

65. ヒト ES 細胞由来肢芽間葉を用いた骨軟骨運命決定の理解

大庭 伸介

*大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分化発育情報学講座・口腔解剖学第一教室

Key words : ヒト多能性幹細胞, 軟骨内骨化, 骨芽細胞, 軟骨細胞, シングルセル解析

緒言

四肢・体幹の骨・軟骨組織の多くは中胚葉（沿軸中胚葉・側板中胚葉）に由来し、軟骨内骨化によって形成される。軟骨内骨化の最初のステップでは、凝集した間葉系細胞から骨軟骨前駆細胞が生じる（図1）。骨軟骨前駆細胞は運命決定プロセスに入り、骨形成を担う骨芽細胞と軟骨形成を担う軟骨細胞へと運命が分かれる。このとき、転写因子 Sox9 は間葉凝集と軟骨細胞分化に、Runx2 は軟骨細胞の成熟と骨芽細胞への運命決定に、Sp7 は骨芽細胞分化に必須とされている [1, 2]（図1）。

骨芽細胞と軟骨細胞の分化モデル

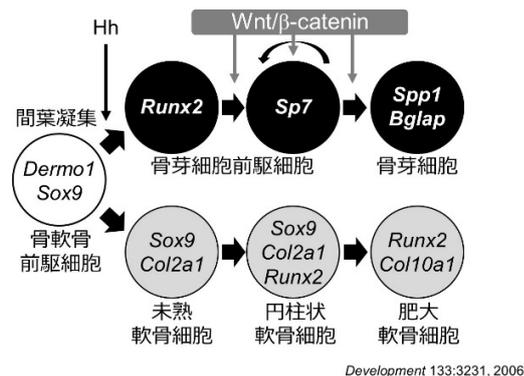


図1. 骨芽細胞と軟骨細胞の分化モデル

骨芽細胞分化ではRunx2およびSp7が、軟骨細胞分化ではSox9がマスター転写因子として働く。

細胞運命の決定や分化は、種々のシグナル入力に対して遺伝子発現として出力されることで達成されるため、一連の過程の根幹にあるのは遺伝子の発現である。1957年にConrad H. Waddingtonによって提唱されたエピジェネティックランドスケープは、この視点を視覚的に理解できるモデルである。本モデルは、①細胞の運命決定（分化）は、ボールが地形を転がるようにランドスケープ（地形）によって規定され、②このランドスケープ（地形）は、杭（遺伝子）と紐（遺伝子相互作用）からなる裏打ち構造、つまり遺伝子発現制御機構によって決定されると提唱している。近年の次世代シーケンサー（NGS）と生物情報学（バイオインフォマティクス）による解析は、この概念をほぼ実証しつつある。我々も、マウス初代骨格系細胞において、NGSを用いたクロマチン免疫沈降シーケンシング（chromatin immunoprecipitation-sequencing: ChIP-seq）による転写因子結合領域解析・エピゲノム解析を行い、活性型エンハンサーのクラスターである「スーパーエンハンサー」を軟骨関連遺伝子周囲に見出したほか、軟骨細胞と骨芽細胞のマスター転写因子（Sox9, Sp7）による作動様式を明らかにしてきた [3~6]。さらに最近、骨芽細胞と軟骨細胞のエンハンサーランドスケープの形成と維持におけるRunx2の作動様式を明らかにした [7]。このように、骨・軟骨運命決定と分化の分子機構、特にマスター転写因子群による遺伝子発現制御機構に関しては、マウス等のモデル動物において知

見が集積されている。しかしながら、ヒトにおけるそれらの妥当性と分子メカニズムについては検証されていない。さらに、エピジェネティックランドスケープモデルの観点から骨・軟骨分化決定機構を考えたとき、分化を規定するランドスケープの裏打ち構造の全容は不明なままである。

