

博士論文

ヒト多能性幹細胞を用いた骨組織形成と
1 細胞解析によるヒト骨発生機序の解明

谷 彰一郎

博士論文

ヒト多能性幹細胞を用いた骨組織形成と
1 細胞解析によるヒト骨発生機序の解明

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

整形外科

指導教員 田中 栄教授

氏名 谷 彰一郎

目次

要旨	p. 8
序文	p. 9-17
第1章 ヒト多能性幹細胞を用いた椎板細胞の誘導の最適化	
背景と目的	p. 18-20
1-1 材料と方法	p. 21-27
1-1-1 細胞培養	
1-1-2 分化誘導	
1-1-3 RNA 抽出および RT-qPCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)	
1-1-4 統計学的解析	
1-1-5 RNA-seq (RNA sequencing) 解析	
1-1-6 1細胞 RNA-seq 解析	
1-2 結果	p. 28-40
1-2-1 低分子化合物の最適化	

1-2-2	椎板細胞誘導の妥当性の検証	
1-2-3	誘導した椎板細胞の多様性の検証	
1-3	小括	p. 41
第2章 ヒト多能性幹細胞由来骨組織の誘導		
	背景と目的	p. 42
2-1	材料と方法	p. 43-47
2-1-1	免疫不全マウスへの細胞移植	
2-1-2	In vivo micro-CT による組織形成評価	
2-1-3	組織切片の作成	
2-1-4	組織染色	
2-1-5	免疫組織染色	
2-2	結果	p. 48-51
2-2-1	ヒト多能性幹細胞由来椎板細胞移植後の組織形成	
2-2-2	誘導骨組織における組織学的評価	
2-3	小括	p. 52

第3章 ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する1細胞RNA-seq解析

背景と目的	p. 53
3-1 材料と方法	p. 54-55
3-1-1 骨組織誘導および細胞の単離	
3-1-2 1細胞RNA-seq解析	
3-1-3 ヒト胎児長管骨データセットとの統合解析	
3-2 結果	p. 56-62
3-2-1 ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する1細胞RNA-seq解析	
3-2-2 ヒト骨格系細胞に対する1細胞RNA-seq解析およびヒト胎児データセットとの統合解析	
3-3 小括	p. 63

第4章 ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する1細胞多層解析

背景と目的	p. 64-65
4-1 材料と方法	p. 66-67
4-1-1 骨組織誘導および細胞の単離	
4-1-2 1細胞多層解析	
4-2 結果	p. 68-76
4-2-1 ヒト多能性幹細胞由来骨組織における1細胞多層解析	
4-2-2 誘導骨組織におけるクロマチンアクセシビリティ動態の検証	
4-2-3 骨芽細胞分化系譜に特異的な転写制御因子の探索と同定	
4-3 小括	p. 77

第5章 ヒト骨芽細胞分化系譜に特異的な転写制御因子の機能解析

背景と目的 p. 78-79

5-1 材料と方法 p. 80-88

5-1-1 *in situ* hybridization

5-1-2 *Zeb2-EGFP* ノックインレポーターマウス

5-1-3 組織染色・免疫組織染色

5-1-4 Short hairpin RNA による *ZEB2* ノックダウン

5-1-5 細胞培養と骨芽細胞分化誘導

5-1-6 RNA-seq 解析

5-1-7 発現ベクターおよび *ZEB2* の過剰発現

5-1-8 RT-qPCR

5-1-9 統計学的解析

5-2 結果 p. 89-95

5-2-1 ヒト多能性幹細胞由来骨組織における *ZEB2* の組織学的解析

5-2-2 *Zeb2-EGFP* ノックインマウスにおける *ZEB2* の組織学的解析

5-2-3 ヒト間葉系幹細胞における *ZEB2* ノックダウンを用いた遺伝子発現解

析

5-2-4	ヒト間葉系幹細胞における <i>ZEB2</i> 発現ベクターを用いた遺伝子発現解析	
	析	
5-3	小括	p. 96
	考察	p. 97-111
	表	p. 112
	謝辞	p. 113
	参考文献	p.114-121

要旨

高齢人口の増加に伴い、既存の医療技術では対処困難な Unmet Needs の増加を背景に再生医療への期待が高まっている。新しく治療法を開発するうえで、目的とする組織や臓器の生理的・病理的機序を理解することは不可欠である。一方で、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell: iPS 細胞）の登場により、様々な細胞種へ分化可能な多能性幹細胞の応用が期待されているが、複数の細胞種が織りなす 3 次元組織を再現することは困難である。本研究では、ヒト多能性幹細胞を体幹骨の起源である椎板へ分化誘導し、マウス体内に移植することでヒトの骨発生（内軟骨性骨化）を再現する骨組織を作製することに成功した。さらに、1 細胞解析を用いて、ヒトの骨発生における遺伝子発現およびオープンクロマチン領域の動的な変化を詳細に検討し、ヒト骨発生における転写制御ネットワークの一端を担う因子を新たに同定した。本研究によって得られた、ヒト骨発生に関する多様な細胞種の遺伝子発現・オープンクロマチンプロファイルは、骨格形成における転写制御ネットワークの全貌解明への寄与が期待される。また、本研究で用いた手法は、他の臓器や疾患に対しても広く汎用性を有し、ヒト多能性幹細胞研究における一連の研究手法のマイルストーンとして、生物学・医学研究領域の発展に寄与するものと考えられる。

序文

医療の進歩による平均寿命の延伸で超高齢社会を迎えた我が国では、健康寿命への関心の高まりも背景として医療ニーズが増大している。特に高齢者における変形性関節症や骨粗鬆症、がん患者の骨転移に代表される運動器関連の変性・喪失性疾患は増加し、ADL・QOLの低下や介護負担の増大の主要な原因となっている。既存の治療では対処が困難な病態に対して、再生医療が注目を浴びて久しい。しかし、潜在的な需要を満たす安全性と供給（質と量）を両立した治療法は未だ確立されていない¹。近年、ヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell；iPS細胞）・胚性幹細胞（embryonic stem cell；ES細胞）などの多能性幹細胞を用いることで、ヒトとモデル動物の間の種差やヒトを対象にした研究への倫理的な問題が解消される可能性が示されているが、骨領域への応用は未だ限定的である²。

多能性幹細胞とは、細胞分裂による自己複製能を有し、生体を構成する全ての細胞へ分化する能力を有する細胞集団である。ES細胞の樹立には、ヒト初期胚の胚盤胞から細胞を取り出すことが必要であるため、倫理的な問題が存在する。一方で、近年開発されたiPS細胞は、体細胞に特定の遺伝子群を導入することで樹立される。したがって、胚を使用するES細胞と比較して、倫理的な制約が少

ないことが特徴である。両者は厳密には同等ではないものの、分化能の点で多能性幹細胞として同等に扱われることが多い¹。

マウスやヒトの多能性幹細胞を用いた今までの研究で、様々な臓器を構成する特定の細胞種へ分化誘導する方法が多く報告されている¹。骨格を構成する主要な細胞である軟骨細胞や骨芽細胞も例外ではない^{3,4}。また、多能性幹細胞から機能的な組織・臓器を一部再現するオルガノイド研究が進んでおり、病態の解明や治療法開発に向けて注目を集めている^{5,6,7}。骨格組織においては、特に軟骨の作製法の開発が進んでおり、すでに多能性幹細胞から作製した軟骨組織の臨床応用に向けた治験が開始されている^{1,3,8,9}。しかし、ヒト多能性幹細胞から3次元骨組織を作製したという報告は未だなく、臨床応用に向けた研究開発は、軟骨や他の臓器と比較して遅れているのが現状である。骨組織研究が難しい理由の一つとして、骨が体内でも有数の硬組織であり、組織観察や細胞抽出が技術的に難しいという側面がある。また、血管や神経、脂肪など様々な細胞種が、骨組織の形成に複雑に関係しあっていることも再現が難しい理由と考えられる。この点は、比較的均質な細胞集団で構成される軟骨との大きな差である。

骨の形成過程は、膜性骨化と内軟骨性骨化に分けられる。膜性骨化は胎生期に未分化間葉系細胞が骨芽細胞へと分化することで骨組織を形成する過程で、頭

蓋骨と顎顔面骨の一部、および鎖骨の形成に関与している²。一方で内軟骨性骨化は、間葉凝集に続いて軟骨原基が形成され、軟骨細胞の増殖と分化を経て骨組織へと置換される過程で、体幹や四肢の長管骨の形成に関与している²。

人体の骨組織には3つの起源があり、主に頭部・顔面の骨を構成する神経堤、体幹骨を構成する沿軸中胚葉、四肢の骨を構成する側板中胚葉と大きく分類することができる^{2,10}。ただし四肢の筋組織は、体幹と同様に沿軸中胚葉から派生した皮筋板から形成される¹⁰。神経堤が、主に膜性骨化を経て顔面や頭蓋の骨形成を行うのに対して、沿軸中胚葉や側板中胚葉は、そのほとんどを内軟骨性骨化によって形成するという特徴を有する²。したがって、骨組織の成り立ちを考えると、軟骨組織形成および内軟骨性骨化の機序を理解することは不可欠である。

沿軸中胚葉と側板中胚葉は、共に同じ中胚葉に分類され、原腸陥入における原始線条および尾芽から生じる¹⁰。その解剖学的位置関係によって、前原始線条から沿軸中胚葉が発達し、体節形成を経て皮筋板と椎板へと分化する(図1a)。皮筋板は、その名の通り皮膚および筋組織へ分化し、椎板は脊椎をはじめとした体幹を構成する骨、靭帯、血管、髄膜など様々な組織へ分化することが知られている¹⁰。また、中および後原始線状から側板中胚葉が発達し、四肢の骨格だけでな

く、心血管や血液を含めた循環器系など様々な組織へ分化することが知られている¹⁰。

中胚葉形成初期では、Wnt シグナルおよび BMP (Bone Morphogenic Protein) シグナルが、特に重要な役割を果たすことが知られている。Wnt シグナルが、原始線条や (沿軸) 中胚葉の発達を促進する一方で、BMP 阻害因子である Noggin によって形成される BMP シグナルの勾配が、沿軸中胚葉形成を抑制し、側板中胚葉形成を促進する (図 1a-c)。つまり、BMP シグナルが弱い部位では沿軸中胚葉、強い部位では側板中胚葉が形成される (中間部分においては中間中胚葉が形成され、将来的に腎臓や生殖腺へ分化する)¹⁰。さらに沿軸中胚葉では、分節時計および間葉上皮移行からなる体節形成過程を経て分節構造が形成され、椎体や肋骨といった構造が形成される (図 1a-b)¹⁰。分節時計は Notch シグナル、FGF (Fibroblast growth factor) シグナル、Wnt シグナルの相互作用によって制御されており、その濃度勾配が周期的に変動することで、順々に体節が形成される¹⁰。体節形成後は、腹側の神経管や軸索より産生される Noggin や Sonic hedgehog によって椎板へ、背側の上皮組織より産生される Wnt シグナルによって皮筋板への運命決定が起こる (図 1b-c)¹⁰。このように、解剖学的な位置関係に基づく複

数のモルフォゲン濃度勾配に応じて様々な細胞が分化し、解剖学的構造が形成されていく (図 1c)。

モルフォゲンの組み合わせが明らかになることで、多能性幹細胞から目的とする胚葉、および各胚葉から派生する細胞種への分化誘導法の開発が発達してきた (図 1b) ¹¹⁻¹⁵。主な戦略としては、発生学的知見に基づいて、各発生段階に最適な誘導因子を段階的に組み合わせることで、目的とする臓器に特異的な細胞種を誘導することが一般的になりつつある。また、オルガノイドに代表される 3次元培養を用いる報告も散見される ^{3,6,15-17}。しかし、その分化誘導の効率や再現性、簡便性や経済性など様々な面で障壁が依然として存在するのも事実であり、将来的にさらなる最適化が必要である。

一方で、実際の骨格組織の成り立ちは複雑で、構成する細胞種や基質、各シグナルや細胞間相互作用など、多種多様な要素によって構成されている。そのため、既存の研究手法では、組織の複雑性や動態を正確にとらえることは困難であった。しかしながら、近年の次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing: NGS) の開発と 1細胞解析技術の発展により、多様な細胞で構成される組織における遺伝子発現やエピゲノム状態を、1細胞レベルでゲノムワイドに解析することが可能になりつつある ¹⁸。これによって、今まで細胞集団の総和 (Bulk) でしか見

えなかった遺伝子発現やエピゲノム状態が、1細胞毎に観察できるようになった¹⁸。そのため、細胞間相互作用や細胞の状態変化を、より詳細かつ多元的に捉えることが可能となり、新たな分子機序等の発見につながってきている¹⁹。さらに、将来的な疾患の病態解明や新規治療法の開発も期待される。

以上を踏まえて、本研究では将来的な骨系統疾患に対する治療法、特に骨再生法の確立を念頭に、次の点を目標とした。第一に、ヒト多能性幹細胞から骨格組織を形成する分化誘導法の確立を目指した。第二に、その骨発生過程における分子メカニズムの解析を目指した。最後に、それらに基づいて、ヒト骨発生研究の基盤構築および骨発生機構の解明を目指した。具体的には、まず初めに、既存の発生生物学的知見や多能性幹細胞の分化誘導法をもとに、沿軸中胚葉から派生する椎板細胞への分化誘導法の最適化を試みた。続いて、*in vitro* 培養系では再現困難な骨組織形成を、免疫不全マウス体内への細胞移植によって誘導することを試みた。分化誘導や骨組織形成の妥当性を検証するために、遺伝子発現解析と組織学的解析を行った。さらに、細胞分化や組織形成に対して1細胞解析を用いることで、分化や組織形成過程の系譜および分子機序を詳細に検討した。加えて、遺伝子発現とエピゲノム状態を1細胞単位で同時に解析可能な1細胞多層解析を用いることで、骨形成における転写制御ネットワークを解析した。さらに、

この転写ネットワークを構成する新規転写因子を探索・同定し、その機能解析を *in vitro* および *in vivo* で行った。

図 1

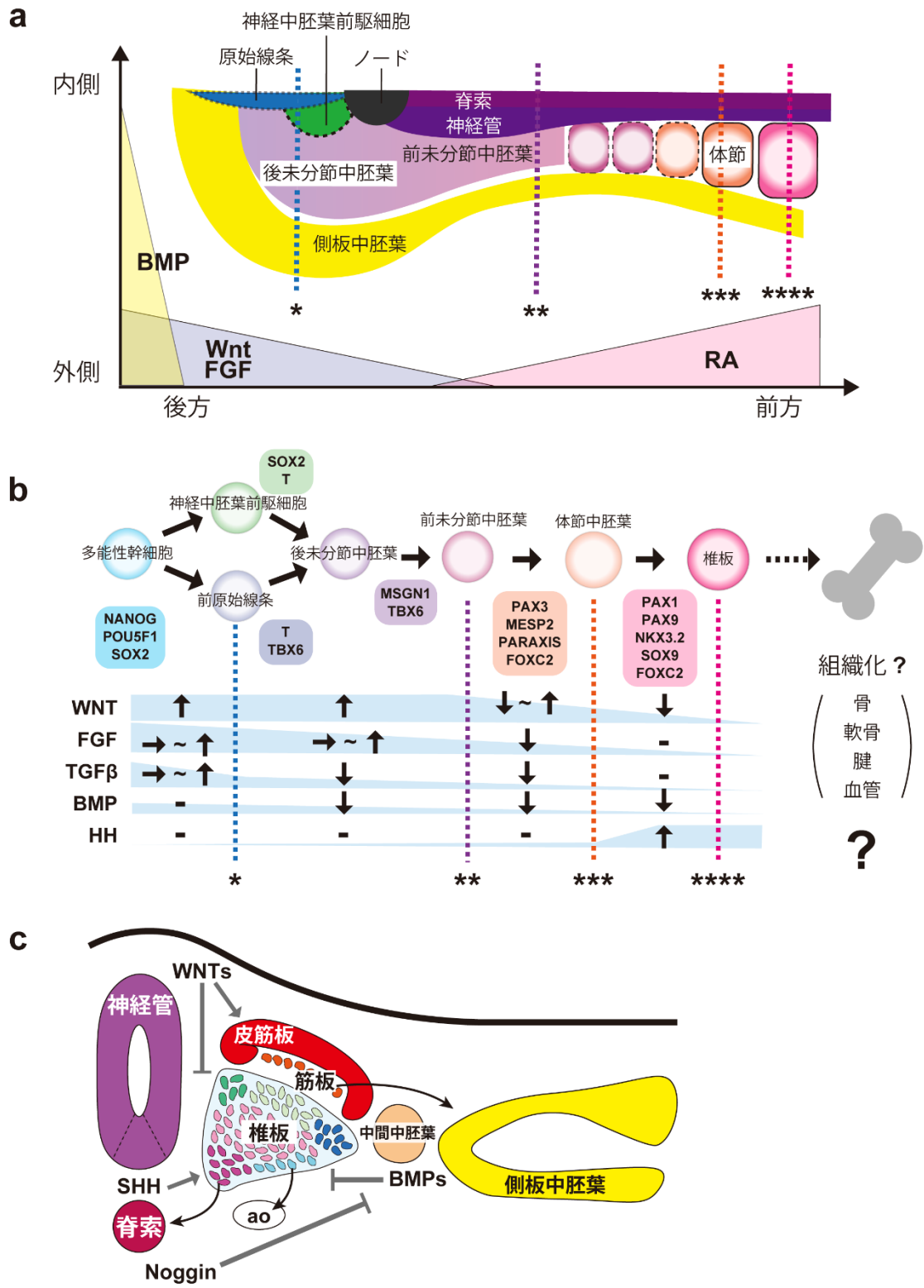


図 1：発生における沿軸中胚葉の分化過程¹⁰

(a)胎児発生におけるモルフォゲン濃度勾配による前後軸・内外側軸に基づいた細胞の運命決定の過程。(b)aの各段階における主要なシグナル因子の関係性。(c)椎板細胞の多様性とそれを生み出す解剖学的な位置関係およびシグナル因子。

