

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト骨発生におけるエンハンサーランドスケープの解明とエピゲノム編集による細胞運命制御法の開発
(英語) Identification of the enhancer landscape in the human skeletal development and engineering of the skeletal cell fate by epigenetic editing

研究開発実施期間: 令和 3 年 6 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 北條 宏徳
(英語) Hojo, Hironori

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 東京大学・大学院医学系研究科疾患生命工学センター・准教授
(英語) Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, Associate Professor

II 研究開発の概要

本研究では、骨発生における細胞の運命決定・分化を規定するエピジェネティックランドスケープの解析を通して、エピゲノム編集を用いたエンハンサー群の活性操作により、細胞のエピゲノム状態の差異によらず、安全で安定した骨再生を実現することを目標とした。次に挙げる研究プロジェクトを行った。

① ヒト骨発生におけるエピジェネティックランドスケープの解明

細胞種特異的な転写制御を担うエンハンサーに注目し、ヒト骨発生におけるエンハンサーランドスケープの解明を目指した。本研究を実施するため、ヒト多能性幹細胞から3次元骨組織を誘導する手法を確立した。本方法では、幹細胞から椎板細胞（骨軟骨前駆細胞）への Stepwise 分化誘導と、誘導細胞の免疫不全マウス腎被膜下への移植により三次元骨組織を誘導する。作製した骨組織は、軟骨細胞のカラム構造、骨殻、血管、および骨髄構造といった、生理的な骨組織に類似した構造を有していた。誘導した骨格系細胞を、遺伝子発現プロファイルを基に特徴づけるため、異なる期間経過後の誘導骨組織サンプルを用いた一細胞 RNA-seq 解析を行った。その結果、骨格系前駆細胞から骨芽細胞・軟骨細胞への細胞分化を示す trajectory とそれを裏付ける分化マーカー発現が確認された。また、公共データベースとの統合解析により、誘導した骨組織を構成する骨芽細胞と軟骨細胞は、ヒト胎児骨組織に存在する細胞集団と遺伝子発現プロファイルが類似していることが確認された。以上よ

り、本方法がヒト骨発生を模倣する系であることが確認された。

次に、骨格系細胞の運命決定を担う遺伝子制御ネットワークを明らかにするため、一細胞マルチオーム解析（一細胞 RNA-seq 解析＋一細胞 ATAC-seq 解析）を行った。本解析では、遺伝子発現プロファイルに加えて、エンハンサー候補領域の情報を同一細胞から取得できる。本解析により、軟骨細胞・骨芽細胞において特異的に活性化するエンハンサー候補領域を同定した。さらに、各細胞集団ではたらく転写因子群の同定を試みた。エンハンサー領域において、転写因子は、モチーフと呼ばれる特異的なDNA配列に結合することが知られている。それぞれの転写因子ファミリーメンバーは、異なるモチーフ配列に結合する。そのため、細胞種特異的なエンハンサー領域においてモチーフ配列のエンリッチメント解析を行うことで、どの転写因子ファミリーメンバーが結合し得るか推定することが可能である。さらに、転写因子の遺伝子発現情報を考慮することで、各細胞集団ではたらく転写因子ネットワークを推定することが可能となる。本解析の結果、骨発生で重要な既知の転写因子に加え、新規因子群を多数見出した。

これまでの解析で見出した新規転写因子候補の中で、**ZEB2** に着目し、その機能解析を行った。**ZEB2** はモワット・ウイルソン症候群の原因遺伝子として知られている。本疾患は、特徴的顔貌、重度から中等度の知的障害と小頭症を3主徴とする先天異常症候群だが、骨発生における **ZEB2** の役割は十分に明らかになっていなかった。そこで我々は、ヒト細胞および遺伝子改変マウスを用いた **ZEB2** の機能喪失実験を行った。ヒト間葉系細胞を用いた **ZEB2** ノックダウン解析の結果、**ZEB2** ノックダウンにより骨芽細胞分化が抑制されることが明らかになった。さらに、骨芽細胞特異的な **ZEB2** ノックアウトマウスを用いた解析の結果、本ノックアウトマウスでは骨形成不全が認められた。以上より、**ZEB2** は骨芽細胞分化に正にはたらく転写因子であることが明らかになった。

