

## 25. ヘッジホッグと Wnt による骨格形成転写ネットワーク

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

Key words : 骨芽細胞, ヘッジホッグ, Wnt, 転写ネットワーク

### 緒言

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。全身のパターニングや器官形成において、Hedgehog (Hh) および Wnt シグナル経路が段階的に、あるいは協調して細胞運命を決定することが知られている。これらのシグナル経路とその作用は、無セキツイ動物から哺乳類まで高度に保存されている。骨格形成過程では、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。この過程は、Hh 及び Wnt シグナルが段階的に作用することで達成される。

Hh シグナルは、*Runx2* 陽性の骨芽細胞前駆細胞への運命決定に必須である<sup>1)</sup>。我々は、Hh シグナル伝達分子 Smoothed のノックアウトマウスの軟骨膜においては、前骨芽細胞が消失し異所性に軟骨細胞が出現することを以前見出した<sup>2)</sup>。これは、Hh シグナルが骨軟骨前駆細胞において骨芽細胞分化カスケードの開始にはたらいており、一方で軟骨分化を抑制することで骨芽・軟骨細胞への分化スイッチング機構に関与することを示唆している。Hh シグナルの下流では転写因子 Gli1, Gli2, Gli3 が協調して遺伝子発現を制御することが分かっている<sup>3,4)</sup>。Wnt に関しては、下流の転写制御因子である  $\beta$ -catenin (*Cttnb1*) の組織特異的変異マウスの解析から、骨芽細胞前駆細胞への規定には関与しないものの、*Runx2* 陽性前駆細胞から *Sp7* 陽性前駆細胞への分化と骨芽細胞への成熟に必須であることが示されている<sup>5)</sup>。以上より、Hh と Wnt は、骨形成性細胞における細胞運命の決定と成熟を司るマスター経路であり、その下流では骨格形成に関わる Sox9, AP-1, Runx2, Sp7 等の転写因子群と転写ネットワークを形成していると考えられる。しかしながらその全貌は未だ不明なままである。

本研究は、骨形成性細胞への細胞運命の決定において、Hh シグナルと Wnt シグナルの下流で働く「転写制御因子 Gli と  $\beta$ -catenin の位置」をゲノムワイドで明らかにし、骨格形成のマスター転写因子群に関するデータや遺伝子発現情報と併せて統合的に解析することで、この二つのシグナルの段階的・協調的転写ネットワークを明らかにすることを目指した。

### 方法、結果および考察

まず、マウス初代骨格系細胞において、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) により骨格形成のマスター転写因子群 (Sox9, AP-1, Runx2, Sp7) やヒストン修飾、転写装置の位置情報をゲノムワイドに取得し、遺伝子発現プロファイリングデータと併せてバイオインフォマティクス的手法により統合的に解析した。その結果、軟骨細胞における Sox9, AP-1 の作動様式とエピゲノム、及び骨芽細胞における Sp7 の作動様式について新たな知見が得られた。まず、軟骨細胞では、Sox9 が AP-1 ファミリー転写因子である Jun と協調して、活性型エンハンサー上で軟骨関連遺伝子の発現調節に働くことが分かった (図 1) <sup>6)</sup>。骨芽細胞においては、Sp7 は DNA に直接結合せず、Dlx 転写因子を介して DNA 上に存在し、コファクターとして働くことで骨芽細胞の分化に関わる遺伝子の転写を制御することが明らかとなった<sup>7)</sup>。

