

## 骨格発生における細胞運命決定に関わる遺伝子発現制御機構



研究ノート

大庭伸介\*

Gene regulatory mechanisms underlying cell-fate determination during skeletal development

Key Words : Osteoblast, Chondrocyte, Epigenetics, Transcription

我々の研究室では、遺伝子発現制御機構やエピジェネティクスの観点で骨格系（骨・軟骨組織）の発生と維持の機構を理解しようと研究を進めております。本稿ではその背景を含めて我々の研究内容をご紹介します。

### 骨格系とは

私たちの骨格系は支持組織として運動の根幹をなすほか、リンとカルシウムの貯蔵庫としてはたらくことで生体のリン・カルシウム代謝に重要な役割を果たします。さらに、骨髄を収納することで造血の場を提供しています。

骨格系は、発生学的に3つの異なる由来（神経堤・沿軸中胚葉・側板中胚葉）から、2つの骨化様式（膜内骨化・軟骨内骨化）を経て形成されます。頭頸部の骨格要素の多くは外胚葉に由来する神経堤から、体幹の骨格要素は沿軸中胚葉から、そして四肢の骨格要素は側板中胚葉から発生します。骨化様式の観点から骨格発生を分類すると、頭頸部の骨格要素の多くと鎖骨の一部が膜内骨化により形成され、その他の骨格要素は軟骨内骨化によって形成されます。2つの骨化様式はともに、骨形成予定領域への骨格形成性間葉細胞の凝集から始まります。膜内骨化では、凝集した骨格形成性間葉細胞から骨を作る骨芽細胞が発生し、骨芽細胞による骨形成が進行します。

一方、軟骨内骨化では骨格形成性間葉細胞から軟骨を作る軟骨細胞と骨芽細胞が発生します。最初に軟骨細胞の増殖と基質産生によって軟骨のテンプレートが形成された後に、軟骨の吸収と骨芽細胞による骨形成が協調して進むことで徐々に骨組織に置換されます。その結果、成体の長管骨では関節部にのみ軟骨が残存します。

生体の骨組織では、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が協調して行われることで常に新しい骨が維持されています。骨粗しょう症は、骨吸収と骨形成のバランスが崩れて骨の量や質が低下した状態です。骨の欠損や骨折が起こった場合は、骨の組織幹細胞（骨格幹細胞）が修復に寄与すると考えられています。一方、軟骨組織の自己修復能は非常に限られており、変形性関節症等による軟骨の変性や欠損が広範に起こると、自然治癒によって健康な軟骨組織を回復することは困難です。

### 個体発生における遺伝子発現制御機構の意義

私たちのからだはたった一つの細胞（受精卵）から作られます。したがって、からだを構成する全ての細胞は同じ組成（配列）のゲノムDNAを有します。にもかかわらず、様々な種類の細胞が作られ、異なる機能を発揮します。これは、同じテンプレート（ゲノムDNA）を有していても、実際に転写・翻訳されて蛋白質として働く遺伝子の種類、発現する時期・量が細胞ごとに異なるためです。つまり、異なる遺伝子のセットが連鎖的に作用することで細胞の運命（どの細胞になるか）や性質（どの細胞にいるか）を決めています。遺伝子の作用の連鎖によって個体発生が進むという概念は、1957年に Conrad H. Waddington 博士によって「エピジェネティックランドスケープモデル」として提唱されました<sup>1)</sup>。続いて、発生過程における「遺伝子発現を制御するネ



\* Shinsuke OHBA

1976年9月生まれ  
東京大学大学院医学系研究科医学博士課程  
外科学専攻修了（2006年）  
現在、大阪大学大学院歯学研究科  
組織・発生生物学講座 教授  
博士（医学）  
専門／発生学・硬組織生物学  
TEL : 06-6879-2871  
FAX : 06-6879-2875  
E-mail : ohba.shinsuke.dent@osaka-u.ac.jp

ットワーク (gene regulatory network : GRN)」の存在が Roy J. Britten 博士と Eric H. Davidson 博士によって 1969 年に提唱されました<sup>2)</sup>。

