7</sup>を用いた。中胚葉誘導期では、CHIR とサイクロパミン (Cyclopamine) 存在下で培養することにより、中胚葉関連遺伝子の発現の上昇と、多能性関連遺伝子及び外胚葉関連遺伝子の発現の低下を誘導した。こ

の結果は、中胚葉誘導期において、ES 細胞が多能性を喪失し、中胚葉細胞へ特異的に分化したことを示している。骨芽細胞誘導期においては、Hh シグナルの活性化剤 SAG と、骨成熟を誘導する低分子化合物であるヘリオキサンチン誘導體 TH<sup>8,9</sup>を用いた。その結果、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現が初代骨芽細胞に匹敵するレベルまで誘導された。成熟骨芽細胞誘導期では、成熟骨芽細胞のマーカー遺伝子であるオステオカルシンの発現上昇が誘導された。以上のように、4 種類の低分子化合物を使用することで、無血清培地でマウス ES 細胞から骨芽細胞を誘導する分化系を開発した。

細胞免疫染色により、骨芽細胞誘導期（培養 19 日目）において、多能性マーカー蛋白質である OCT4 と NANOG の発現は消失し、骨形成に必須の転写因子である Runx2 と Sp7 を発現する細胞がそれぞれ約 80%と約 70%、そして成熟骨芽細胞の指標である 2.3 kb Col1a1-GFP を発現する細胞が約 45%存在することが明らかとなった。また、中胚葉マーカーである T の蛋白発現は、中胚葉誘導期に認められた。これらの結果は、本分化系が中胚葉形成を介して効率的に骨芽細胞分化を誘導していると考えられた。また、骨芽細胞の機能的特徴である基質の石灰化が誘導されることも確認した。

このように、中胚葉に由来する骨形成過程を模倣しながら、マウス ES 細胞から骨芽細胞への分化を誘導する分化系を開発した。この分化系を用いて種々のヒストン修飾（H3K4me1・H3K4me2・H3K4me3・H3K27ac・H3K36me3・H3K27me3）や基本転写装置（p300・RNA ポリメラーゼ II・RNA pol II-ser2p）に対する ChIP-seq を開始している。各分化段階におけるエピゲノムと転写活性化の状態に関する情報をゲノムワイドで取得し、網羅的遺伝子解析による遺伝子発現プロファイルと統合的に解析を行うことで、骨芽細胞を規定するエピゲノム状態の様式とその獲得時期について明らかにする予定である。また、軟骨細胞への分化系も開発し、同様の解析を行っていきたいと考えている。

本研究の遂行にあたり、公益財団法人 中山人間科学振興財団よりご援助頂きましたことを深く感謝申し上げます。

## 5. 参考文献

1. Zhang X, Peterson KA, Liu XS, McMahon AP, Ohba S (co-first): Gene regulatory networks mediating canonical Wnt signal directed control of pluripotency and differentiation in embryo stem cells. *Stem Cells* 31:2667-2679, 2013
2. Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP: Ihh

- signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131(6):1309–1318, 2004
3. Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI: Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Developmental Cell* 14(5):689–699, 2008
  4. 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: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *Journal of Biological Chemistry* 288(14):9924–9932, 2013
  5. Hojo H, Ohba S, 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. *Journal of Biological Chemistry* 287(21):17860–69, 2012
  6. Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S: Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* 34(22):5530–5537, 2013
  7. Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A: The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 253(7194):519–523, 2008
  8. Ohba S, Nakajima K, Komiyama Y, Kugimiya F, Igawa K, Itaka K, Moro T, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Chung UI: A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357(4):854–860, 2007
  9. Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Ihara S, Aburatani H, Takato T, Chung UI: Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395(4):502–508, 2010