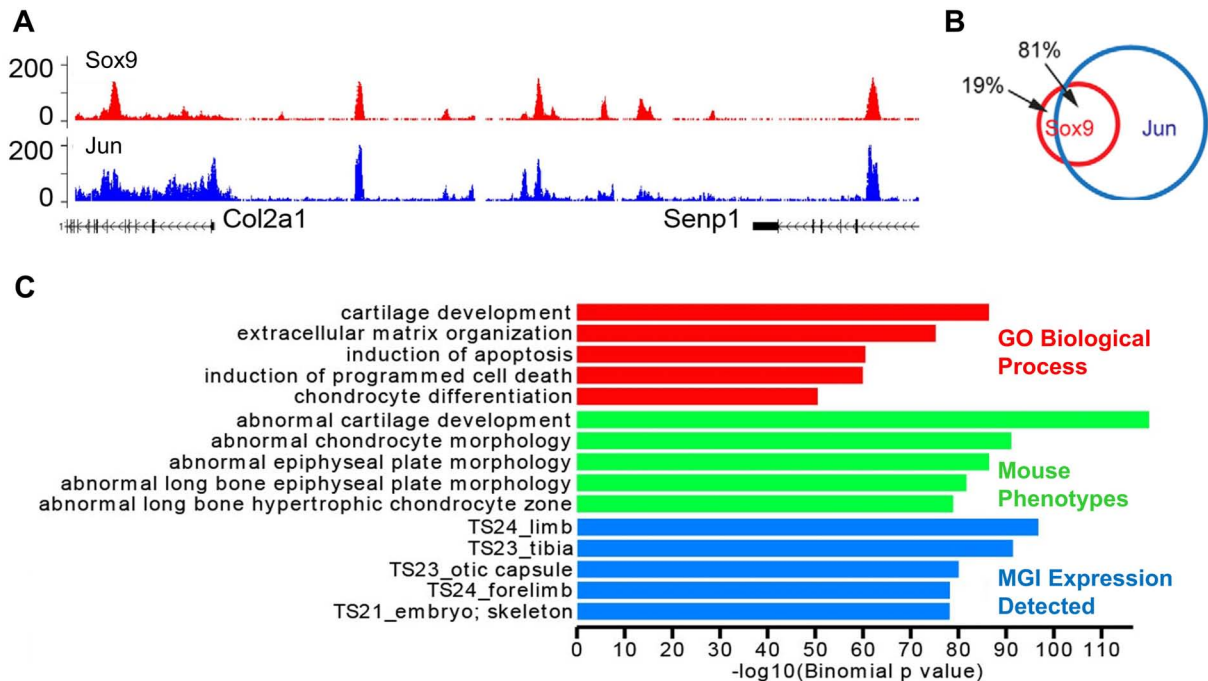


図1. マウス初代軟骨細胞ゲノムにおける Sox9 と Jun の結合領域の重複

(A) *Col2a1* 遺伝子周辺における Sox9 ChIP-seq および Jun ChIP-seq データ。CisGenome ブラウザ上で可視化された *Col2a1* 遺伝子領域周辺のピークを示す。Sox9 と Jun の両方の結合を認める領域が複数存在する。(B) Jun 結合領域と Class II Sox9 結合領域の重複を示すベン図。Class II Sox9 結合領域 (Sox9 が直接結合して軟骨細胞特異的な遺伝子制御にかかわる領域) のうち、81%が Jun 結合領域と重複する。(C) Sox9 と Jun の両方の結合を認める領域の GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool) gene ontology 解析。結合領域近傍にある標的遺伝子候補の機能が軟骨に関係することを示す。

次に、これらの研究と同様の手法を用い、マウス初代骨芽細胞において、Hh および Wnt の下流で働く転写制御因子 Gli と  $\beta$ -catenin に対する ChIP-seq を試みたが、高品質なデータの取得に至らなかった。これは、①骨格形成過程において、Hh や Wnt 反応性に運命決定と成熟が誘導される細胞集団が非常に少ないこと、②Gli と  $\beta$ -catenin に対する ChIP グレードの抗体が存在しないことが大きな要因であると考えられた。そこで、これらの技術的制約を解決すべく、次の二つの研究ツールを利用した。①に対しては、我々が以前開発した多能性幹細胞からの *in vitro* 骨芽細胞分化系<sup>8)</sup>を利用した。本分化系では、無血清培地下で4種類の低分子化合物を段階的に使用することで、生理的な分化過程と一致した遺伝子発現パターンを示しながら、Hh 依存性の骨芽細胞分化が高効率に誘導される。つまり、この分化系を用いることで、生理的な骨格発生に近い形で、必要な細胞集団を容易に得ることが可能となると考えられた。②に対しては、*Gli* (*Gli2* 及び *Gli3*) 遺伝子座に Biotin-3×FLAG (BioFL) タグがノックインされたマウス ES 細胞を新たに作出した。 $\beta$ -catenin については、我々が以前作出した *Ctnnb1*-BioFL ノックイン ES 細胞を利用することとした。これらの細胞の使用により、タグを用いた高効率な ChIP-seq が可能となると考えられた。

*Gli2*-BioFL、*Gli3*-BioFL ノックインマウス ES 細胞を、上記の *in vitro* 骨芽細胞分化系で培養した。本培養系では、培養5日目までに中胚葉系細胞へ誘導されたのちに、培養12日目までに Hh 誘導性に *Runx2* 陽性の骨芽細胞前駆細胞への運命決定が行われる<sup>8)</sup>。*Gli2*-BioFL、*Gli3*-BioFL ノックインマウス ES 細胞においても、培養5日目までに *T* の発現が上昇し、培養12日目に Hh シグナルの活性化に伴う *Gli1* の発現上昇を伴って、*Runx2* の発現が上昇することを確認した (図2)。

