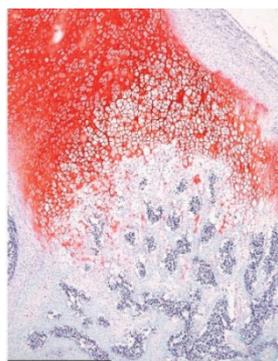


**【目的】** 骨・軟骨運命決定と分化の分子機構、特にマスター転写因子群による遺伝子発現制御機構に関しては、マウス等のモデル動物において知見が集積されている。しかしながら、ヒトにおけるそれらの妥当性と分子メカニズムについては検証されていない。そこで本研究では、胚性幹細胞（ES 細胞）および人工多能性幹細胞（iPS 細胞）といったヒト多能性幹細胞の間葉系細胞誘導系を用いてヒトの骨格発生における軟骨内骨化過程を再現し、各段階の遺伝子発現プロファイルとオープンクロマチン領域を単一細胞レベルで明らかにすることを目指して行われた。一連のデータをもとに、ヒトの軟骨内骨化過程における細胞系譜を追跡しながら、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。

**【方法】** ヒト多能性幹細胞より軟骨内骨化過程を再現する誘導系の開発を行った。続いて、誘導した椎板細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植し、形成された組織を放射線学的、組織学的に解析した。また、一連の誘導系における複数のポイントで single-cell RNA-seq (scRNA-seq) および single-cell ATAC-seq (scATAC-seq) を行い、取得したデータをバイオインフォマティクス的手法により解析した。

**【結果】** 沿軸中胚葉～椎板の誘導においては、Wnt、Hedgehog (Hh)、transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 、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)。側板中胚葉から肢芽間葉系細胞の誘導においても、肢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が完了しつつある。次に、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、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。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。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。single-cell multiome データにおいて、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。以上の通り、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。

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軟骨内骨化組織



(スケールバー : 1 mm)