これら 2つのモデルの根底にあるのは、細胞種に特徴的な遺伝子の発現を制御する転写因子の働きとエピジェネティクス (=DNA を巻き取るヒストン蛋白質や DNA 自身の化学修飾によって遺伝子の発現を制御する機構) です。現在は、次世代シーケンサー (next-generation sequencer: NGS) と呼ばれる塩基配列解析装置を利用することで、発現している遺伝子の種類と量、さらには転写因子が結合する場所や特定の化学修飾が起こっている場所を、ゲノムの全領域にわたって調べることが可能となっています。NGS を用いた解析により、60 年ほど前に提唱された上述の 2つのモデルが概ね正しいことが実証されつつあります。

### 我々の研究①: 遺伝子発現制御機構の観点で骨格発生を理解する

骨格発生においては、Sox9、Runx2、Sp7 という 3つの転写因子の正常な働きが必要不可欠であることが分かっています。マウスにおいて種々の発生段階で Sox9 を欠失させると、正常な軟骨や四肢そのものが消失します<sup>3)</sup>。一方、Runx2 と Sp7 のいずれかを欠失させたマウスでは全身で骨が消失します<sup>4,5)</sup>。つまり、Sox9 は軟骨細胞の発生に、Runx2 と Sp7 は骨芽細胞の発生に必須だと考えられますが、これらの転写因子がゲノム全域にわたってどのように振る舞うのか、つまりゲノムワイドな作動様式は不明なままでした。そこで我々は NGS を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス法、RNA シーケンス法を行い、軟骨細胞ゲノムにおける Sox9 の結合パターン、骨芽細胞ゲノムにおける Sp7 の結合パターン、軟骨細胞と骨芽細胞のゲノムそれぞれにおける Runx2 の結合パターンについて、種々のエピジェネティクス状態や発現遺伝子に関する所見と統合してゲノムワイドで解析しました。

一連の解析により、Sox9 は標的遺伝子の転写開始点近傍と遠位エンハンサーにおいて異なる作動様式を示し、軟骨細胞への運命決定と生存に関わる遺伝子セットの発現を誘導していることが明らかとなりました<sup>6,7)</sup>。Sp7 に関しては、自身の転写因子としての作用よりも、ホメオボックス転写因子群の補

因子として働くことで骨芽細胞に特徴的な遺伝子セットの発現誘導に関わることを見出しました<sup>8)</sup>。また、Runx2 は軟骨細胞と骨芽細胞それぞれに特徴的なオープンクロマチン領域 (ヒストン蛋白質による DNA の巻き取りが弱まり、転写因子が作用しやすくなった領域) に作用して、それぞれに特徴的な遺伝子セットの発現誘導に関わることを見出しました<sup>9)</sup>。特に骨芽細胞の分化においては、Runx2 がオープンクロマチン領域の形成を誘導するパイオニアファクターとして働く可能性も提示しました<sup>9)</sup>。現在もいくつかの転写因子やシグナル因子に着目して、遺伝子発現制御機構の研究を進めています。一連の研究結果から、骨格系の発生と維持の過程において各因子が制御する遺伝子間のネットワーク (=骨や軟骨を作る設計図) を明らかにすることが最終的な目標です。

### 我々の研究②: ヒトの骨格発生を再現して解析する

骨や軟骨を特徴づける転写因子の働きやエピジェネティクスに関する研究に加えて、胎生期の発生過程を段階的に模倣しながら、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) や iPS 細胞といった多能性幹細胞から骨・軟骨の発生過程を再現する方法の開発に力をいれています<sup>10-14)</sup>。哺乳類の器官発生に関するこれまでの知見のほとんどはモデル動物 (主にマウス) から得られたものです。器官発生の根本にある機構の多くは生物種を超えて共通とされておりましたが、ヒトの組織・器官においても同様の機構かどうかは詳細には分かっていないのが現状です。実際、動物実験で劇的な効果を示した薬剤や生理活性物質がヒトにおいてはそれほど効果を示さなかったり、効果を得るためには大量に投与しなければならなかったという例もあります。ここに、ヒトの多能性幹細胞を用いた器官発生・形成の再現系を開発する意義があると考えています。また、NGS を用いた解析はここ数年でさらに進化し、単一細胞ごとに発現遺伝子の種類と量、ゲノムの状態がわかる「シングルセル解析」が発生生物学を席卷しています。ヒト多能性幹細胞の器官発生・形成の再現系とシングルセル解析を組み合わせることで、ヒトの骨や軟骨の修復・再生に寄与する新しい細胞集団や新しい因子、そしてそれらの働き方を明らかにしていきたいと考えております。また、ヒト多能性幹細胞の器官発生・形