BMP : Bone morphogenic protein、FGF : Fibroblast growth factor、TGF β : Transforming growth factor beta、RA : Retinoic acid、HH : Hedgehog、SHH : Sonic hedgehog、ao : 背側大動脈

第1章 ヒト多能性幹細胞を用いた椎板細胞の誘導の最適化

背景と目的

椎板は沿軸中胚葉より派生し、四肢と同様に主に内軟骨性骨化によって体幹の骨格を形成することから、内軟骨性骨化を研究する上で有用な細胞起源の一つである¹⁰。ただし、モデル動物を用いる場合と比較して、ヒトの組織、特に胎児を研究に用いることは倫理上非常に困難であり、胎生後期においては不可能である。よって、多能性幹細胞を用いて胎生期中胚葉や、それに続く骨発生を再現することは、この問題を解決する現時点で最も有効な手段といえる。

沿軸中胚葉の発生過程の理解は、モデル動物およびヒト胎児を用いた研究により進められ、原始線条から体節中胚葉、椎板に至る一連の分化に関与する主要なシグナル経路が、種を超えて保存されていることが明らかになってきた^{10,20}。これまでヒト多能性幹細胞を用いた沿軸中胚葉への *in vitro* 分化誘導法が、複数報告されている^{12,20,21}。しかしながら、既存の分化誘導法には次に示す2つの改善点があると考えられた。第一に、分化誘導法が煩雑であったり、高価なペプチド試薬が必要であるため、再現性とコストの改善が求められる^{12,21}。第二に、既存の手法の中には、異種動物由来の成分や組成不明な成分が使用されている場

合がある¹²。そのため、臨床応用を考えた場合、免疫応答や未知の感染性の可能性を完全には除去しきれない可能性があると考えられる（表1）。

そこでまず、組成が完全に既知であり、かつ異種動物由来の成分を含まない条件を前提に、簡便で再現性の高い、多能性幹細胞から椎板への分化誘導法を確立することを目指した。すでに研究室で確立された簡便な基礎培地を使用し、加えて、費用やロット差が生じうる組換えタンパク質製剤の使用を回避することを目標として、主要なシグナル経路を活性化または阻害する低分子化合物の組み合わせを最適化することを試みた⁴。椎板への分化誘導を検証するため、quantitative reverse transcription polymerase chain reaction（RT-qPCR）法を用いた分化マーカー遺伝子の発現解析に加えて、RNA sequencing（RNA-seq）を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。これにより多能性幹細胞から椎板までの各分化段階における遺伝子発現プロファイルに基づき、分化誘導法の妥当性を評価した。

椎板は、周囲組織から様々なシグナル因子を複雑な濃度勾配に従って受け取っているため、前後軸・背腹軸に沿って多様な性質をもった細胞集団が構成される¹⁰。*in vitro* 分化誘導においても同様に、異なるスペクトラムの椎板細胞が存在しうると考えられるが、その多様性については十分に明らかになっていなか

った^{10,12,21}。そこで、この点の検証を目的として、多能性幹細胞から誘導した椎板細胞に対して1細胞 RNA-seq 解析を行い、各細胞の性質を1細胞単位で評価した。

1-1 材料と方法

1-1-1 多能性幹細胞培養

共同研究者もしくは理研バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) より提供されたヒト多能性幹細胞を使用した。ヒト iPS 細胞: hiPSC-1⁴、hiPSC-2 (201B7; HPS0063)²²、hiPSC-3 (Nips-B2; HPS0223)²³、およびヒト ES 細胞: hESC-1 (SEES3)²⁴、hESC-2 (H9Zn2.3GFP)²⁵。いずれの細胞も、下記の方法で培養、継代、保存、播種した。なお、本研究における細胞培養は、すべて 37 °C、CO₂ 濃度 5 %、および湿潤環境で行った。

培地には、Essential 8 medium (以下 E8 と省略; Thermo Fisher Scientific, A1517001) を使用し、recombinant human vitronectin (Gibco、A14700) をあらかじめコーティング (5 µg/mL となるよう D-PBS(-) に希釈して使用し、室温で 1 時間静置) した培養ディッシュを用いた。培地交換は毎日行い、Subconfluent な状態になったタイミングで、適宜継代ないしは凍結保存を行った。細胞の解離は、D-PBS(-) (Wako、049-29793) で細胞を洗浄後、D-PBS(-) で希釈した 0.5 mM EDTA (Gibco、15575-020) を用いて行った。解離液を除去後、播種の場合は 1 mL の E8 培地、保存の場合は 10 % DMSO (Dimethyl sulfoxide; Wako、031-24051) を添加した E8 培地で細胞を回収し、培養ディッシュへ播種ないしは凍結保存チューブへ回収した。

改めて細胞を播種する場合で、特に細胞の生存率が低い場合は、E8 培地に 10 μ M ROCK 阻害薬 (Y-27632 ; Wako、259-00613) を添加した。

1-1-2 分化誘導

Subconfluent な状態まで培養したヒト多能性幹細胞を、0.5 mM EDTA を用いて解離し、10 回程度の愛護的なピペッティング操作で小さなコロニーないしは 1 細胞まで分離した。回収した細胞は、1 μ M ROCK 阻害薬 (Thiazovivin ; Sigma、SML1045) を添加した E8 培地に再懸濁し、およそ 1:12-1:36 程度を目安に、vitronectin コーティングした培養ディッシュへ播種した。

椎板細胞への分化誘導では、以下の通り調整した基礎培地 (BIM : B27/ITS based medium) を使用した : DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific、11330032)、1 % B27 Supplement Xeno-Free (Thermo Fisher Scientific、A148601)、1 % ITS Liquid Media Supplement (Sigma-Aldrich、I3146)、1 % MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Thermo Fisher Scientific、11140050)、55 μ M 2-Mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific、21985023)。なお、比較実験に用いた既存法で使用される基礎培地 (CDM2) は文献通りに作製した (表 1) ²¹。

<0-1日目：原始線条誘導>

D-PBS(-)で洗浄後、BIM に 5 μ M CHIR99021 (Tocris、4423) を添加して約 24 時間培養した。

<1-2日目：未分節中胚葉誘導>

BIM に 5 μ M CHIR99021、1 μ M A-83-01 (Tocris、2939)、および 0.25 μ M LDN193189 (Sigma、SML0559) を添加して約 24 時間培養した。

<2-3日目：体節中胚葉誘導>

D-PBS(-)で洗浄後、BIM に 1 μ M C59 (Cellagen Technology、C7641-2S)、1 μ M A-83-01、および 0.25 μ M LDN193189 を添加して約 24 時間培養した。

<3-5日目：椎板誘導>

D-PBS(-)で洗浄後、BIM に 1 μ M SAG (Adipogen、AG-CR1-3585)、1 μ M C59、および 0.25 μ M LDN193189 を添加した培地へ交換し約 48 時間培養した。

1-1-3 RNA 抽出および RT-qPCR

ISOGEN (Nippon Gene, 311-02501) を用いて RNA 抽出を行い、濃度および純度は Nanodrop (Thermo Scientific、ND-1000) を用いて測定した。1 μ g の回収した RNA と ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit (Toyobo、FSQ-301) を用い、20

μl の反応系で逆転写反応させて一本鎖 cDNA を合成した。反応条件は、ゲノム DNA の除去反応 37°C 5 分、逆転写反応 37°C 15 分、 50°C 5 分と酵素失活反応 98°C 5 分とした。 $20\ \mu\text{l}$ の反応溶液に $80\ \mu\text{l}$ の超純水を加え、RT-qPCR に用いるサンプルとした。RT-qPCR は FastStart Universal SYBR Green Master kit (Roche, 4913850) および $2\ \mu\text{l}$ の cDNA 溶液を含む $20\ \mu\text{l}$ からなり、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて実施した。反応条件は 95°C 10 秒、 60°C 30 秒で 40 サイクルとした。各遺伝子発現は、内因性コントロールとして GAPDH を用いて標準化し、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法によって相対的 mRNA 発現量として算出した。各サンプルは、生物学的および手技的レプリカントをそれぞれ 3 つずつ準備した。

1-1-4 統計学的解析

統計学的解析には、JMP Pro 16 (v16.0.0、SAS institute) を使用した。また、多群間の平均値の検定には Tukey-Kramer の HSD (honestly significant difference) 検定を用いた。

1-1-5 RNA-seq 解析

<サンプル調整>

細胞株として hiPSC-1 を使用し、分化誘導前および各分化誘導段階の細胞を使用した。生物学的レプリカントを各群 3 つ準備した。前述同様に ISOGEN を用いて RNA を抽出し、濃度および純度を Nanodrop で計測した。その後、ライブラリー作成 (MGIEasy RNA Directional Library Prep kit V2.0) およびシーケンス (DNBSEQ-G400 ; MGI) を行った。

<データ解析>

シーケンシングによって得られたデータを以下の Anaconda3 環境 (Python 3.8.8) および Python パッケージを使用して解析した。簡単に概略を示す。まず Trimmomatic (v0.39) を用いて質の低いリードおよびアダプター配列をトリミングした。トリミングしたデータは GRCh38.p13 (Release 37) を参照に用いて STAR (v2.7.8a) によってマッピングを行った。さらに RSEM (v1.3.1) を用いて発現量の算出を行った。以降の解析はすべて Integrated Differential Expression and Pathway Analysis (iDEP、v0.93)²⁶ を用いて行った。階層的クラスタリングでは、全サンプルの標準偏差が大きい上位 2100 遺伝子を用いてヒートマップ作成を行った。

1-1-6 1 細胞 RNA-seq 解析

<サンプル調整>

RNA-seq 解析と同様に分化誘導前と誘導 5 日後の細胞を準備した。D-PBS(-)で洗浄後、Accutase (Innova Cell Technologies、AT104) を加えて 37 °C で 7 分間静置し、あらかじめ 4 °C に冷やした基礎培地 (分化誘導前: E8 培地、分化誘導後: BIM 培地) を Accutase の 2 倍量加えて細胞を回収した。4 °C、1000 rpm で 3 分間遠心後に上清を破棄し、冷やした 1 mL の基礎培地を加えた後にフィルターをかけ、改めて遠心および基礎培地による再懸濁後、氷上に静置した。その後共同研究者の施設へサンプルを移動し、遠心後に冷やした D-PBS(-) (0.04 % BSA 添加) で再懸濁、細胞数をカウントしたのちに 10000 細胞を目安として以降の処置を行った。ライブラリー調整には Chromium Single cell 3' Library and Gel Bead Kit V3 (10× Genomics) を用い、Chromium Controller (10× Genomics) によって 1 細胞ずつ分離したドロップレットへ分子バーコードを付与し、以降ガイドラインに従ってライブラリー作成を行った。

シーケンスは Novaseq 6000 (Illumina) を用いて行い、得られた Fastq ファイルは CellRanger (v3.1.0)²⁷ とヒトゲノムリファレンス (GRCh38) を用いてマッピングおよびアノテーションを行った。

<データ解析>

以降の解析は R 言語環境 (R 4.1.1) において Seurat (v4.0.4)²⁸ を用いて行った。以下簡単に概略を示す。CellRanger によって作成した H5 ファイルより Seurat オブジェクトを作成した。細胞の重複や死細胞のデータ除去を目的に、whisker (v4.0) を参考に用いた。発現遺伝子数の下限は 25 percentile (負の場合は平均 - 標準偏差)、上限は 75 percentile を目安にして除去した。また、ミトコンドリア遺伝子の割合が 5% 以上の細胞を死細胞として除去した。解析は、Seurat の標準的な手順 (<https://satijalab.org/seurat/>) に則って行った。SCTransform を用いて標準化を行い、細胞周期やミトコンドリア遺伝子、発現遺伝子数を Regress out の対象とした。その後、Louvain algorithm²⁹ を用いてクラスタリングを行い、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection)³⁰ によって二次元描画した。

RNA velocity 解析には、velocyto (v0.1.7) を用い、細胞ごとにシーケンスリードの spliced/unspliced 比を計算した。下流解析には scvelo (v0.2.4)³¹ を用いた。

1-2 結果

1-2-1 低分子化合物の最適化

まず、既存の知見について文献検索を行い、モデル動物（齧歯類、鳥類、魚類）における沿軸中胚葉の形成や分化に重要なシグナル候補を収集した¹⁰。合わせて、マウスおよびヒト多能性幹細胞から沿軸中胚葉への分化誘導法に用いられている主要なシグナル因子についても同様に検討した¹⁰。発生の段階ごとに適切なシグナルの組み合わせが大きく異なることから、主要な分化段階として原始線条（および神経中胚葉前駆細胞）、未分節中胚葉、体節中胚葉、そして椎板を想定し、各段階の分化に重要なシグナルを整理した。その結果、沿軸中胚葉および椎板の形成や分化には、次に挙げる5つのシグナルが重要であることが明らかになった：Wnt、FGF、TGF β 、BMP、およびHh¹⁰。組換えタンパク質製剤の使用が必要な候補シグナル候補はFGF2およびTGF β (ActivinA)であった¹⁰。そのためまず、沿軸中胚葉および椎板への分化に対する、これらの因子の必要性を検討した²¹。条件検討を簡略化するため、各分化段階において必須もしくは重要であると判明しているシグナルは比較対象から除外し、かつ上記主要シグナル経路を用いた既存法を比較対象として用いた²¹（図2a）。

原始線条誘導（分化誘導 0–1 日目）において、Wnt 活性化薬が必須であることが知られている^{10,32}。一方、FGF2 や ActivinA (TGF β)、PI3K シグナルについては、分化誘導に関与するとの報告があるものの^{11,12,21}、その必要性は十分に明らかになっていなかった。そこで、原始線条のマーカー遺伝子である *MIXL1* および *T* (*TBXT* もしくは *Brachyury*) の発現を指標に、これらのシグナル経路に関連する薬剤の組み合わせを用いる既存法と比較する形で、使用する薬剤および基礎培地について検討した。RT-qPCR の結果、同じ基礎培地を使用した群と比較した場合、Wnt 活性化薬 (CHIR99021) 単独でも *MIXL1* については同程度、*T* については有意に高い発現誘導がみられた (図 2b)。既存法との比較では、*MIXL1* の発現がやや既存法で高く、*T* については有意差が得られなかったものの、本法で高い傾向がみられた。したがって、この段階では本法は原始線条においては、既存法と比較して同等程度であると考えられた。