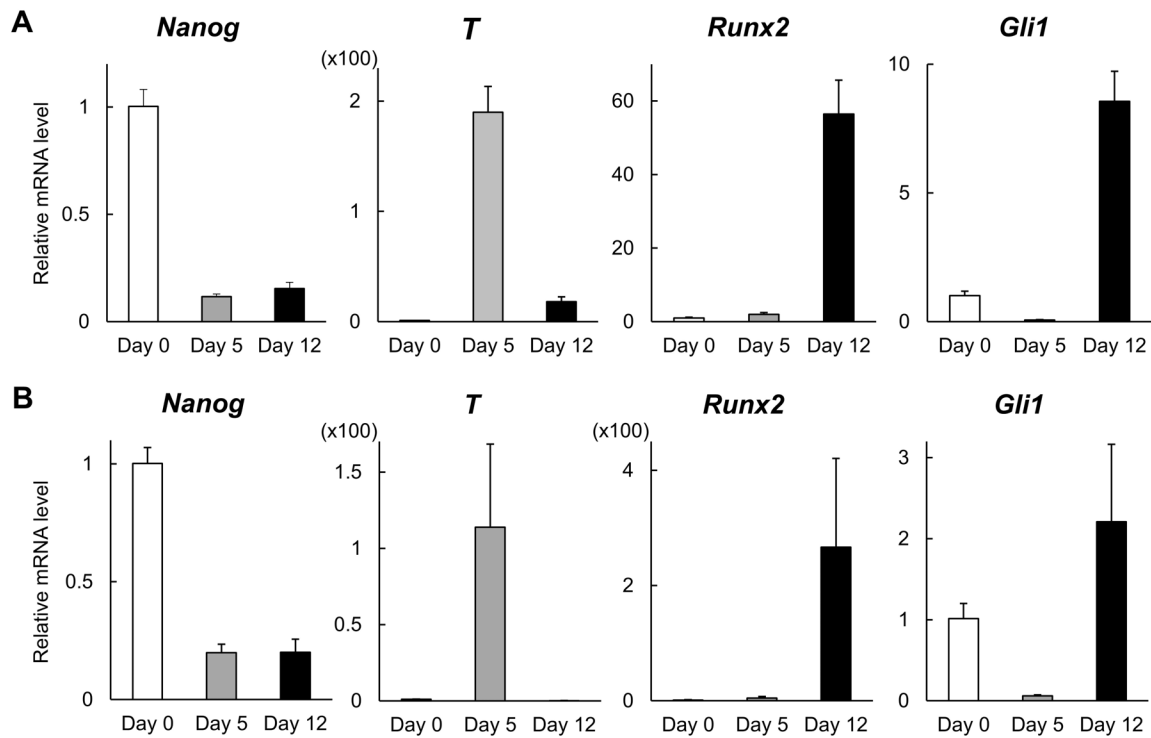


図2. *Gli2*-BioFL、*Gli3*-BioFL ノックインマウス ES 細胞の骨芽細胞分化誘導系における遺伝子発現パターン

(A) は *Gli2*-BioFL ノックインマウス ES 細胞、(B) は *Gli3*-BioFL ノックインマウス ES 細胞における各遺伝子発現のデータを示す。RT-qPCR 法により遺伝子発現レベルを検討した。Error bar: SD.

そこで、*Gli2*-BioFL ES 細胞の骨芽細胞分化培養 12 日目において ChIP-seq を行った。ChIP DNA から ChIP-seq ライブラリーを作製し、塩基配列を HiSeq2500 (Illumina) により解析した。配列データをゲノム上へマッピングしたのち、有意に取得された領域（ピーク）を検出した。その結果、*Gli2* の結合領域として、約 1,000 のピークを検出した。ピークの分布を解析すると、*Gli2* の結合領域全体の約 80% が転写開始点から 5–500 kb 離れた領域に存在することが明らかとなった（図 3）。また、約 50% の *Gli2* の結合領域は、遺伝子から 50–500 kb 離れていた（図 3）。以上より、骨芽細胞分化において、Hh シグナルの下流で *Gli2* が機能する際の主要な標的は遠位エンハンサーであると考えられた。