成の再現系は新しい治療用薬剤の探索にも役立つ可能性があります。

最近、ヒト多能性幹細胞から軟骨内骨化を再現する手法を開発し、この手法によって誘導した軟骨内骨化構造体に対してシングルセル解析を適用しました。その結果、ヒトの軟骨内骨化に関わる転写因子群や GRN の一端を予測するに至りました<sup>14)</sup>。引き続き、異なる発生的由来や異なる骨化様式を再現するヒト骨格発生再現系を開発し、ヒト骨格発生の分子機序の解明につなげたいと考えております。

### 謝辞

一連の研究の共同研究者の方々に御礼申し上げます。

### 参考文献

1. Waddington, C. H. (1957) *The strategy of the genes*, Allen & Unwin Ltd., London
2. Britten, R. J., and Davidson, E. H. (1969) Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* **165**, 349-357
3. Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., and de Crombrugge, B. (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* **16**, 2813-2828
4. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T. (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755-764
5. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrugge, B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17-29
6. Ohba, S., He, X., Hojo, H., and McMahon, A. P. (2015) Distinct Transcriptional Programs Underlie Sox9 Regulation of the Mammalian Chondrocyte. *Cell Rep* **12**, 229-243
7. He, X., Ohba, S., Hojo, H., and McMahon, A. P. (2016) AP-1 family members act with Sox9 to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* **143**, 3012-3023
8. Hojo, H., Ohba, S., He, X., Lai, L. P., and McMahon, A. P. (2016) Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. *Dev Cell* **37**, 238-253
9. Hojo, H., Saito, T., He, X., Guo, Q., Onodera, S., Azuma, T., Koebis, M., Nakao, K., Aiba, A., Seki, M., Suzuki, Y., Okada, H., Tanaka, S., Chung, U. I., McMahon, A. P., and Ohba, S. (2022) Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. *Cell Rep* **40**, 111315
10. Kanke, K., Masaki, H., Saito, T., Komiyama, Y., Hojo, H., Nakauchi, H., Lichtler, A. C., Takato, T., Chung, U. I., and Ohba, S. (2014) 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
11. Zujur, D., Kanke, K., Lichtler, A. C., Hojo, H., Chung, U. I., and Ohba, S. (2017) Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. *Sci Adv* **3**, e1602875
12. Zujur, D., Kanke, K., Onodera, S., Tani, S., Lai, J., Azuma, T., Xin, X., Lichtler, A. C., Rowe, D. W., Saito, T., Tanaka, S., Masaki, H., Nakauchi, H., Chung, U. I., Hojo, H., and Ohba, S. (2020) Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers. *Regen Ther* **14**, 19-31
13. Ikeda, Y., Tani, S., Moriishi, T., Kuroda, A., Matsuo, Y., Saeki, N., Inui-Yamamoto, C.,

Abe, M., Maeda, T., Rowe, D. W., Chung, U. I., Hojo, H., Matsushita, Y., Sawase, T., and Ohba, S. (2023) Modeling of intramembranous ossification using human pluripotent stem cell-derived paraxial mesoderm derivatives. *Regen Ther* **24**, 536-546

14. Tani, S., Okada, H., Onodera, S., Chijimatsu, R.,

Seki, M., Suzuki, Y., Xin, X., Rowe, D. W., Saito, T., Tanaka, S., Chung, U. I., Ohba, S., and Hojo, H. (2023) Stem cell-based modeling and single-cell multiomics reveal gene-regulatory mechanisms underlying human skeletal development. *Cell Rep* **42**, 112276