続いて未分節中胚葉（分化誘導 1–2 日目）においては、既に必須であることが知られている Wnt 活性化薬に加えて、低分子化合物による TGF β 阻害薬 (A-83-01) および BMP 阻害薬 (LDN193189) の組み合わせを検討した^{10,32}。前原始線条から未分節中胚葉に至る分化マーカー遺伝子 *TBX6* および *MSGN1* の発現を指標にした。Wnt 活性化薬単独でも、ほかの組み合わせと比較して同

程度の *TBX6* および *MSGN1* の発現上昇がみられた (図 2c)。しかし一方で、側板中胚葉のマーカー遺伝子である *HAND1* および *FOXF1* の発現は、TGF β 阻害薬と BMP 阻害薬を組み合わせた場合に有意に低下し、意図しない側板中胚葉への分化が抑制されることが示唆された (図 2c)。これは BMP シグナルが、側板中胚葉への分化促進および沿軸中胚葉への分化抑制に必須の機能を有していることに加えて、ヒト胎児の沿軸中胚葉の分化において、TGF β シグナルの抑制がみられるという先行文献の知見に合致する結果であると考えられた^{10,20}。

体節中胚葉誘導 (分化誘導 2-3 日目) においては、TGF β 阻害薬および BMP 阻害薬が重要であることが知られている^{12,20,21}。一方、Wnt 阻害薬および FGF 阻害薬については、先行文献でもその使用の有無に差がみられ、必要性は十分に明らかになっていなかった^{12,20,21,33}。そこで、体節形成における Wnt 阻害薬 (C59) および FGF 阻害薬 (PD0325901) の組み合わせを比較した。その結果、体節中胚葉のマーカー遺伝子である *PARAXIS* (*TCF15*) および *PAX3* の発現は、いずれも Wnt 阻害薬のみの群で最も発現が高かった (図 2d)。以上より、Wnt 阻害薬および FGF 阻害薬を使用する既存法と比較しても、明らかに同等以上の分化誘導効率であることが示唆された。これは、誘導因子の差だけで

は説明が難しく、本法で使用している培地が簡便であるだけでなく、機能的に優れている可能性を示唆するものと考えられた。

最後に、椎板誘導（分化誘導 3–5 日目）においては、すでに必須であると知られている Hh 活性化薬（SAG）を基準とし、脊索や神経管から発現する Noggin と同様の効果を有する BMP 阻害薬（LDN193189）、および皮筋板との運命決定に重要な Wnt 阻害薬（C59）の組み合わせを比較した¹⁰。椎板の分化マーカー遺伝子である *FOXC2* については同程度、*PAX1*、*PAX9*、*NKX3.2* については BMP 阻害薬を使用することで発現上昇がみられた一方で、Wnt 阻害薬自体に明らかな効果は見られなかった（図 2e）。そのため、BMP 阻害薬を使用していない既存法と比較して、マーカー遺伝子の発現が上昇した主要な要因は BMP 阻害薬の有無であると示唆された。参考にした既存文献においては、Wnt シグナルが椎板への分化を抑制、皮筋板や側板中胚葉（肢芽中胚葉）への分化を促進することを理由に、Wnt 阻害薬（C59）を使用して良好な結果を得ている²¹。一方で、発生学的には Hh シグナルに加えて Noggin が椎板分化に寄与していることが知られ、*in vitro* 実験系においても Hh シグナル自体が、Wnt シグナルと拮抗することで椎板分化に寄与するという報告もある^{10,34}。また、Wnt 阻害薬ではなく BMP 阻害薬（LDN193189）を使用している報告も複数存在す

る^{12,33}。限られた範囲の遺伝子発現だけで判断は難しいものの、本研究では、Wnt 阻害薬および BMP 阻害薬いずれも使用することとした。以上により、本法における異種成分および組み換えタンパク質製剤不使用の条件を満たし、また既存法と同等以上の分化誘導効率を有する分化誘導法を確立した。

さらに細胞種間の再現性を確認する目的で、複数のヒト iPS 細胞および ES 細胞に対して既存法および本法を適応し、分化誘導 5 日後の遺伝子発現を比較した。いずれの細胞種および誘導法においても、分化誘導前と比較して椎板のマーカー遺伝子である *PAX1*、*PAX9*、*NKX3.2* の発現上昇がみられた (図 2f)。また、細胞種によって遺伝子発現上昇の程度に大きく差が見られたものの、本法は既存法と比較していずれの細胞種でも同等以上の発現上昇がみられた (図 2f)。以上から、本法は異なる細胞種間においても十分な再現性を有することが示唆された。

図 2



検討項目

	CDM2 / BMI Wnt PIK90 + FGF2 + ActivinA			Wnt TGFβi BMPi			TGFβi + BMPi Wnti FGFi			HH Wnti BMPi		
--	--	--	--	----------------------	--	--	------------------------------	--	--	--------------------	--	--

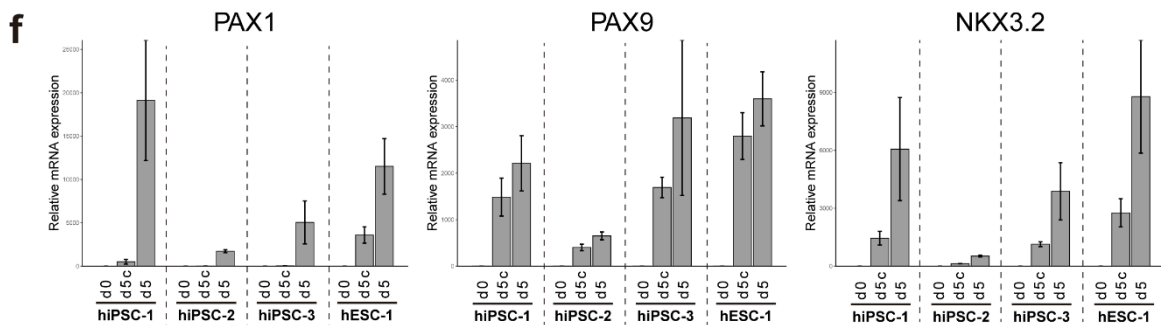
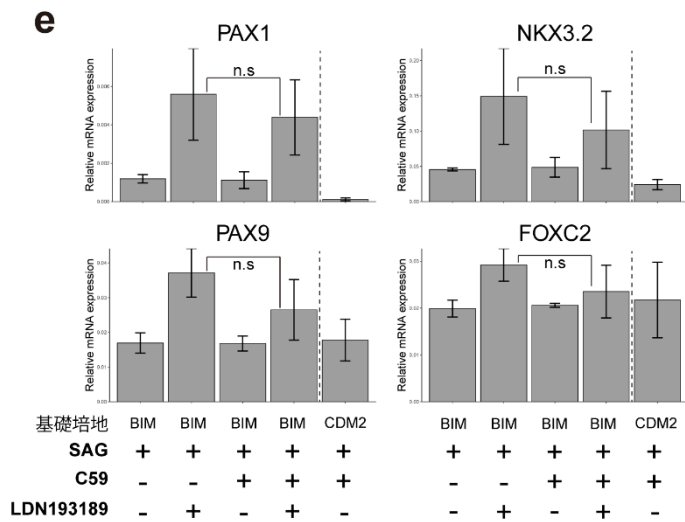
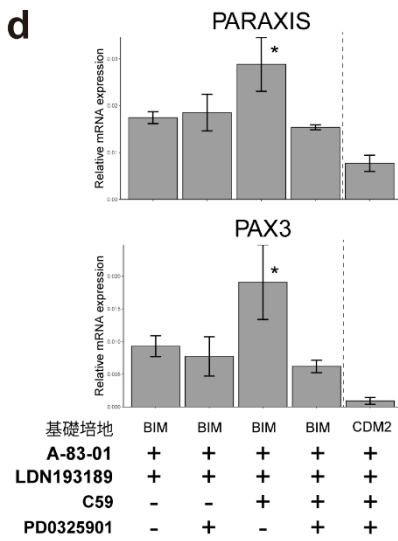
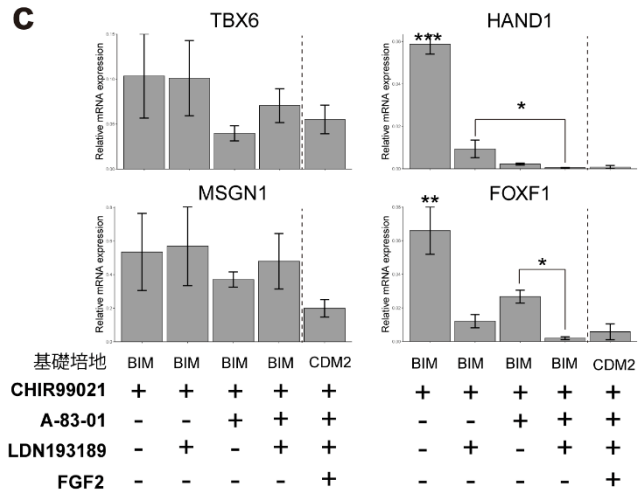
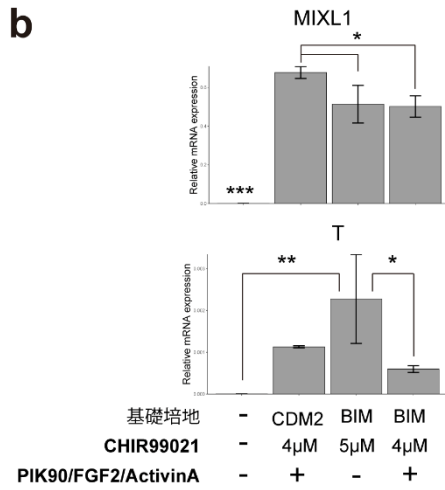


図 2：ヒト多能性幹細胞を用いた椎板誘導における条件の最適化

各分化段階における指標となる細胞種特異的なマーカー遺伝子の発現を条件ごとに RT-qPCR を用いて比較した (n = 3)。(a)基礎培地および誘導因子に関する検討過程の図示 (組成の詳細については表 1 を参照)。(b-e)各分化段階における特異的なマーカー遺伝子の相対的発現量の比較。分化誘導 1 日目以降は既存法を参考値として右側に示した。(b)ヒト iPS 細胞と分化誘導 1 日目における原始線条マーカー遺伝子、(c)分化誘導 2 日目における未分節中胚葉マーカー遺伝子、(d)分化誘導 3 日目における体節中胚葉マーカー遺伝子、(e)分化誘導 5 日目における椎板マーカー遺伝子。既存法では SAG ではなく 21K を使用。(f)複数のヒト iPS 細胞 (hiPSC 1-3:d0) およびヒト ES 細胞 (hESC 1:d0) に対して既存法 (d5c) および本法 (d5) における椎板マーカー遺伝子発現を比較した。統計解析は Tukey-Kramer の HSD (honestly significant difference) 検定を用い、すべてのペアを比較した。他のペアすべてと有意差がある場合はその群に、特定のペア間で有意差がある場合はペアを明示した。

n.s ; 有意差なし、* ; p < 0.05、** ; p < 0.005、*** ; p < 0.0001

	本法	既存法1(今回の比較対象) ¹²	既存法2 ²¹
基礎培地	BMI	GDM2	CDMi
	DMEM/F12	50 % IMDM 50 % F12	50 % IMDM 50 % F-12
培地組成	1 % ITS supplement	1% penicillin/streptomycin	1 % penicillin/streptomycin
	1 % NEAA	1 % chemically defined lipid concentrate	1 % chemically defined lipid concentrate
	55 μM 2-mercaptoethanol	450 μM monothioglycerol	450 μM monothioglycerol
	1 % B27 xeno-free supplement	15 μg/ml human apo-transferrin	15 μg/ml human apo-transferrin
		0.7 μg/ml insulin 1 mg/mL polyvinyl alcohol	7 μg/ml insulin 5 mg/mL BSA
誘導開始時期	播種後翌日から開始	播種後翌日から開始	播種後3日目より開始
原始線条誘導	5 μM CHIR	4 μM CHIR 0.1 μM PIK90 20 ng/mL FGF2 30 ng/mL Activin A	10 μM CHIR 10 μM SB431542 2 μM DMH1 20 ng/mL FGF2
	5 μM CHIR	3 μM CHIR	10 μM CHIR
	1 μM A-83-01	1 μM A-83-01	10 μM SB431542
未分節中胚葉誘導	0.25 μM LDN193189	0.25 μM LDN193189 20 ng/mL FGF2	2 μM DMH1 20 ng/mL FGF2
	1 μM C59	1 μM C59	* DLL1 陽性細胞をソーティングし播種
	1 μM A-83-01	1 μM A-83-01	10 μM CHIR
体節中胚葉誘導	0.25 μM LDN193189	0.25 μM LDN193189 0.5 μM PD0325901	10 μM SB431542
	1 μM SAG	5 nM 21K	0.1 μM SAG
	1 μM C59	1 μM C59	0.6 μM LDN-193189
椎板誘導	0.25 μM LDN193189		
誘導期間	5日	5-6日	11日

表 1：本法と既存法の比較

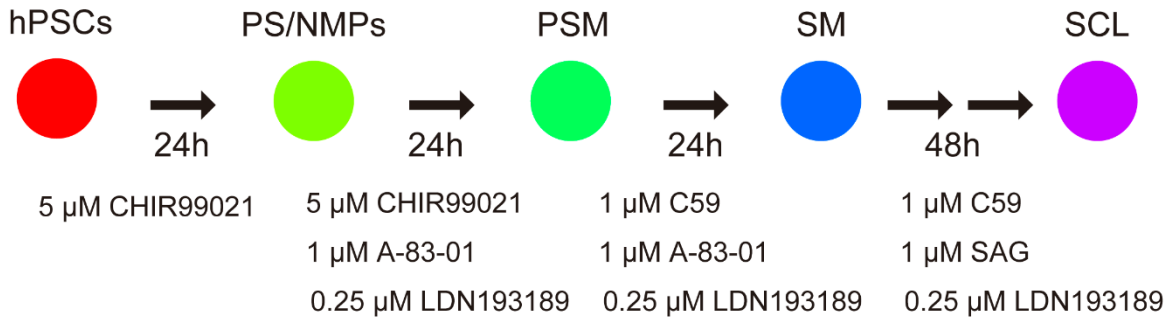
異種成分や組換えタンパク質製剤、および実施に煩雑さを伴うものについて赤字で示した^{12, 21}。

1-2-2 椎板細胞誘導の妥当性の検証

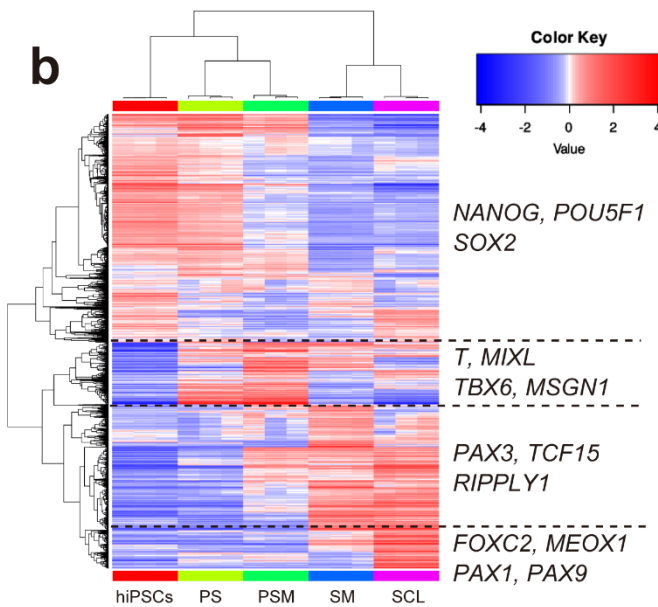
最適化した分化誘導法（図 2a）の妥当性を検証するため、RNA-seq 解析を用いて各分化段階における遺伝子発現を網羅的に解析した³³。クラスタリング解析により、分化誘導 0、1、2、3、5 日目の細胞群において、それぞれの分化段階で特異的に発現している遺伝子群を解析したところ、*NANOG* や *POU5F1* など複数の多能性マーカー遺伝子発現を有する未分化な細胞集団から、各分化段階に合致するマーカー遺伝子の発現推移が確認された（図 3b）。分化誘導 5 日目の細胞における遺伝子発現プロファイルでは、体節中胚葉および椎板特異的なマーカー遺伝子の発現上昇がみられた一方、幹細胞や未分化細胞のマーカー遺伝子群の発現の低下がみられたことから、椎板への分化誘導が段階的に進行したことが示唆された（図 3b）。また、遺伝子発現プロファイルを用いた主成分分析（PCA：Principal Component Analysis）の結果、多能性幹細胞から分化段階ごとに順々に椎板に至る分化系譜も示唆された（図 3c）。したがって、本法により、ヒト多能性幹細胞が各分化段階を経て段階的に椎板へ分化誘導されたことが示唆された。