そこで本研究では、胚性幹細胞 (ES 細胞) および人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) といったヒト多能性幹細胞の間葉系細胞誘導系を用いてヒトの骨格発生における軟骨内骨化過程を再現し、各段階の遺伝子発現プロファイルとオープンクロマチン領域を単一細胞レベルで明らかにすることを目指した。一連のデータをもとに、ヒトの軟骨内骨化過程における細胞系譜を追跡しながら、遺伝子発現制御ネットワークの観点から異なる中胚葉 (沿軸中胚葉～椎板、側板中胚葉～肢芽間葉) における骨・軟骨の細胞運命決定機構を比較することを最終目標とした。その結果、インビトロでヒト多能性幹細胞から沿軸中胚葉および体節を介して椎板細胞を誘導し、マウス腎被膜下に移植することで軟骨内骨化を再現する手法を開発した [8]。さらに、インビトロでヒト多能性幹細胞から側板中胚葉を介して肢芽間葉系細胞を誘導する手法も見出しつつある。続いてヒト多能性幹細胞由来椎板細胞から作製された軟骨内骨化組織において single-cell RNA-seq (scRNA-seq) および single-cell ATAC-seq (scATAC-seq) を行い、統合的にデータを解析した結果、沿軸中胚葉～椎板に由来する軟骨内骨化における遺伝子制御ネットワークのモデルを取得した [8]。このように、異なる中胚葉 (沿軸中胚葉～椎板、側板中胚葉～肢芽間葉) において骨・軟骨の細胞運命決定機構を比較する準備が整いつつある。

方法、結果及び考察

1. ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) 由来間葉系細胞を介した軟骨内骨化誘導系の開発

頭蓋骨の一部と体幹の骨の多くは、沿軸中胚葉から体節を経て発生した椎板に存在する骨格系前駆細胞によって、軟骨内骨化により形成される。一方、四肢の骨は側板中胚葉より発生した肢芽間葉系細胞より、軟骨内骨化によって形成される。そこで、ヒト多能性幹細胞から骨発生過程を再現する誘導系の開発を行った。基礎培地の種類・組成、培養期間、各種シグナル経路の活性を調節する低分子化合物の処理濃度と期間の最適化を試み、以下の結果を得た。

沿軸中胚葉～椎板の誘導においては、Wnt、Hedgehog (Hh)、transforming growth factor (TGF) - β 、bone morphogenetic protein (BMP) の各種シグナルを調節する 5 種類の低分子化合物 (CHIR, A83-01, LDN-193189, C59, SAG) を段階的に 2 次元培養系で用いることで、5 日間で椎板細胞を誘導するプロトコルを確立した。さらに、誘導した椎板細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植すると、2 カ月頃よりマイクロ CT 上で X 線不透過性の構造物が出現し、そのサイズは経時的に増大していった。移植後の各時点で構造物の組織学的解析を行うと、軟骨内骨化によって発生する長管骨に類似した組織構造を有することが明らかとなった (図 2)。

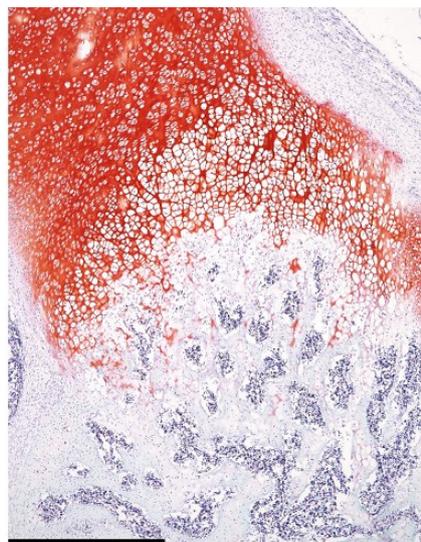


図 2. マウス腎被膜下においてヒト多能性幹細胞由来椎板細胞から形成された組織
サフラニン O 染色像を示す。軟骨部分が赤く染まっている (スケールバー: 1 mm)。