スーパーエンハンサーとは、細胞の種類や機能に関係する重要な遺伝子の近傍において、複数のエンハンサーが、局所的に集積することでクラスターを形成するゲノム領域として提案された領域である。ここでは細胞種を規定するマスター転写因子を中心に、転写制御因子等が複合体を形成し作用することが知られている。我々は、ヒト骨芽細胞におけるスーパーエンハンサーを同定するため、骨芽細胞特異的なレポータ遺伝子を有するヒト多能性幹細胞を用いて骨組織を誘導した。レポータ遺伝子を指標に骨芽細胞を単離し、スーパーエンハンサー解析を行った。マウスとの種間解析により、種間で共通してはたらくスーパーエンハンサー群を同定した。その中の一つ、**Sp7** エンハンサーが、骨組織特異的に転写を制御することを、*in vitro* 解析および *in vivo* レポータマウス解析を用いて示した。さらに本 **Sp7** エンハンサーを欠損させたマウスを作出した結果、野生型マウスと比較して骨量の有意な減少が認められた。

② Multiplex エンハンサースクリーニング法の開発

遺伝子の発現には、複数のエンハンサーとプロモーター領域が協調してはたらくことが重要である。これまでの **CRISPR-Cas9** システムを用いた解析では、同時に活性を制御できるゲノム領域の数が限られており、ハイスループットに至っていなかった。**Cas12a** は、**Cas9** と同様にガイド RNA 依存的に DNA 切断能を有しているが、ガイド RNA の成熟化のプロセスが異なっている。**Cas12a** では、単一の転写単位（**CRISPR array**）から複数のガイド RNA を発現・成熟化することが可能なため、多重ゲノム編集が容易である。そこで本研究では、**Cas12a** 変異体と **CRISPR array** システムを用いることで、複数エンハンサーの同時活性制御を検討した。まずそれぞれの要素技術の最適化を行った。

本研究では、DNA 切断能を有していない **Cas12a** の変異体（**ddCas12a**）タンパク質に、転写活性化ドメインを融合した活性型 **ddCas12a** を用いた検討を行った。その結果、プロモーター領域のみを活性化した場合と比較して、プロモーター領域とエンハンサー領域を同時に活性化することで、その標的遺伝子の発現誘導が有意に促進されることを確認した。さらに、複数の転写活性化ドメインを、オールインワンで一つのベクターに搭載させることで、通常方法と比較して、転写活性化機能が顕著に増大することを見出した。以上、最適化したベクター

を、PiggyBac 法を用いて細胞に導入することで、本システムを恒常的に発現する細胞株を樹立した。

CRISPR array に導入するガイド RNA の数と、標的遺伝子の発現誘導についての関連を検討した。その結果、ある一定以上の gRNA を 1 つのベクターに導入すると転写活性化の効果が減弱することが明らかになった。次に、エンハンサースクリーニング用のライブラリー構築のため、最適化した数のガイド RNA を効率よくベクターにクローニングする方法を検討した。その結果、オリゴ DNA プールに PCR 増幅と HiFi assembly を介してクローニングすることで、Complexity を保ったままスクリーニング用ライブラリーを構築することが可能になった。以上より、骨芽細胞スーパーエンハンサーと遺伝子制御ネットワークを構築する転写因子群に対するライブラリーを構築した。以上、各要素技術を統合し、現在エンハンサースクリーニングを実施中である。

③ エピゲノム編集による骨再生効果の検証

ヒト間葉系幹細胞 (MSCs) は、その由来や細胞のロットによって、細胞増殖能は分化能にばらつきがあり、骨再生への応用研究が限定的であった。本研究で開発したエピゲノム編集により、このばらつきを是正し、骨再生効果を発揮するか検討した。まず、複数の由来の MSCs を用いた骨芽細胞分化誘導能を比較解析した。その結果、骨髄由来 MSCs および脂肪細胞由来 MSCs は、骨芽細胞分化誘導培地で骨芽細胞への分化が亢進したのに対して、臍帯由来 MSCs は骨芽細胞分化が十分に認められなかった。そこで、これまでの解析により遺伝子発現誘導能が認められた SP7 および DLX5 エンハンサーの活性化をエピゲノム編集により導入した。その結果、それぞれの標的遺伝子の発現誘導に加えて、骨芽細胞分化マーカーの有意な発現増加が認められた。今後、エンハンサースクリーニングにより最適化されたエンハンサーの組み合わせを活性化させることで、さらなる誘導が可能か検討する予定である。また、in vitro 解析に加えて、in vivo 骨欠損に対する骨再生効果についても検討を続けている。