図 3

a



b



c

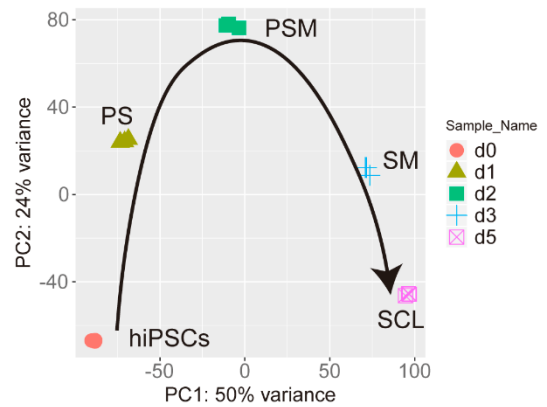


図 3：最適化した分化誘導法と各分化段階における網羅的遺伝子発現解析

(a)分化誘導法の詳細および各段階で想定される細胞種の概略図を示す。(b-c)RNA-seq 解析結果 (n=3)。(b)階層的クラスタリングおよびヒートマップ。各細胞種特異的な遺伝子群ごとに区分けした。(c) 主成分分析 (PCA; Principle component analysis) プロット図。遺伝子発現プロファイルの近似したサンプル間の距離と実際の時系列から推定される分化系譜を矢印で追記した。hPSCs: ヒト多能性幹細胞、PS: 原始線条、NMPs: 神経中胚葉前駆細胞、PSM: 未分節中胚葉、SM: 体節中胚葉、SCL: 椎板

1-2-3 誘導した椎板細胞の多様性の検証

多能性幹細胞から誘導した椎板細胞の分化誘導効率および多様性を詳細に評価する目的で、1細胞 RNA-seq 解析を行った。コントロールとして分化誘導前のヒト iPS 細胞を用いた。まず、分化誘導前後のデータを統合し、遺伝子発現に基づくクラスタリング解析を行ったところ、誘導前後における細胞集団は大きく異なること、またそれぞれの細胞集団自体は連続（比較的近似）した集団であることが明らかとなった（図 4a）。また、誘導前の細胞集団は多能性マーカー遺伝子である *NANOG*、*POU5F1* および *SOX2* を広く発現している一方で、主要な体節中胚葉および椎板細胞のマーカー遺伝子である *FOXC2*、*PAX9*、*PAX1* の発現は分化誘導後においてのみ確認された（図 4b）。

さらに、誘導した椎板細胞の遺伝子発現を詳細に検証するため、誘導後の細胞集団のデータセットを詳細に解析した。クラスタリング解析およびマーカー遺伝子の発現解析の結果、代表的な椎板マーカー遺伝子である *FOXC2*、*PAX1*、*PAX9* などの発現を有する細胞集団に加えて、異なる遺伝子発現パターンを有する細胞集団も存在することが示された（図 4c-d）。中でも、椎板から派生することが知られている血管平滑筋のマーカー遺伝子である *ACTA2* や *CNN1* を発現する細胞集団が多く含まれていた（図 4d）。椎板細胞は軟骨細胞に加えて、靭帯や血管、

髄膜を構成する細胞群へ分化することが知られており、発生学的知見に基づく椎板由来細胞の多様性に矛盾しない結果であると考えられた¹⁰。さらにスプライシングの有無による mRNA 成熟の程度から遺伝子発現を動的にとらえることが可能な RNA velocity 解析³⁵を行ったところ、中間的な細胞集団から軟骨細胞および血管系構成細胞への2方向の分化系譜が示された(図4c)。特に軟骨細胞への分化の方向づけをされた細胞集団においては、体節中胚葉から発現している *TCF15* の遺伝子発現が比較的高い水準で維持されているものの、Velocity が減少傾向であること、逆に椎板や軟骨分化のマーカー遺伝子は発現の水準だけでなく Velocity も上昇傾向であることが示され(図4e)、既存の発生過程の時系列に合致する内容であると考えられた¹⁰。以上から、段階的な分化系譜を示唆する RNA-seq 解析の結果に加えて、椎板以降の部分的な分化系譜を示唆する1細胞 RNA-seq 解析の結果から、誘導した細胞集団が生理的な分化過程及び多様性を部分的に再現している可能性が示唆された。

4

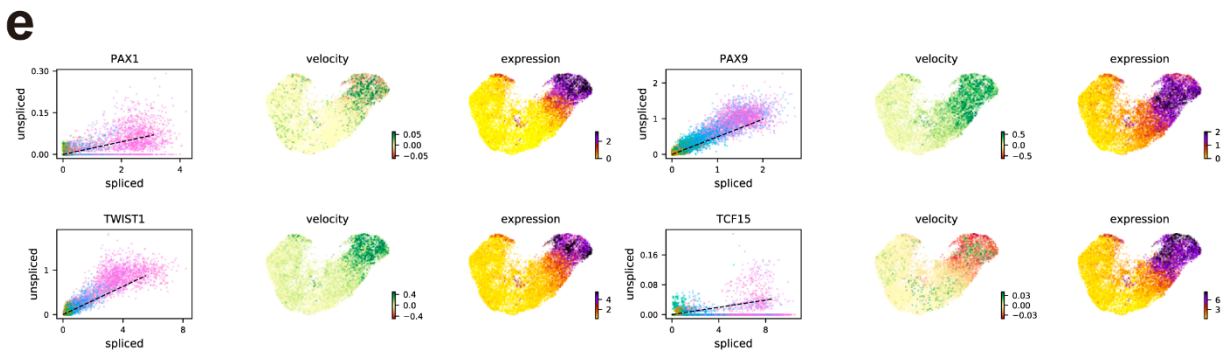
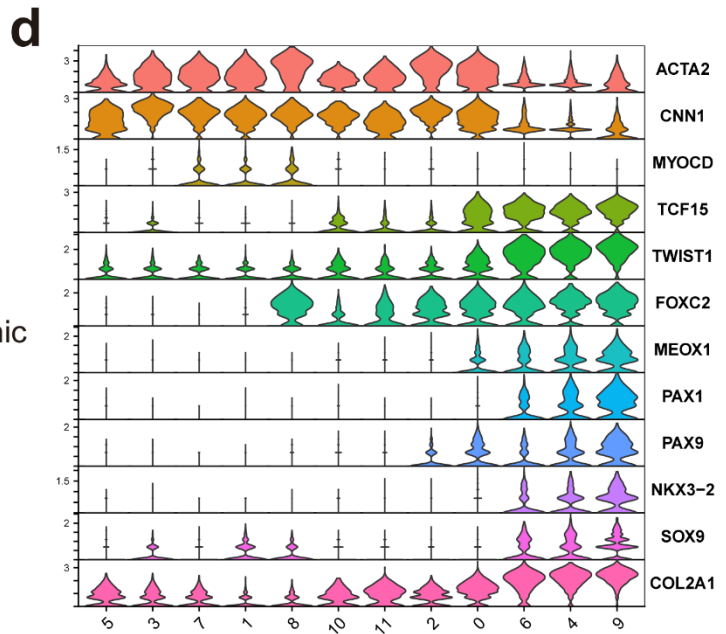
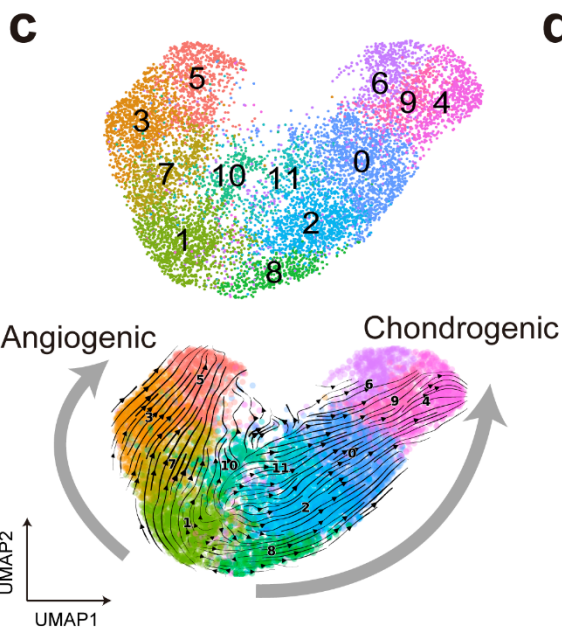
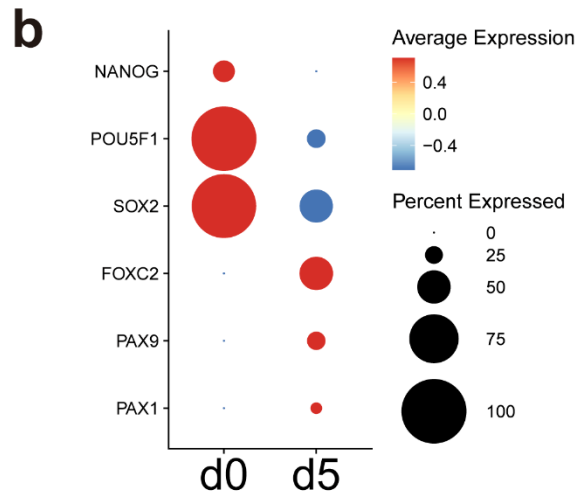
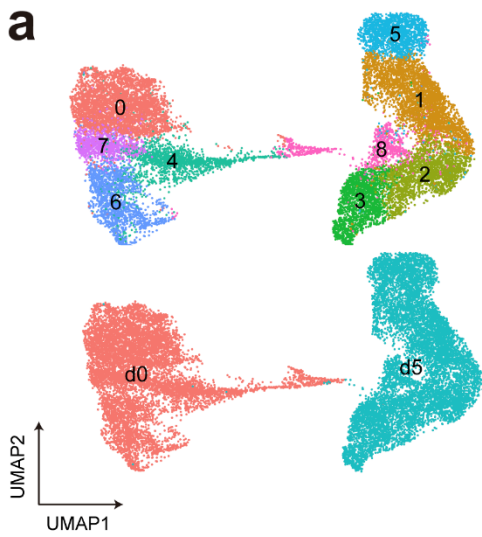


図 4：1 細胞 RNA-seq 解析を用いた誘導細胞群の妥当性および多様性の検討

(a)分化誘導前のヒト iPS 細胞 (7963 細胞) および 5 日間で誘導した細胞群 (9232 細胞) を統合したデータを用いたクラスタリング解析。上段：遺伝子発現に基づいたクラスタリング。下段：クラスターを構成する細胞の由来 (サンプル) を表示。(b)多能性マーカーおよび椎板マーカー遺伝子の発現を分化誘導前後で比較。(c-e)分化誘導 5 日後の細胞群のデータを用いた 1 細胞 RNA-seq 解析。(c)再クラスタリングおよび RNA velocity に基づく遺伝子発現動態の方向性を視覚化したもの。(d)クラスター毎の各細胞特異的な分化マーカー遺伝子の発現量比較。(e)各マーカー遺伝子におけるクラスター毎の mRNA の成熟度 (非スプライシング / スプライシング比) に基づく RNA velocity の正負および遺伝子発現量の比較。

1-3 小括

ヒト多能性幹細胞を用いて、段階的に椎板細胞へ至る分化誘導法を確立した。本法は、組成が明らかな条件で誘導が可能であり、異種成分および組換えタンパク質製剤を用いない簡便で再現性が高い誘導系である。また、各分化段階において誘導される細胞集団は、細胞種特異的な遺伝子発現プロファイルを有し、最終的に体節中胚葉を経て椎板細胞に至ることが示された。さらに、誘導した椎板細胞を 1 細胞レベルで検証すると、軟骨形成および血管形成に寄与することが示唆される連続した細胞集団から構成されており、生体における椎板の多様性を分化誘導系においても部分的に再現していると推測された。

第2章 ヒト多能性幹細胞由来骨組織の誘導

背景と目的

骨組織の起源である神経堤、沿軸中胚葉や側板中胚葉は、*in vitro* 誘導系において誘導可能であるものの、そこから成熟した骨組織まで誘導することは非常に困難であり、現時点で未だ実現されていない。しかし、軟骨組織のみであれば *in vitro* 培養系においても作製可能であることが広く知られており、誘導した軟骨を免疫不全マウスへ移植すると、骨殻や骨髄形成をはじめとした内軟骨性骨化と類似したプロセスが得られることも報告されている⁸。つまり、*in vitro* 培養系では欠けている何らかの要素が生体において骨形成を可能にしていると考えられる。そこで、誘導した椎板細胞を免疫不全マウス腎被膜下へ移植することで、軟骨形成を経て内軟骨性骨化を再現した骨組織が形成されるか検証した。また、多能性幹細胞をはじめとした未熟な細胞を移植すると、奇形腫などの腫瘍形成をきたすことが一般的に知られていることから、得られた組織を micro-CT を用いて分析し、形態学的評価や組織学的解析によって内軟骨性骨化による妥当な骨組織であるか検証した²⁴。

2-1 材料と方法

2-1-1 免疫不全マウスへの細胞移植

マウスはすべてジャクソン・ラボラトリー・ジャパン (神奈川) より購入した。また、すべての動物実験は国の「動物の愛護及び管理に関する法律」及び、東京大学の「東京大学動物実験実施規則」、「東京大学動物実験実施マニュアル」に従い、3R: Replacement (代替実験の検討)、Reduction (動物数削減)、Refinement (動物の苦痛軽減) について十分考慮して行った (医-P 17-037 (医-H20-210))。

5日間で誘導した椎板細胞を D-PBS(-)で洗浄後、Accutase を加えて 37°Cで7分間静置し、あらかじめ 4 °Cに冷やした基礎培地を Accutase の2倍量加えて細胞を回収した。4 °C、1000 rpm で5分間遠心後に上清を破棄し、少量の基礎培地で再懸濁した後に、基礎培地で2倍に希釈した Matrigel (Corning、354234) 溶液を用いて 1×10^6 細胞/10 μ L に調整した細胞懸濁液を移植に使用した。ゲル化予防のため懸濁液は常に氷上に置き、以降の操作を行った。

8-12週齢の免疫不全マウス (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J; NOD SCID, Charles river) を使用した。イソフルラン (Pfizer、4987114133403) による吸入麻酔 (2-3 %) を用い、体温維持のためホットプレートで 37 °Cに加温した。左腎臓直上で皮膚および筋膜を切開することで腎臓を露出した。26G カテーテル (セーフレットキ

ヤス NIC*26X3/4;ニプロ、09-049) の内筒で小切開をおき、細胞懸濁液を吸引した後に 1 ml シリンジ(ニプロ、08010)を接続した外筒を腎被膜下へ挿入して、細胞懸濁液を注入 (1.5~15 x10⁶ 細胞) した。筋膜および皮膚を 6-0 ナイロンで縫合して手術終了した。

2-1-2 *in vivo* micro-CT による組織形成評価

細胞を移植したマウスに対して、2%イソフルランを用いた吸入麻酔下で、2週間毎に *in vivo* micro-CT (Rigaku, R_mCT2-FX、条件：90 KV、160 UA、20-24 FOV、17 sec) で評価した。

2-1-3 組織切片の作成

移植部位から組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (Wako, 163-20145) 中に 4 °Cで 12-24 時間浸漬し、固定処理を行った。段階的なエタノール浸漬 (テスクリア;ナカライテスク、1387094) による脱脂を行った後に、0.5 M EDTA/D-PBS(-)溶液中に 4 °Cで 1~2 週間浸漬し、脱灰処理を行った。凍結切片については 30 %スクロース (Wako、196-00015) /D-PBS(-)中に 4 °Cで 12 時間浸漬し、凍結組織切片作製用包埋剤 (O.C.T.コンパウンド;サクラファイ