移植後 8 週では、主要な軟骨基質蛋白質である II 型コラーゲンや軟骨形成のマスター転写因子 Sox9 を発現する未熟な軟骨細胞と、X 型コラーゲンを発現する肥大軟骨細胞が分化段階に沿って整列していた。移植後 4 か月になると、肥大軟骨細胞周囲で骨組織への置換を認め (図 1)、骨組織の周囲には骨形成のマスター転写因子 Runx2 と Sp7 を発現する細胞を確認した。また、血管侵入と血球系細胞を含む骨髓様組織の形成も認めた。ヒト抗核抗体を用いた免疫染色により、誘導された組織のうち、骨格系細胞はヒト細胞 (=移植したヒト多能性幹細胞由来) であることが明らかとなった。以上より、本法はヒト多能性幹細胞から沿軸中胚葉～体節～椎板を経て、骨発生過程を模倣しながら軟骨内骨化を再現する手法となると考えられた。一連の手法については特許出願 (PCT/JP2022/011216、大庭伸介ほか 3 名「椎板細胞の製造方法および該椎板細胞の利用」)、および学術雑誌上で発表に至った [8]。

側板中胚葉から枝芽間葉系細胞の誘導においても、枝芽発生に重要な数種のシグナル経路を調節する低分子化合物の組み合わせを同定し、基礎培地の種類・組成、培養期間、低分子化合物の処理濃度と期間の最適化を試みた。その結果、インビトロにおいて後部原始線条および側板中胚葉に特異的な遺伝子発現パターンを示しながら、Prrx1 陽性の枝芽間葉系細胞を 3 日間で誘導するプロトコルを開発した。本誘導系および誘導された細胞の詳細な解析は現在進行中である。

2. 軟骨内骨化誘導系の各段階における single-cell (sc) RNA-seq 及び scATAC-seq

1. で確立したヒト多能性幹細胞由来椎板細胞を用いた軟骨内骨化誘導系において、分化誘導前、沿軸中胚葉～体節～椎板細胞誘導時、腎被膜下移植後の軟骨内骨化初期 (7 週)、腎被膜下移植後の軟骨内骨化後期 (19 週) の scRNA-seq データを取得した。遺伝子発現パターンをもとにクラスタリングを行い、細胞集団の特徴づけを行った。その結果、分化誘導前には多能性関連遺伝子である NANOG を発現する細胞集団として存在するが、椎板細胞誘導後には椎板関連遺伝子である PAX1, PAX9 等を発現する細胞が出現することが確認された [8]。椎板細胞誘導後には半分以上の細胞が椎板関連遺伝子を発現していることが明らかとなった [8]。RNA velocity 解析により細胞状態の遷移予測を行うと、体節関連遺伝子は発現減少に向かい、椎板関連遺伝子は発現上昇を示していた [8]。したがって、椎板細胞集団では体節の形質を喪失しながら、椎板の形質を獲得する方向に進んでいると考えられた。

次に、椎板細胞より誘導された軟骨内骨化初期と後期の scRNA-seq データを統合的に解析した。その結果、誘導された軟骨内骨化構造体は、①未分化な骨軟骨前駆細胞様集団、②各分化段階の軟骨細胞系列、③各分化段階の骨芽細胞系列、④血球・血管系細胞集団、から構成されていた [8]。発現遺伝子の配列から、骨格系細胞 (①～③) はヒト細胞であり、血球・血管系の細胞 (④) はマウス細胞であることが明らかとなった [8]。本結果は、組織学的所見を支持すると同時に、異種由来の細胞群が協調して骨・骨髓環境を構築していることを示唆していた。実際、生体の骨組織で認められるリガンドと受容体の遺伝子がそれぞれヒトとマウスの細胞で発現していたことから、相互に作用していると考えられた [8]。興味深いことに、軟骨内骨化初期のサンプルには骨軟骨前駆細胞様集団および軟骨細胞が多く、後期のサンプルには骨芽細胞が増加していた。さらに、血球・血管系細胞集団の多くを後期のサンプルでのみ認めた [8]。このことは、生理的な軟骨内骨化の過程 (軟骨形成に続く骨への置換と骨髓形成) を反映するものと考えられた。ヒト胎児の長管骨の公共データと統合して解析したところ、本法がヒト胎児の骨発生過程を部分的に再現していることも示唆された [8]。