以上より、本研究を通して、ヒト多能性幹細胞から効率よく骨発生を模倣する実験系を確立し、ヒト骨発生モデルにおける遺伝子制御ネットワークの一端を解明した。この中で、新規転写因子 ZEB2 の骨芽細胞分化の役割を明らかにした。さらに Sp7 エンハンサーが骨芽細胞に特異的にはたらき、骨量の維持に重要であることを見出した。また、エンハンサーを標的としたエピゲノム編集技術を最適化し、その効果を骨芽細胞分化において確認した。今後、現在進行中のエンハンサースクリーニングにより、骨芽細胞の運命決定を制御するエンハンサー群の同定と骨再生への応用が期待される。これまでの研究成果をまとめ、2 報の英文原著論文 (*Cell Rep.*40(10):111315,2022; *Cell Rep.* 42(4):112276,2023.) と 2 報の英文総論 (*Int J Mol Sci.*24(3):2979,2023; *Curr Osteoporos Rep.*2023 in press) に発表した。また、本研究成果を、国内学会 3 回および国際学会 3 回で招待講演を受けている。

The goal of this study was to achieve safe and stable bone regeneration regardless of differences in the epigenomic status of cells. To end this, we aimed at (1) understanding epigenetic landscape that regulates cell fate determination and differentiation during osteogenesis in human and (2) development of a method which enable to manipulate the activity of enhancer landscape using a novel epigenome editing method. The following research projects were conducted.

(1) Elucidation of the epigenetic landscape of human bone development

To conduct this study, we first established a method to induce 3D bone tissue from human pluripotent stem cells. By stepwise differentiation of stem cells into sclerotome, which includes osteochondral progenitors, followed by transplantation of the induced sclerotome cells under the renal capsule of immunodeficient mice, 3D bone structure was formed. By histological analysis and single cell RNA-seq (scRNA-seq), we validated that this model recapitulates human endochondral ossification to some extent.

To further understand gene regulatory networks in human bone development, we performed single cell multiome (scRNA-seq and scATAC-seq) analysis. We identified cell-type distinct open chromatin regions. Further computational analysis predicted a network of transcription factors which regulate cell-type specific gene regulations. Among this, we identified ZEB2 as a novel osteoblast determinant by in vitro and in vivo analysis.

We further address super-enhancer which is defined as cluster of enhancers governing cell fate determination and the cell-type specific properties. We identified an SP7 enhancer which is active in osteoblasts. Mouse genetic study further confirmed that the Sp7 enhancer was selectively active in osteoblasts and indispensable for bone mineral density in adulthood.

(2) Development of multiplex enhancer screening method

To achieve a gene expression, multiple enhancers as well as promoter are collectively regulated in a finetuning manner. Cas12a, like Cas9, is capable of guide RNA-dependent DNA cleavage, although the process of guide RNA maturation is different. Cas12a generates multiple mature guide RNAs from a single transcript unit (named as CRISPR array), facilitating multiple-sites genome editing. Therefore, in this study, we aimed at development of an epigenome editing methods which manipulates simultaneous activity of multiple enhancers by using Cas12a mutants and the CRISPR array system.

In this study, we utilized ddCas12a, a mutant of Cas12a without DNA cleavage, fused with a transcriptional activation domain. We confirmed that the simultaneous activation of the promoter and enhancer regions significantly enhanced the induction of target gene expression compared to the activation of only the promoter region. Thus, by introducing the optimized vector into cells using the PiggyBac method, we established a cell line that constantly expresses this system.

We then investigated a relationship between the number of guide RNAs introduced into the CRISPR array and the actual induction of target gene expression. We found that introducing more than a certain number of gRNAs into one vector reduced the effect of transcriptional activation. Thus, we next optimized the cloning method to clone optimized number of guide RNAs into a library vector for enhancer screening. From the human osteoblast enhancer analysis as mentioned early, libraries for osteoblast super-enhancer and a group of transcription factors that construct gene regulatory network was constructed. Using those material, an enhancer screening is now underway.

(3) Investigation of bone regeneration by optimized epigenome editing system

Human mesenchymal stem cells (MSCs) have been the subject of limited research for bone regeneration due to variations in their proliferative and differentiation capacities depending on their origin and cell lot. We investigated whether epigenome editing, developed in this study, could correct this variation and exert bone regenerative effects. First, we performed a comparative analysis of the ability of MSCs derived from multiple sources to induce osteoblast differentiation. As a result, bone marrow-derived MSCs and adipocyte-derived MSCs showed enhanced osteoblast differentiation in the osteoblast differentiation induction medium, whereas umbilical cord-derived MSCs did not show sufficient osteoblast differentiation. Therefore, we utilized our epigenome method to introduce activation of SP7 and DLX5 enhancers. As a result, significant upregulation of osteoblast differentiation marker genes was observed by the epigenome system. In the future, we plan to examine whether further induction is possible by activating a combination of enhancers optimized by enhancer screening. In addition to the in vitro analysis, we are also testing the effect of epigenome editing

method on bone regeneration using a bone defect model in vivo.