ンテックジャパン)を用いて-80 °Cで包埋・凍結した。クライオトーム (LEICA、CM3050IV)を用いて10 μmの厚さでブロックを薄切した。十分に切片を風乾し、リン酸緩衝液中で包埋剤を十分に溶解除去した後に染色に用いた。パラフィン切片については密閉式自動固定包埋装置 (サクラファインテックジャパン、ティシュー・テック VIP™5 ジュニア) を用いて21時間処理を行った後にパラフィン包埋を行った。マイクロトーム (LEICA、SM2000R) を用いて5 μmにブロックを薄切した。42 °Cの恒温水槽にて切片を延伸し、スライド (松波硝子工業、SCRE-01) へ設置、さらに42 °Cで余剰な水分を除き、37 °Cの恒温槽で十分に乾燥を行った。キシレン (Wako、249-00097)、エタノール、水に段階的に浸漬し、パラフィンを十分に除去・水和した後に染色に用いた。

2-1-4 組織染色

<ヘマトキシリン・エオジン染色；HE染色>

ヘマトキシリン溶液 (Wako、131-09665) へ2分、水へ10分、95% エタノールへ数秒、エオジン溶液 (Wako、Wako 051-06495) へ1分、100% エタノール溶液へ5分×3回、キシレンへ1分×3回、順々に浸漬した後にマリノールを用いて封入した³⁶。

<サフラニン O 染色>

ヘマトキシリン溶液へ2分、水へ10分、0.001% Fast green 溶液(Sigma-Aldrich、1040220025)へ5分、1% 酢酸溶液(Wako、012-00245)へ10秒、サフラニン溶液(WALDECK、1B-463)へ5分、100% エタノール溶液へ5分×3回、キシレンへ1分×3回、順々に浸漬した後にマリノールを用いて封入した³⁶。

2-1-5 免疫組織染色

<DAB 染色>

水和した凍結切片もしくはパラフィン切片を、0.3% 過酸化水素(Wako、081-04215) / メタノール(Wako、137-01823)に室温で30分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。水で5分間洗浄し、D-PBS(-)に0.1% Tween20(Sigma-Aldrich、P1379)を添加したPBSTに短時間浸潤したうえで、ブロッキング(Blocking One Histo; ナカライテスク、06349-64 または 10%ヤギ正常血清; ニチレイ、426041)を製品使用法に準じて室温で10-20分行った。なお、コラーゲンの染色については、ブロッキング前にプロテアーゼ溶液(ニチレイ、415231)による抗原賦活化を室温で2分間行った。PBSTで洗浄後、PBSTで適切な濃度に希釈した1次抗体溶液を滴下して室温で1時間静置した。PBSTで5分間、3

回洗浄を行い、続いて二次抗体液（ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (M) または (R)；ニチレイ、424134 または 424144) を滴下し、室温で 30 分静置した。PBST で 5 分間、3 回洗浄後、発色液を滴下した。適当な発色が得られたタイミングで水に浸漬して反応を停止させた。対比染色にはカラッチヘマトキシリン（武藤化学、30022）を用い、エタノールおよびキシレンで脱水後にマリノール（武藤化学、20092）で封入した。組織の観察は、BZ-X700（キーエンス）もしくは NanoZoomer S60 バーチャルスライドスキャナ（浜松ホトニクス、C13210-01）を用いて行った。

< 蛍光染色 >

水和した凍結切片もしくはパラフィン切片を用い、DAB 染色同様にブロッキング、1 次抗体、および 2 次抗体を反応させた。DAPI 入りの封入剤（Mounting Medium With DAPI、Abcam、ab104139）を用い、非特異的な蛍光が強いサンプルについては自家蛍光抑制試薬（Vector TrueVIEW Autofluorescence Quenching Kit with DAPI；Vector Laboratories、SP-8500）を使用した。蛍光の観察は BZ-X700 または共焦点顕微鏡（ZEISS、LSM 880 with Airyscan）で行った。

2-2 結果

2-2-1 ヒト多能性幹細胞由来椎板細胞移植後の組織形成

ヒト多能性幹細胞から 5 日間かけて誘導した椎板細胞を回収し、免疫不全 (NOD CID) マウスの腎被膜下へ移植した (図 5a)。移植後 2 週間ごとに生体マイクロ CT を用いて組織形成の評価を行った。石灰化領域が、移植後 8 週間よりマウス腎臓周囲に確認された。12 週目頃からは、石灰化組織内部に血管様や骨髓腔様の非石灰化領域が観察された。また、石灰化組織は時間経過とともに腎臓周囲において徐々に成長した (図 5b)。

2-2-2 誘導骨組織における組織学的評価

細胞移植後 8 週および 18 週目に組織を採取し、組織学的評価を行った。HE 染色の結果、8 週の時点では軟骨優位の組織像を呈しており、一部軟骨の肥大化が観察された (図 5c)。一方、18 週の時点では、肉眼像においても骨髓様の血液を含んだ石灰化組織が得られ、組織像でも軟骨細胞のカラム構造や肥大化に加え、骨殻および 1 次海綿骨形成に至る内軟骨性骨化の過程に類似した構造が確認された (図 5c)。これらは、ほとんどすべての骨を内軟骨性骨化によって形成する椎板細胞の性質に矛盾しない結果であると考えられた。また、確認できる範囲で

は骨軟骨以外の組織はマウス腎臓のみであり、少なくとも組織像では、奇形腫をはじめとした腫瘍形成は見られなかった（図 5c）。

次に、免疫組織化学染色を用いて主要な骨軟骨のマーカー発現を確認した。その結果、骨軟骨においてそれぞれ特異的なマーカー（骨：COL1、RUNX2、および SP7、軟骨：COL2、COL10、SOX9）が発現していた（図 5d）。加えて、形成された組織が、移植したヒト細胞由来のものであるか確認するため、ヒト核抗原の検出を行ったところ、血球系細胞を除くほとんどの骨軟骨組織構成細胞が陽性であった（図 5d）。そのため、誘導した骨軟骨組織はヒト細胞由来であり、移植した椎板細胞の集団が、軟骨形成を経て内軟骨性骨化による骨組織を形成したことが示唆された。

5

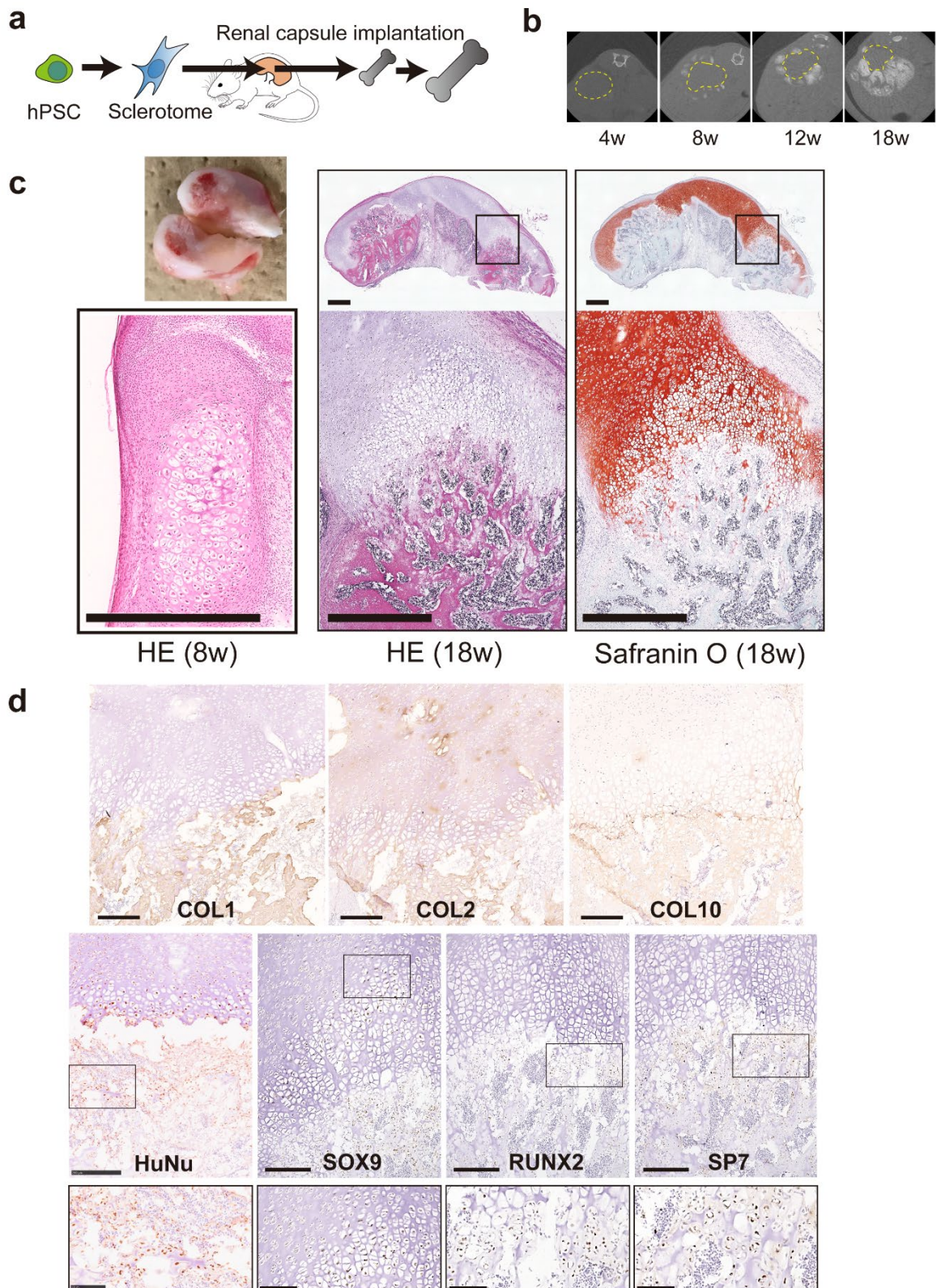


図 5：ヒト多能性幹細胞由来骨組織の組織学的検証

(a)実験系の簡略図を示す。誘導した椎板細胞を免疫不全マウス腎被膜下へ移植し 18 週間経過観察を行った。(b)細胞移植後の組織形成の経過をマイクロ CT で評価した (体軸断面像)。マウスの腎臓は破線 (黄色) で示した。(c)左上：移植後 18 週の組織断面図写真。左下：移植 8 週後の組織 HE 染色像。中央-右：移植後 18 週の組織 HE 染色および SafraninO 染色像。scale bar； 1 mm、 (d)移植後 18 週の組織における各免疫染色像 (DAB 染色)。COL1；1 型コラーゲン、COL2；2 型コラーゲン、COL10；10 型コラーゲン、HuNu； ヒト核抗原、scale bar； 500 μm もしくは 250 μm (下段拡大図)

2-3 小括

ヒト多能性幹細胞から 5 日間で誘導した椎板細胞を免疫不全マウス腎被膜下へ移植すると、石灰化組織が形成され、経時的に成長した。また、得られた組織は、内軟骨性骨化に類似した組織像と生理的な骨軟骨マーカー発現パターンを呈しており、内軟骨性骨化を再現していることが示唆された。加えて、形成された組織は、血球を除いてヒト細胞で構成され、明らかな腫瘍形成も見られなかったことから、移植した細胞が段階的に軟骨から骨組織形成まで至ったと考えられた。

第3章 ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する1細胞RNA-seq解析

背景と目的

前章までの *in vitro* と *in vivo* の検討から、ヒト多能性幹細胞から椎板細胞が誘導されていることと、マウスへの移植を経て組織学的に内軟骨性骨化を再現する骨組織が誘導されていることが確認された。そこで、誘導した骨組織を構成する細胞集団の同定と、その妥当性を、1細胞レベルの遺伝子発現に基づいて検証することを目的に、1細胞RNA-seq解析を行った。

具体的には、内軟骨性骨化の異なる分化段階の細胞集団において遺伝子発現の動的な変化を時系列でとらえることを目指して、軟骨形成を中心とした内軟骨性骨化初期、骨殻や骨髄形成に至る内軟骨性骨化後期の異なる2つの時期における組織を用いることとした。また、誘導骨組織の妥当性の検証のため、本研究で得られたデータと、公共データベースより取得したヒト胎児骨組織データセットを用いた統合解析を行った³⁷。これにより、胎児期の骨発生過程において特徴的な種々の骨格系細胞および幹細胞/前駆細胞集団を、誘導した骨組織においても検証することでデータの外挿性を検証し、さらに遺伝子発現や転写制御ネットワークのダイナミクスを捉えることを目指した³⁷。

3-1 材料と方法

3-1-1 骨組織誘導および細胞の単離

hiPSC-1 を使用し、1-1-2 および 2-1-1 同様に椎板細胞へ分化誘導後、免疫不全マウス腎被膜下へ移植した。移植後7週および19週経過した組織を用いた。

イソフルランによる吸入麻酔下（5%）に迅速な頸椎脱臼を行って組織を採取した。マウス腎臓を可及的に除去したうえで、素早く氷上の D-PBS(-)へ浸漬した。摘出した組織は、ハサミ等で可及的に小さく断片化した。D-PBS(-)で複数回洗浄後に、D-PBS(-)で 0.4 WU/ml に調整した Liberase TM (Roche、5401127001) 溶液を加え、37 °C で愛護的に攪拌（100 rpm）を加えながら静置した。15 分ごとに 10 % ウシ胎仔血清 (FBS; Equitech-Bio) と抗生剤（50 unit/ml ペニシリン + 50 mg/ml ストレプトマイシン; Sigma-Aldrich）を含む氷上の DMEM/F12 (Wako、042-30555) へ反応液を回収した。合計 6 回この操作を繰り返した。40 μ m セルストレーナー (Corning、352340) 使用後に遠心（4°C、200–500g、10 分）し、溶血試薬 (VersaLyse ; Beckman Coulter、A09777) を 1 mL 加えて室温で 10 分静置した。再度遠心（4 °C、200–500 g、5 分）した後に、40 μ m ピペットチップフィルター (FLOWMI、H13680-0040) による異物や重複細胞の除去を複数回行った。1 mL の培地に再懸濁後、氷上に静置し、共同研究者の施設へ移動した。

3-1-2 1 細胞 RNA-seq 解析

1-1-5 と同様にライブラリー作成、シーケンス、およびマッピングを行い、データセットを作成した。解析についても同様に、Seurat を用いて行った。7 週および 19 週目のデータは統合 (Merge) した上で、クラスタリングまで行った。また、マウス細胞の除去は CollapseSpeciesExpressionMatrix コマンドを使用して行い、その後同様にクラスタリングまで行った。Gene Ontology 解析は clusterProfiler (v4.0.5)^{38,39} を用いた。

3-1-3 ヒト胎児長管骨データセットとの統合解析

公共のデータベースのヒト胎児 (8 週) 長管骨データセット (GEO: GSE143753) を用いた³⁷。総細胞数を調整するため、7 週および 19 週目のサンプルを統合したデータセットから、乱数によって 25% の細胞数へ縮小したサブセットを用いた。上記データセットは、共通の anchor genes を用いて統合 (Integration) した上で、SCTransform による標準化およびクラスタリングを行った⁴⁰。Pseudotime 解析は骨格前駆細胞を基準として、monocle3 (v1.0.0)^{41,42} を用いて行った。

3-2 結果

3-2-1 ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する 1 細胞 RNA-seq 解析

ここまでで得られた内軟骨性骨化を再現する骨組織を用いて、1 細胞 RNA-seq 解析を行った。細胞移植後 7 週および 19 週目のサンプルを、それぞれ内軟骨性骨化初期および後期として、各組織を構成する細胞集団の発現遺伝子の推移について検討した (図 6a)。