最後に、軟骨内骨化後期のサンプル (腎被膜下移植後 20 週) に対して、single-cell multiome (scRNA-seq・scATAC-seq) を行った。遺伝子発現プロファイル (scRNA-seq) とオープンクロマチンプロファイル (scATAC-seq) に基づいてクラスタリングを行ったところ、10 種の細胞集団の存在が明らかとなった [8]。

3. ヒトの骨・軟骨形成における系譜予測・遺伝子ネットワーク解析

2. の single-cell multiome データにおいて、各細胞集団のオープンクロマチン領域と遺伝子発現の相関関係を解析したところ、各細胞集団に特異的なオープンクロマチン状態とその近傍に存在する遺伝子の発現の相関性が確認された。さらに、オープンクロマチン領域における各転写因子のモチーフ解析を行うとともに、各転写因子の遺伝子発現とモチーフの集積状態を統合的に解析した。その結果、各細胞集団において異なる転写因子群が活性化している状態 (遺伝子

制御ネットワーク) が明らかとなった。本データは、ヒト軟骨内骨化における遺伝子制御ネットワークのモデルとなりうると考えられた [8]。

以上のように、ヒト沿軸中胚葉由来軟骨内骨化において複数の転写因子群が形成する遺伝子制御ネットワークが予測された。前述のように側板中胚葉由来軟骨内骨化を誘導するための実験系の開発も進んでいる。側板中胚葉由来の軟骨内骨化が達成され次第、2.および3.と同様に **single-cell multiome** とそのデータ解析を行う予定である。このように、異なる中胚葉 (沿軸中胚葉～椎板、側板中胚葉～肢芽間葉) において骨・軟骨の細胞運命決定機構を比較する準備が整いつつある。一連の **single-cell** 解析のデータは公共データベースに登録されていることから、本研究はヒトの骨発生を理解するための貴重なリソースを提供すると考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センターの北條宏徳准教授、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の松下祐樹准教授、同情報データ科学部の松本拓高准教授である。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謝いたします。

文 献

- 1) Ohba S. Genome-scale actions of master regulators directing skeletal development. *Jpn Dent Sci Rev.* 2021;57:217-23. PMID: 34745394; DOI: 10.1016/j.jdsr.2021.10.001.
- 2) Hojo H, Ohba S. Sp7 Action in the Skeleton: Its Mode of Action, Functions, and Relevance to Skeletal Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10) . PMID: 35628456; DOI: 10.3390/ijms23105647.
- 3) Ohba S, He X, Hojo H, McMahon AP. Distinct Transcriptional Programs Underlie Sox9 Regulation of the Mammalian Chondrocyte. *Cell reports.* 2015;12(2) :229-43. PMID: 26146088; DOI: 10.1016/j.celrep.2015.06.013.
- 4) 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. PMID: 27471255; DOI: 10.1242/dev.134502.
- 5) 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. PMID: 27134141; DOI: 10.1016/j.devcel.2016.04.002.
- 6) Hojo H, McMahon AP, Ohba S. An Emerging Regulatory Landscape for Skeletal Development. *Trends Genet.* 2016;32(12) :774-87. PMID: 27814929; DOI: 10.1016/j.tig.2016.10.001.
- 7) Hojo H, Saito T, He X, Guo Q, Onodera S, Azuma T, et al. Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. *Cell Rep.* 2022;40(10) :111315. PMID: 36070691; DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111315.
- 8) Tani S, Okada H, Onodera S, Chijimatsu R, Seki M, Suzuki Y, et al. Stem cell-based modeling and single-cell multiomics reveal gene-regulatory mechanisms underlying human skeletal development. *Cell Rep.* 2023;112276. PMID: 36965484; DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112276.