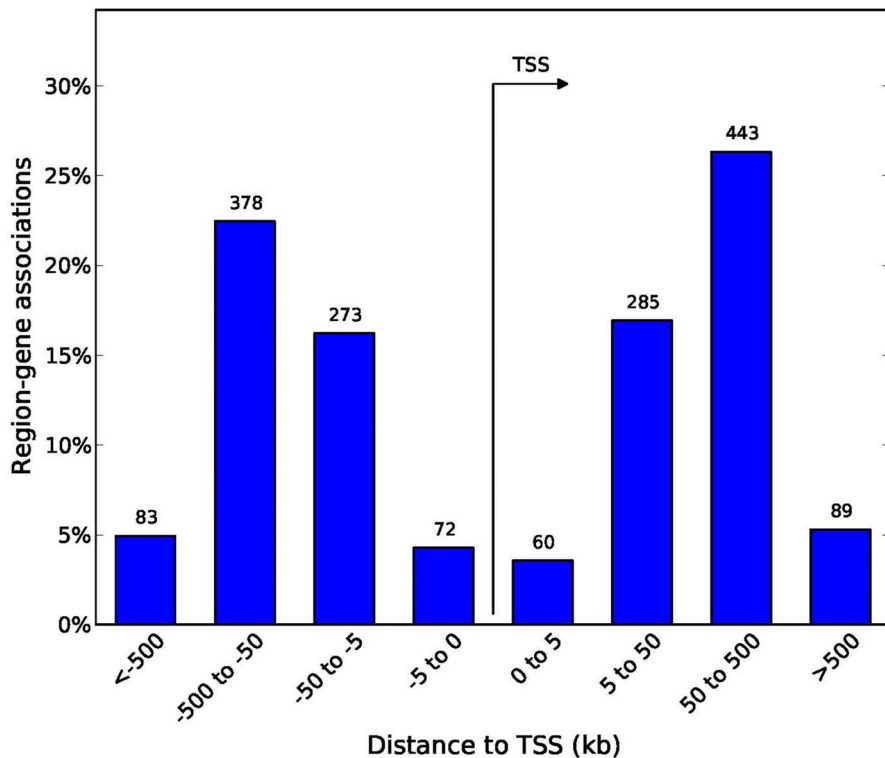


図3. 骨芽細胞分化過程にある細胞のゲノムにおける Gli2 結合領域の分布

ChIP-seq により取得した Gli2 結合領域（ピーク）に関するデータをもとに、GREAT により解析を行った。横軸は転写開始点からの距離を、縦軸は各領域の割合を示す。

本研究により、骨格形成のマスター転写因子群の作動様式に関する新たな知見が得られたとともに、骨芽細胞前駆細胞への運命決定期における Hh シグナル下流の転写因子 Gli2 の結合領域がゲノムワイドで明らかとなった。現在、Gli2 の ChIP-seq データの詳細な解析と並行して、Gli3 および  $\beta$ -catenin の ChIP-seq データの取得を目指して研究を進めている。また、マウス ES 細胞の骨芽細胞分化系における RNA-seq データの取得も完了しており、引き続き発現変動遺伝子のデータと ChIP-seq データの統合的解析を行う予定である。これらの解析を進めることにより、骨芽細胞分化における Hh シグナルと Wnt シグナルを中心とした段階的・協調的転写ネットワークの一端が明らかとなり、分化を進める分子メカニズムの解明に貢献できると考えられる。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院工学系研究科の鄭雄一および北條宏徳、南カリフォルニア大学の Andrew P. McMahon である。最後に、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

### 文 献

- 1) St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999;13(16):2072-86. PMID: 10465785.
- 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.* 2004;131(6):1309-18. doi:10.1242/dev.01006. PMID: 14973297.
- 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. *Dev. Cell* 2008;14(5):689-99. doi:10.1016/j.devcel.2008.03.007. PMID: 18477452.
- 4) 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. *J. Biol. Chem.* 2012;287(21):17860-9. doi:10.1074/jbc.M112.347716. PMID: 10465785.
  - 5) Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development.* 2006;133(16):3231-44. PMID: 16854976.
  - 6) He X, Ohba S, Hojo H, McMahon AP. AP-1 family members act with Sox9 to promote chondrocyte hypertrophy. *Development.* 2016;143(16):3012-23. doi:10.1242/dev.134502. PMID: 27471255.
  - 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. *Dev. Cell* 2016;37(3):238-53. doi:10.1016/j.devcel.2016.04.002. PMID: 27134141.
  - 8) Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, 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. *Stem Cell Reports* 2014;2(6):751-60. doi:10.1016/j.stemcr.2014.04.016. PMID: 24936463.