組織学的解析から、誘導骨組織には、ヒト細胞とマウス細胞が混在している可能性が考えられたため、1 細胞 RNA-seq により得られたリードは、ヒトおよびマウスのリファレンスを用いて、同時にそれぞれにマッピングを行った。それにより、同一データ内でヒトおよびマウス遺伝子を区別した上で遺伝子発現解析を行った。2 つのサンプルは時系列データとして統合し、解析を進めた。クラスタリング解析の結果、ヒト細胞はそれぞれのクラスターが連続する集団であったのに対して、マウス細胞はいくつか異なる集団に分かれた (図 6b)。クラスター毎に特徴的な遺伝子発現を比較したところ、マウス細胞は、複数の血球系細胞と血管内皮細胞に特徴的な遺伝子発現を有する細胞集団であった。一方で、ヒト細胞は骨軟骨およびそれらの前駆細胞群に特徴的な遺伝子発現を有する細胞集団であった。以上より、得られた骨組織が、ヒトの骨格系細胞とマウスの血管・

血球系細胞のキメラ組織であることが示唆された (図 6b)。以降はヒトの骨格形成に焦点を当てる目的で、マウス細胞群を除去した上で解析を進めた。

6

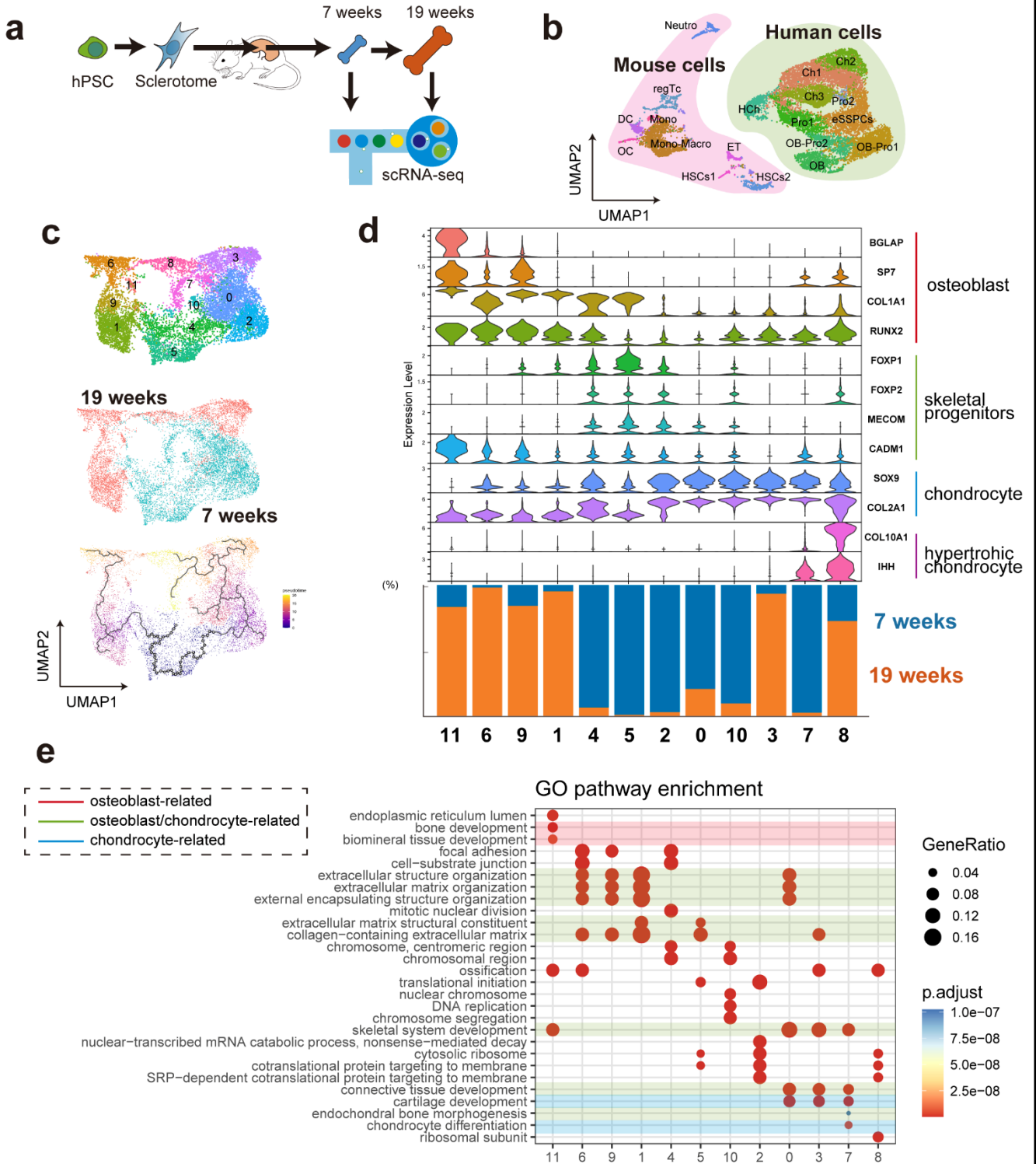


図 6：ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する 1 細胞 RNA-seq 解析

(a)実験の概略図を示す。(b)移植後 7 週 (6816 細胞)、19 週目 (6950 細胞) のサンプルを統合したクラスタリング解析。マウス細胞およびヒト細胞の集団をそれぞれ標識した。(c-e)統合したデータよりマウス細胞を除去したヒト細胞集団に対して解析を行った：移植後 7 週 (6576 細胞)、19 週目 (4778 細胞)。(c)上段：クラスタリング解析。中段：細胞の由来 (サンプル) を表示したもの。下段：monocle3 による Pseudotime を用いた Trajectory 解析。(d)各骨格細胞のマーカー遺伝子の発現量をクラスター間で比較。また下段に各クラスターにおける 7 週および 19 週目サンプルの構成比率を表示した。(e)各クラスターに特異的な遺伝子群を抽出し、それらに対して Gene Ontology 解析を行ったもの。骨芽細胞、軟骨細胞、もしくは両者に関連する GO term をそれぞれ標識した。Neutro; 好中球、regTc; 制御性 T 細胞、DC; 樹状細胞、OC; 破骨細胞、Mono; 単球、Macro; マクロファージ、ET; 血管内皮細胞、HSCs; 造血幹細胞、HCh; 肥大軟骨細胞、Ch; 軟骨細胞、Pro; 前駆細胞、eSSPCs; 胎児性骨格幹細胞・前駆細胞、OB; 骨芽細胞

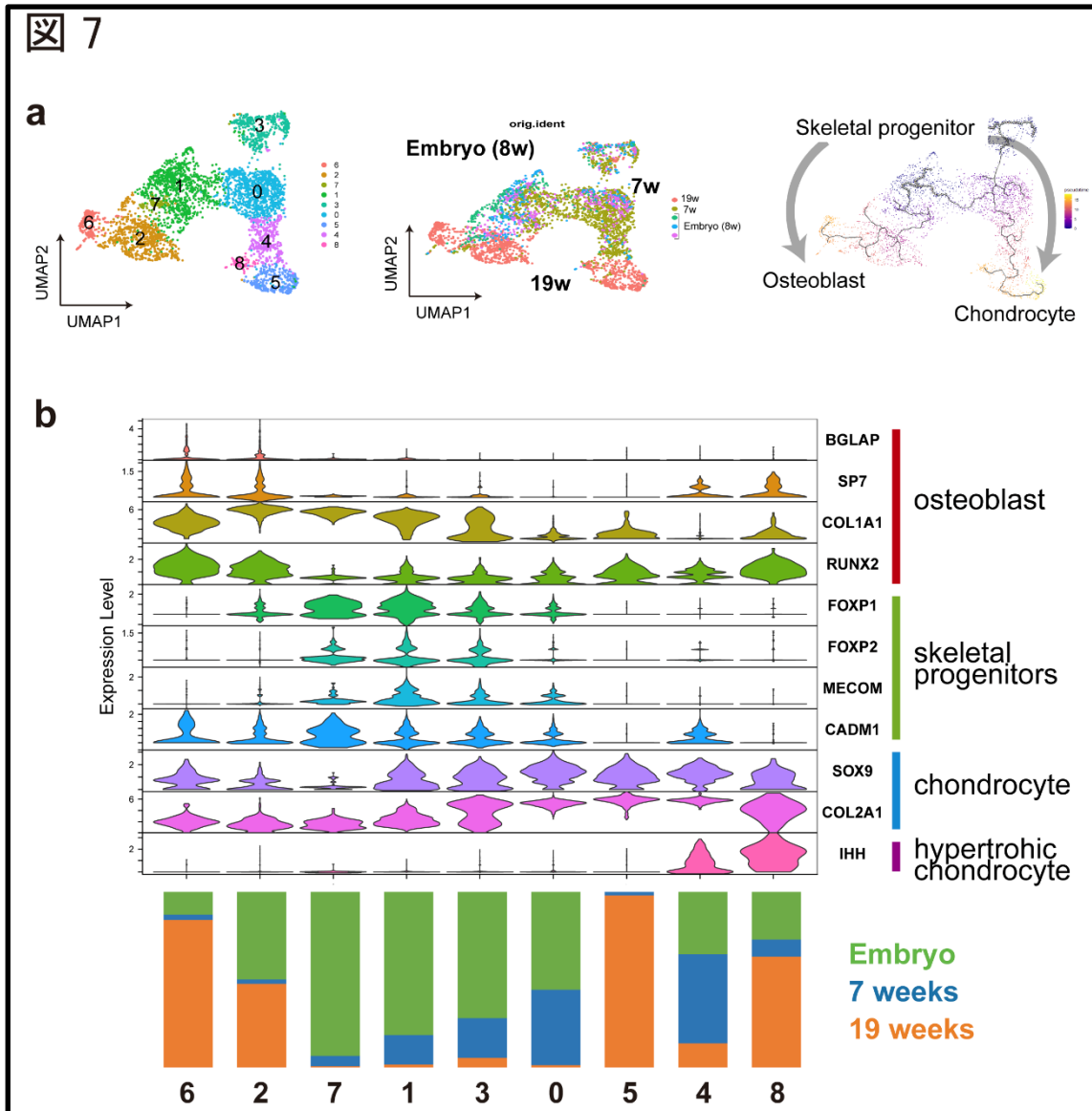
3-2-2 ヒト骨格系細胞に対する 1 細胞 RNA-seq 解析およびヒト胎児データセッ

トとの統合解析

改めて、ヒト細胞集団に対してクラスタリング解析を行い、骨格系細胞における複数のマーカー遺伝子発現の確認を行ったところ、大きく分けて軟骨系統（クラスター：0, 2, 3, 7, 8, 10）、骨系統（クラスター：1, 6, 9, 11）、および中間段階の前駆細胞集団（クラスター：4, 5）から構成される 12 のクラスターに分類された（図 6c 上段、6d）。また、UMAP において一部で重複は見られるものの、およそ 7 週目の細胞群が中央、その両側に 19 週目の細胞群が位置しており、7 週目の細胞群が比較的近い関係性であるのに対して、19 週目の細胞集団は大きく 2 つの集団に分かれた（図 6c 中段）。また、各クラスターにおける 7 週および 19 週目のサンプルの構成比率は、7 週目のサンプルでは、前駆細胞から軟骨細胞が大きく占め、逆に 19 週目のサンプルでは、肥大軟骨や骨芽細胞の比率が大きい結果であった（図 6d）。さらに、前駆細胞群を基準に Pseudotime 解析を行うと、中央の前駆細胞から骨芽細胞および軟骨細胞へ分岐する 2 つの分化系譜が示された（図 6c 下段）。これは 7 週および 19 週目のサンプルにおいて、組織の成熟がより進んだ結果を反映している可能性が考えられた。加えて、各クラスターの特異的発現遺伝子（DEG：Differentially Expressed Genes）に対して、それぞれ Gene

Ontology 解析を行ったところ、それぞれの細胞種に特徴的な GO term が複数検出された (図 6e)。

さらに、本研究におけるデータの妥当性を検証することを目的に、すでに公開されている 8 週齢ヒト胎児長管骨のデータセットとの統合解析を試みた³⁷。2 つのデータの間には部分的に重複がみられ、胎児期において特徴的な細胞集団である骨格幹細胞・前駆細胞をはじめ、共通した骨軟骨細胞集団を有していた (図 7a-b)。これは、誘導骨組織が胎生期の内軟骨性骨化を模倣している可能性があること、また側板中胚葉由来の長管骨と沿軸中胚葉由来の体幹骨が、骨発生過程において類似の骨格前駆細胞を有することも示唆する結果であると考えられた。さらに、骨格前駆細胞を基準とした場合、共通の骨格前駆細胞から骨軟骨それぞれへ至る分岐した分化系譜も描出された (図 7a 右図)。これは、骨と軟骨が骨軟骨前駆細胞という共通の起源から生じることを反映した結果と考えられた。以上より、1 細胞解析によって、遺伝子発現レベルにおいても、得られた組織が生理的な内軟骨性骨化過程を再現していることが示唆された^{37,43}。



7: ヒト多能性幹細胞由来骨組織およびヒト胎児長管骨 (8週) データセット

との統合解析

(a)左: 統合データセットを用いたクラスタリング解析。中: 由来サンプルごとに細胞を標識したもの。右: 胎児骨格前駆細胞を規定して作成した Pseudotime 解析。胎児長管骨 (1079 細胞)、7週 (1691 細胞)、19週 (1147 細胞)。(b)クラスター間の骨軟骨マーカー遺伝子発現比較とクラスターを構成する由来サンプル比率。

3-3 小括

ヒト多能性幹細胞より分化誘導した椎板細胞を、免疫不全マウス腎被膜下へ移植することで得られた骨組織に対して、時系列で1細胞 RNA-seq 解析を行った。初期の軟骨主体の組織から骨組織へ分化成熟していく過程が、異なる細胞種において発現する遺伝子群の推移から示された。また、ヒト胎児のデータセットと比較統合することで、胎児期に特徴的な骨格前駆細胞が、ヒト多能性幹細胞由来骨組織においても存在している可能性が示された。これらは、誘導した骨組織が胎生期の内軟骨性骨化を再現しているだけでなく、側板中胚葉および沿軸中胚葉由来の骨発生において、共通の骨格前駆細胞が存在することを示唆する結果であると考えられた。

第4章 ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する1細胞多層解析

背景と目的

遺伝子そのものはあくまで情報であり、多くの場合、これらの情報が読み込まれ（転写）具現化する（翻訳）ことで、生物学的な機能を発揮する。この転写制御機構には、クロマチン構造変化や、DNA/ヒストンの化学修飾に代表されるエピゲノム機構が重要であることが知られている⁴⁴。クロマチン構造が閉じている状態（Heterochromatin）では、転写因子やRNA合成酵素などの転写に関わるタンパク質群が、遺伝子制御領域へ到達できず転写が行われぬ。一方、クロマチン構造が緩んだ状態（Euchromatin）においては、これらの転写制御を担うタンパク質群が、遺伝子転写制御領域へ作用し、遺伝情報がmRNAとして転写される。このように、クロマチンアクセシビリティは、遺伝子発現を制御しているエピゲノム機構の一端であると考えられ、細胞の分化状態に応じてダイナミックに遺伝子発現を調整していることが知られている⁴⁴。

これまでの結果で、ヒト多能性幹細胞より誘導した骨組織が、組織学的にも遺伝子発現においても内軟骨性骨化をよく再現していることが示された。そこで、内軟骨性骨化におけるダイナミックな遺伝子発現制御機構を明らかにすべく、1細胞多層解析(ATAC sequencing: ATAC-seq および RNA-seq)を行った(図 8a)。

さらに、骨芽細胞の分化系譜における特異的な発現遺伝子およびクロマチンアクセシビリティの動的な変化を検証し、骨形成の転写制御ネットワークを構成する転写因子の探索・同定を目指した。

4-1 材料と方法

4-1-1 骨組織誘導および細胞の単離

hESC-2 を使用し、1-1-2 および 2-1-1 同様に椎板細胞へ分化誘導後、免疫不全マウス腎被膜下へ移植した。移植後 20 週経過した組織を用いた。

骨芽細胞の回収率改善を目的に、3-1-1 で述べた方法を以下の通り修正を加えて実施した。簡単に修正点を記載する。Liberase TM 溶液 (1 WU/mL D-PBS(-)) に 0.125 mg/mL DNaseI (Roche、10104159001) を添加して使用した。また、反応液は 1 時間ごとに回収を行い、それを 3 回反復した。その後、0.1 % BSA を添加した 5 mM EDTA/D-PBS(-) 溶液⁴⁵ を加えて、37 °C で同様に 30 分反応させた。反応液を回収後、Liberase TM 溶液加えてさらに 30 分反応させた。この工程を 2 回反復し、最終的には合計 5 時間の反応時間とした。

4-1-2 1 細胞多層解析

<ライブラリー作成>

ライブラリー調整には、Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Reagent Bundle (10x Genomix, PN-1000283) を用いた。単離した細胞に対して Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression

Reagent Kits User Guide (CG000338)に準拠して、核抽出以降の操作を行った。核抽出の反応時間は5分とした。持ち込み核数は、10000を目安に核抽出液を調整した。シーケンスはNovaseq 6000 (Illumina) を用いて行い、得られたFastqファイルはCell Ranger arc (v1.0.1)⁴⁶とヒトゲノムリファレンス (GRCh38) を用いてマッピングおよびアノテーションを行った。

<データ解析>

Cell Ranger ARCによって得られたH5ファイルおよびtsvファイルから、Signac (v1.3.0)⁴⁷を用いて解析した。ATAC-seqにおけるピークコールは、推奨に従ってmacs2 (v2.2.7.1) を用いて行った。クラスタリングはRNA、ATAC、および統合的手法 (WNN: Weighted Nearest Nabors)²⁸を用いて行い、以降の解析にはWNN法によるクラスタリングを使用した。また、モチーフ解析はchromVAR (v1.14.0)⁴⁸を用い、リファレンスとしてJASPAR2020 (v0.99.10) およびBSgenome.Hsapiens.UCSC.hg38 (v1.4.3) を使用した。

3-1-3 および 3-1-4 と同様に Pseudotime 解析は monocle3、Gene Ontology 解析は clusterProfiler を用いて行った。また、1-1-5 と同様に RNA velocity 解析は velocityto および scvelo を用いて行った。

4-2 結果

4-2-1 ヒト多能性幹細胞由来骨組織における 1 細胞多層解析

ヒト内軟骨性骨化において、骨格系細胞の運命決定・分化におけるクロマチンダイナミクスを明らかにするため、椎板細胞移植後 20 週後の誘導ヒト骨組織を用いた 1 細胞多層解析 (ATAC-seq および RNA-seq) を行った。本解析では、mRNA 発現とゲノム上のオープンクロマチン領域を同一細胞の核内で同時に検出することが可能である。本多層解析において、遺伝子発現、オープンクロマチン領域、およびその両者の統合プロファイルを用いてクラスタリング解析を行った。その結果、両者を統合した方法 (Weighted Nearest Neighbors : WNN 法)²⁸ で、比較的明瞭にクラスターが分離されたため、以降の解析は WNN 法で得られたクラスターに基づいて行った (図 8b)。今回は、軟骨系の細胞が優位である点は異なるものの、これまでの 1 細胞 RNA-seq 解析結果と同様に、共通の前駆細胞を介して骨軟骨それぞれの集団を有することが遺伝子発現パターンから示唆された (図 8c)。RNA velocity 解析および Pseudotime 解析においても、一部の前駆細胞から骨芽細胞や肥大軟骨へ至る分化系譜が示唆された (図 8d)。

4-2-2 誘導骨組織におけるクロマチンアクセシビリティ動態の検証

前駆細胞から骨軟骨細胞への分化過程における、オープンクロマチン領域の変化を検討した。まず、骨芽細胞および肥大軟骨細胞の分化マーカーである *COL1A1* および *COL10A1* の遺伝子領域近傍のクロマチンアクセシビリティを確認したところ、遺伝子発現とそれに相関するオープンクロマチン領域が観察された (図 8e)。これらのオープンクロマチン領域は転写制御領域であることが予想され、遺伝子発現に正もしくは負に相関する領域群が推定された (図 8e)。一部の領域は細胞種特異的なクロマチンアクセシビリティを有しており、細胞種特異的な遺伝子発現の制御に関与することが示唆された (図 8e)。

続いて、クラスタリング解析により細胞種特異的なオープンクロマチン領域を探索した。転写因子モチーフに基づく転写因子活性と、その遺伝子発現について相関性が高いものを検索したところ、骨芽細胞のマスター転写因子である *RUNX2* が、遺伝子発現およびモチーフ活性が共に高いことが判明した (図 8g)。フットプリント解析により、骨芽細胞および肥大軟骨細胞において、*RUNX2* モチーフが、オープンクロマチン領域に特異的に集積していることが推定された (図 8f-g)。これらは、生理的な *RUNX2* の発現パターンや機能に合致する結果

であり、用いたサンプルや解析手法の妥当性を示唆する結果であると考えられる。

8

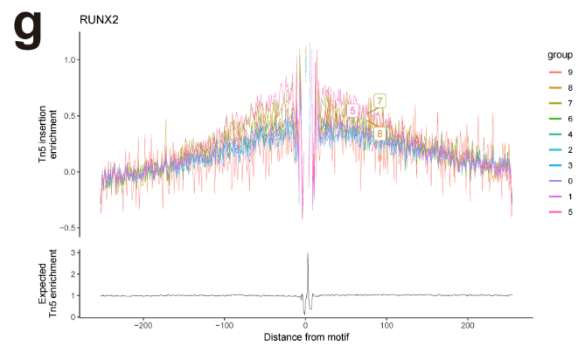
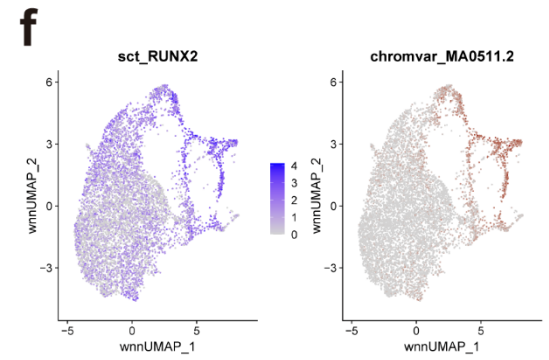
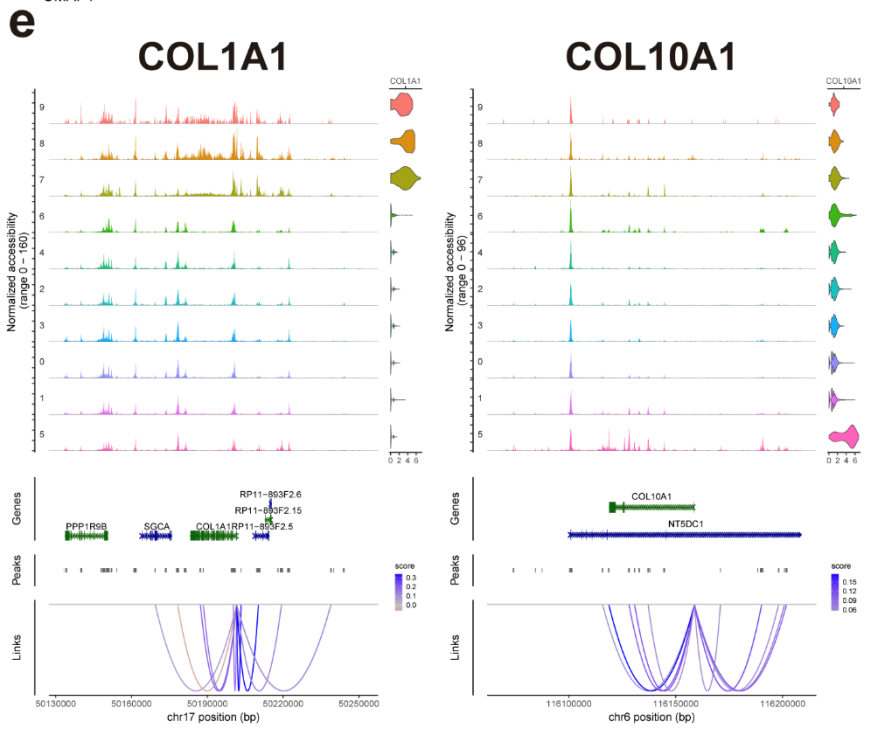
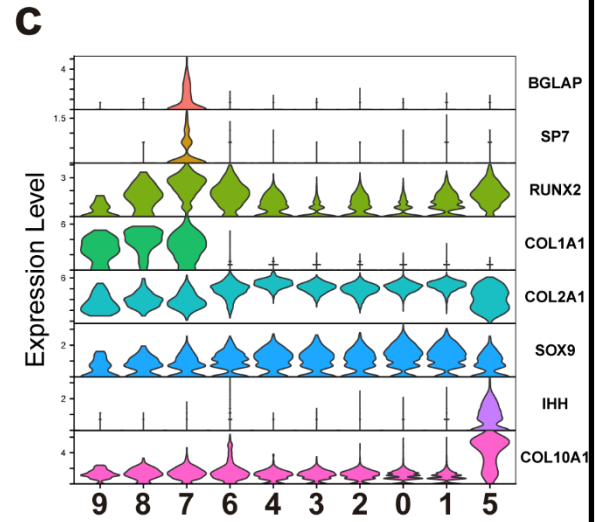
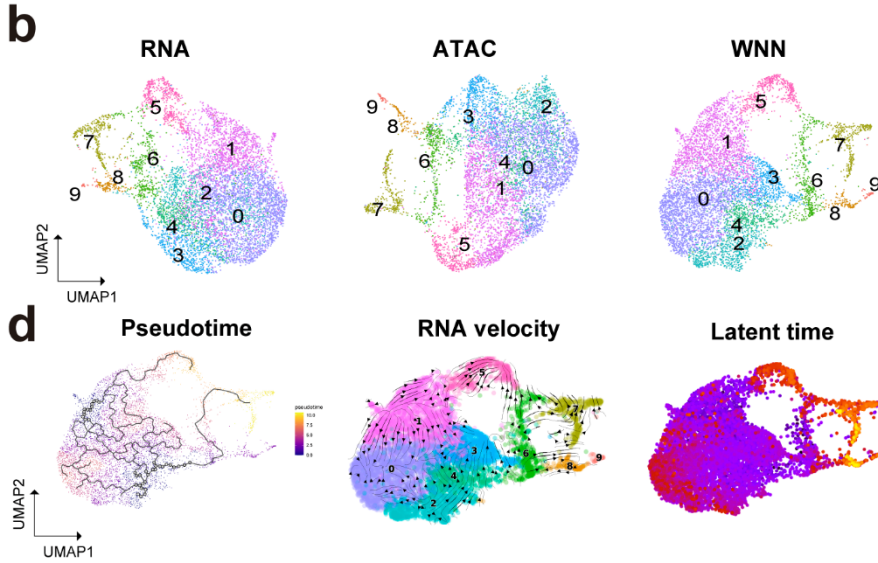
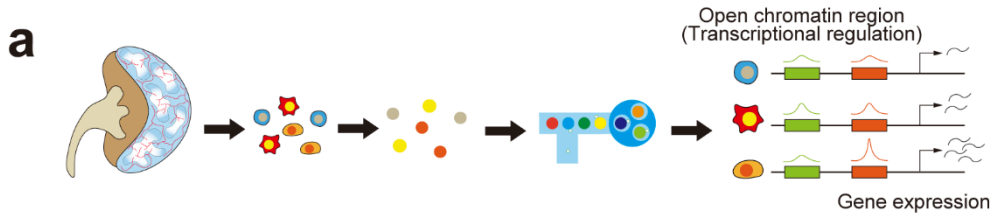


図 8：ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する 1 細胞多層解析

(a)実験の概略図。(b)データを前処理後の、遺伝子発現 (RNA)、オープンクロマチン領域 (ATAC)、そしてそれらの統合データ (WNN: Weighted Nearest Neighbor analysis) に対するクラスタリング解析の結果 (7771 細胞)。(c)クラスター間で各マーカー遺伝子発現を比較したもの。(d)左: monocle3 を用いた Pseudotime 解析、中-右: scVelo を用いた RNA velocity と Latent time 解析。(e)各クラスターにおける COL1A1 または COL10A1 遺伝子の発現量、近傍のオープンクロマチン領域の集積、および遺伝子発現との関連が予測されるピークの結び付け。(f)代表的な骨芽細胞マスター転写因子である RUNX2 の遺伝子発現 (左) および転写因子モチーフ活性 (右) の比較。(g)RUNX2 の転写因子モチーフにおけるフットプリント解析 (クラスター毎に表示したもの)。

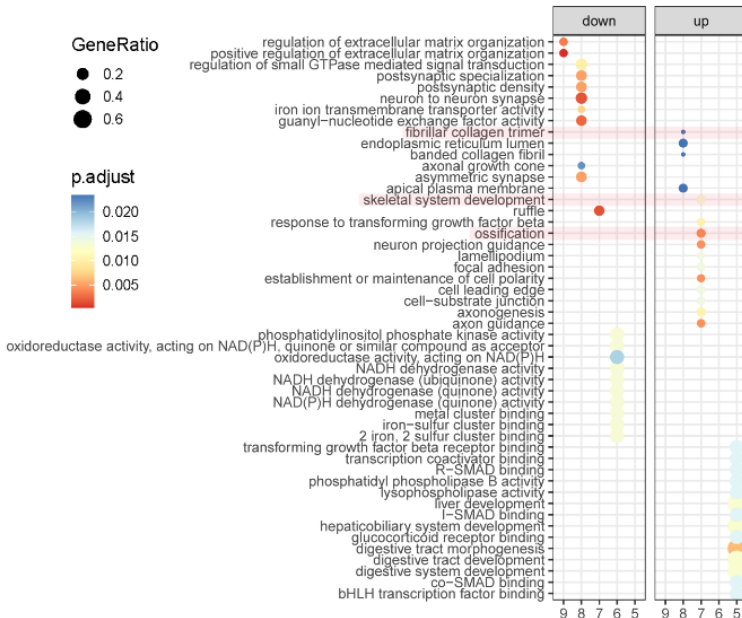
4-2-3 骨芽細胞分化系譜に特異的な転写制御因子の探索と同定

これまでに得られたデータを用いて、骨芽細胞の運命決定に關与する新規転写因子の探索を試みた。まず、前述の解析により得られた骨芽細胞特異的なオープンクロマチン領域に対して Gene Ontology 解析を行ったところ、骨形成に關連する遺伝子群や骨系統疾患に關連する遺伝子群と高い相関がみられた。そのため、これらのオープンクロマチン領域は、骨芽細胞や骨形成に重要な遺伝子群を制御する転写制御領域であることが示唆された (図 9a-b)。以上の結果を踏まえて、骨芽細胞特異的な発現遺伝子に加えてクロマチンアクセシビリティのプロファイルを統合することで、より詳細な転写因子候補の検索ができないかと着想した。そこでまず、遺伝子発現解析に基づいて骨芽細胞特異的に発現する遺伝子群を抽出した (図 9c)。続いて、RNA velocity 解析において骨芽細胞分化への寄与が推定される遺伝子を抽出した (図 9c)。これらの中で、重複する 20 種類の転写因子は、骨芽細胞の分化や状態変化において中心的な役割を担っている可能性が高いと考えた (図 9c)。さらに、骨芽細胞特異的なクロマチンアクセシビリティのプロファイルを統合し、骨芽細胞特異的なオープンクロマチンに關与する 13 種類の転写因子を選抜した (図 9c)。候補として抽出された転写因子の中には、RUNX2 や DLX5 のように既知の骨芽細胞制御因子が含まれていた (図

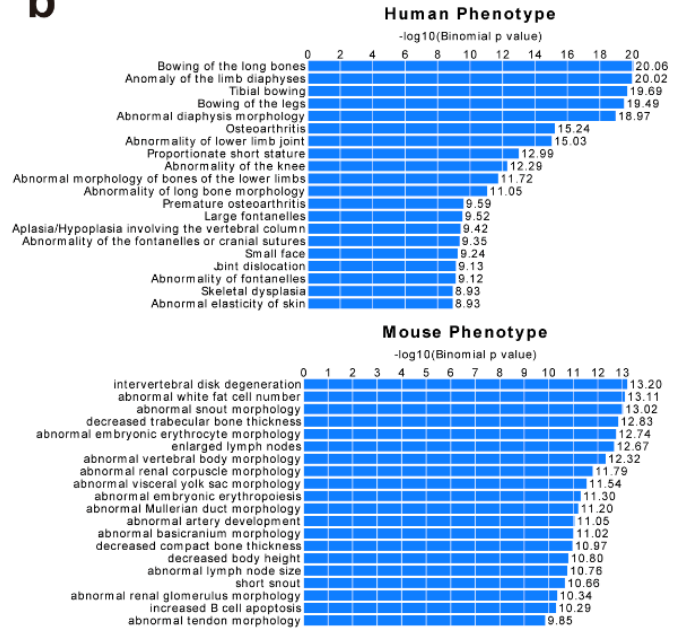
9c)。これら既知の因子を除外した結果、新規転写因子候補として ZEB2 を同定した (図 9c)。ZEB2 は、骨芽細胞系の細胞集団で特異的な発現がみられ、その発現には骨芽細胞特異的なオープンクロマチン領域が関与する可能性が示された (図 9d)。

9

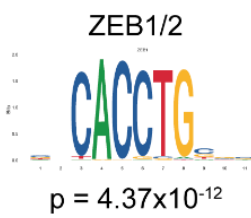
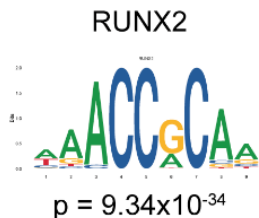
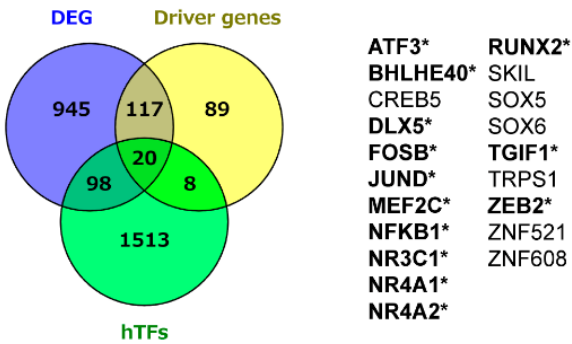
a



b



c



d

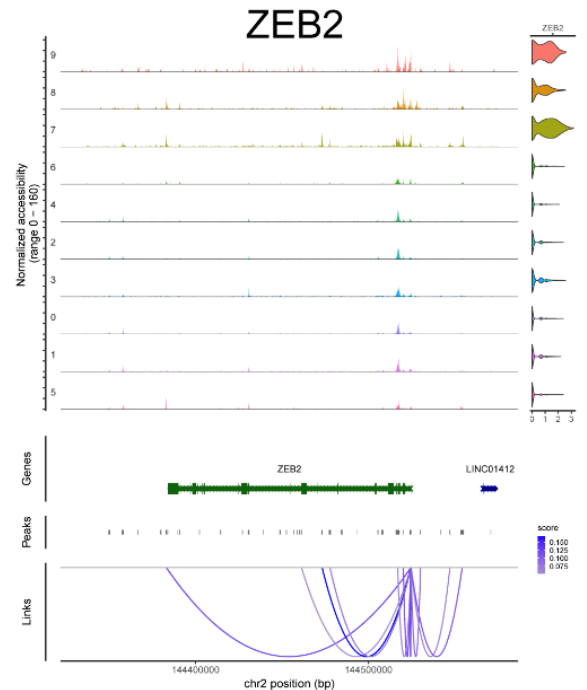


図 9：1 細胞多層解析を応用した新規骨分化制御因子候補の抽出

(a-d) 図 8 の解析で得られた骨芽細胞集団特異的なオープンクロマチン領域に対する Gene Ontology 解析(a)骨芽細胞に関連する項目を標識した。(b)用いたピークを元に予測されたヒトおよびマウスの表現型情報。(c) 図 8 における骨芽細胞集団に特異的な発現遺伝子 (DEG: Differentially expressed genes) と RNA velocity 解析において予測された骨芽細胞に特異的な遺伝子 (Driver genes)、およびヒト転写因子データベースを掛け合わせて得られた 20 の候補転写因子。その中でも骨芽細胞特異的にモチーフが検出された転写因子をさらに*で標識した。代表的な骨芽細胞マスター転写因子 RUNX2 とともに抽出された ZEB2 についてモチーフおよびp値を下に示した。(d) 図 8e と同様の解析を ZEB2 に対しても行い、クラスター毎の遺伝子発現やピークを示した。

4-3 小括

ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対して、1細胞 ATAC および RNA-seq よりなる多層解析を行った。遺伝子発現だけでなくクロマチンアクセシビリティにおいても、骨格系細胞の分化系譜が再現された。加えて、統合解析の結果、骨芽細胞分化に重要な役割を有している可能性がある新規転写因子として、ZEB2 が抽出された。

第5章 ヒト骨芽細胞分化系譜に特異的な転写制御因子の機能解析

背景と目的

ZEB2 は、Zinc Finger E-Box Binding Homeobox (ZEB) ファミリーの一つであり、ZEB1 と同じファミリーに属する。別名として、Smad interacting protein 1 (SIP1) や Zinc finger homeobox 1b (Zfhx1b) としても知られる。ファミリーである ZEB1 と共通のモチーフ配列を有しているが、脊椎動物において ZEB2 は ZEB1 よりも高い保存性を有する^{49,50} (図 9c)。ZEB ファミリーは、上皮間葉移行に関連する重要な因子であり、がん領域に加えて神経や筋肉の発達においても研究されている⁵⁰⁻⁵²。一方で、ZEB2 は、ハプロ不全によってモワット・ウイルソン症候群をきたす原因遺伝子として臨床的には知られている⁵³。主な特徴として、重度知的障害、特徴的顔貌、小頭症、ヒルシュスプルング病 (巨大結腸症) が報告されており、頭部における骨格異常がみられるものの、そのほかの骨格についての詳細はよく知られていない^{50,53}。

ZEB2 は胎生期よりその発現や機能の重要性が知られている。神経管や沿軸中胚葉領域において広く発現がみられ、Zeb2 の null 欠失において胎児期の体節形成に異常をきたすことが報告されており、発生過程におけるその重要性が認識されている⁵⁴。また、Zeb2 の null 欠失は胎生致死であることがマウスの実験か

ら明らかにされているが、骨格特異的な欠失における表現型の報告はなく、ZEB2の骨形成や骨芽細胞分化への寄与は未だ不明である^{50,55}。

そのため、ZEB2の骨形成や骨芽細胞分化における役割を明らかにする目的で、*in vitro* および *in vivo* 実験系において解析を行った。具体的には、ヒト多能性幹細胞由来の骨組織およびマウス骨組織を用いて、ZEB2の発現を組織学的に解析した。さらに、ZEB2の機能を明らかにするため、機能喪失実験および機能獲得実験を *in vitro* において検証した。

5-1 材料と方法

5-1-1 *in situ* hybridization

RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent kit v2 (Advanced Cell Diagnostics、323100)、4-Plex Ancillary Kit (Advanced Cell Diagnostics、323120)、および各種プローブ (RNAscope Target Probe-Hs-SP7 ; 802741、RNAscope Target Probe-Hs-ZEB2-C2 ; 404271-C2、RNAscope Target Probe - Hs-RUNX2-C3 ; 440071-C3、RNAscope Target Probe-Hs-ZEB1-C4 ; 313191-C4) を使用した。また、標識用の蛍光は推奨に従って Opal 520 (Akoya Biosciences、FP1487001KT)、Opal 570 (Akoya Biosciences、FP1488001KT)、Opal 650 (Akoya Biosciences、FP1496001KT)、および Opal 690 (Akoya Biosciences、FP1497001KT) を使用した。

<サンプル調整>

4-1-1 同様に、hESC-2 (H9Zn2.3GFP) を使用して骨組織誘導を行い、24 週経過した組織を使用した。組織の固定は、新鮮な (未開封) 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液を使用し、4 °Cで 36–48 時間浸漬して行った。2-1-3 同様に、エタノールによる脱脂を行い、0.5 M EDTA/D-PBS(-)溶液中に 4 °Cで 1~2 週間浸漬して脱灰処理を行った。ただし、すべての操作において RNase 除去操作

(RNase 汚染除去剤；thermo scientific、7002JP) を徹底し、用いる溶液はすべて超純水 (Mili-Q；Milipore) ないしは RNase フリー規格品 (UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water；Invitrogen、10977023 または D-PBS(-)；Gibco、14200166) を使用、容器についても乾熱滅菌またはオートクレーブ滅菌 (乾熱滅菌不可のもの) したものを使用した。パラフィン包埋からブロック薄切までは、2-1-4 と同様に行った。染色に用いるスライドはすべて推奨品 (スーパーフロストプラス スライドガラス；Fisher Scientific、12-550-20) を使用した。

<染色>

マニュアルに準拠して行った (https://acdbio.com/sites/default/files/323120-TN%204-Plex%20Ancillary%20Kit%20for%20Manual%20multiplex_incOpal780.pdf)。ただし、サンプルの離開を防ぐ目的で、下記の通り一部修正を加えた。賦活化液による加温は 90°C、15 分とした。また、プロテアーゼ処理は 40°C、3 分とした。染色後は DAPI 入り封入剤で用い、共焦点顕微鏡を用いて蛍光の観察を行った。

5-1-2 *Zeb2-EGFP* ノックインレポーターマウス

理化学研究所バイオリソース研究センターより凍結精子（ICR;129(Cg)-*Zeb2*<tm2.1Yhi>⁵²）の提供を受け、本学医学系研究科附属疾患生命工学センター動物資源領域（発生工学サービス）へ依頼して個体化を行った。なお、個体化に用いる妊娠マウス（E17.5）の一部から胎児を採取し、下記の通り遺伝子型判定を行った後に凍結切片を作成した。

<遺伝子型判定（ジェノタイピング）>

マウスの尾もしくは趾の一部を採取し、1 μ l の Protease K (Invitrogen、25530049) を加えた 100 μ l の溶解液（DirectPCR Lysis Reagent；Viagen Biotech、102-T）に浸潤し、58 $^{\circ}$ Cで一晩消化した。100 $^{\circ}$ Cで15分ボイルした後に、4 $^{\circ}$ C、15000 rpmで15分遠心し、上清をPCRに用いた。提供元の理化学研究所バイオリソース研究センターのホームページに掲載されているPCRプロトコルに従って、KOD FX Neo (Toyobo、KFX-201)を用いてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動（UltraPure Agarose；Invitrogen、16500500）により遺伝子型を判定した。

https://knowledge.brc.riken.jp/resource/animal/card?brc_no=RBRC01925&__lang__=j

a)

用いたプライマーは次のとおりである。

Forward (5'-3') : GATGGGAAAATGGAAACCAAATCAGACCAC

Reverse1 (5'-3') : TTCTGTCCCTCTCTACAGCTTCCTGGAAGC

Reverse2 (5'-3') : TCGTGCTGCTTCATGTGGTTCGGGGTAGC

5-1-3 組織染色・免疫組織染色

レポーターマウスについては、2-1-3と同様に、凍結組織切片を作成した。ただし、組織の固定処理は3時間とした。その後2-1-5と同様に、組織染色（HE染色）ないしは免疫組織染色（蛍光染色）を行った。組織像はNanoZoomer S60バーチャルスライドスキャナ、蛍光の観察は共焦点顕微鏡で行った。

5-1-4 Short hairpin RNA による *ZEB2* ノックダウン

目的の配列を有する大腸菌グリセロールストック（SHCLNG-NM_014795 : TRCN0000013528）を購入し、抗生剤（100 μ g/mL Carbenicillin : Sigma-Aldrich、C3416）を添加した寒天培地（LB Agar ; Invitrogen、22700025）を用いて、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。シングルコロニーを採取後に、抗生剤添加培地（LB Broth Base ; Invitrogen、12780052）で培養し、DNAを精製（NucleoBond Xtra Midi ; MACHEREY-

NAGEL、U0410B) した。なお、pLKO-scramble shRNA⁵⁶をコントロールとして用いた。

理研バイオリソース研究センターより購入した HEK293T 細胞株を、基礎培地 (10 % FBS と抗生剤を含む DMEM 培地) で培養し、トランスフェクションを行った。精製したプラスミド DNA 5 μ g、psPAX2 (Addgene、12260) 3.75 μ g、および pMD2.G (Addgene、12259) 1.25 μ g、に対して FugeneHD (Promega、E2312) 30 μ L、Opti-MEM 培地 (Gibco、31985062) 250 μ L 用いて混和、室温で 15 分静置後に基礎培地へ混合し培地交換を行った。一晚培養後、翌日に基礎培地へ一度交換してさらに一晚培養を継続した。翌日培地を回収し、フィルター (Millex-HP Syringe Filter Unit, 0.45 μ m ; Millipore、SLHPR33RS) でろ過した培地上清 (ウイルス溶液) に対して 4 倍量の基礎培地を加えた。また、遺伝子導入にはポリブレン法を用い、ポリブレン (Hexadimethrine bromide ; SIGMA、107689) を D-PBS(-) へ 6 mg/ml の濃度で溶解し、フィルターでろ過滅菌した後に終濃度 6 μ g/mL となるようにウイルス溶液へ添加した。同様の操作を半日後にもう一度行った。さらに半日後に、ウイルスを含まない基礎培地へ交換して培養を継続した。なお、使用するヒト間葉系幹細胞は、前日に凍結ストックより解凍・播種して準備を行った。細胞の薬剤選択は、基礎培地に 2 μ g/ml Puromycin (Sigma-Aldrich、P9620)

を加えて2日間行った。遺伝子導入を未実施（薬剤耐性遺伝子が未導入）の細胞をコントロールとし、それらが死滅することを確認した。

5-1-5 細胞培養と骨芽細胞分化誘導

ヒト間葉系幹細胞（LONZA、PT-4105）を用いた。専用培地（MSCGM BulletKit；LONZA、PT-3001）で増殖・播種し、凍結ストックしたものを遺伝子導入前日に播種して使用した。各実験に用いる際は、10 % FBS と抗生物質を含む DMEM 培地（基礎培地）に 5 ng/ml の FGF2 を添加して用いた。薬剤選択が終了した細胞は、FGF2 を添加した基礎培地で十分な細胞密度まで培養を行い、骨芽細胞分化誘導を行った。

骨芽細胞分化誘導には、基礎培地に 50 mg/mL アスコルビン酸（Sigma-Aldrich、A4034）、10 mM β -グリセロリン酸（Sigma-Aldrich、G9422）、および 0.1 mM デキサメタゾン（Wako、41-18861）を加え、フィルターでろ過滅菌したもの（骨誘導培地）⁴に、100 ng/ml BMP2（Medtronic、7510050）を都度添加して使用した。培地交換は2-3日ごとに行った。

5-1-6 RNA-seq 解析

D-PBS(-)で洗浄後に、ISOGEN を用いて RNA を回収した。1 ml の ISOGEN に対して 0.2 ml のクロロホルム (Wako、035-02616) を加え、15 秒ボルテックス後、4 °C、20000 g で 15 分遠心した。水層を可及的に回収し、0.5 mL のイソプロパノール (Wako、164-08335) と混合後、10 分室温で静置した。その後 RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit ; Qiagen、74106) を用いて、プロトコル通りに精製した。なお、添付の DNase を用いて、RNA 精製中に内在性 DNA を除去した。Nanodrop で精製した RNA 量や質を確認し、サンプル調整 (TruSeq stranded mRNA) およびシーケンス (Novaseq 6000 ; Illumina) を行った。

データ解析は、1-1-5 と同様に行った。クラスタリング解析は、k-means clustering によって 2000 遺伝子および 4 群の設定で行った。得られた各群に対して、Gene Ontology 解析も行った。

5-1-7 発現ベクターおよび ZEB2 の過剰発現

目的の cDNA (VB201211-1039gkb) は、VectorBuilder (神奈川) より購入した。Q5 (BioLabs、M0491) を用いて、目的の配列を PCR で増幅し、レトロウイルス

ベクター (pMX-IRES-bsr)⁵⁷へ挿入後に、遺伝子発現実験に用いた。用いたプライマー配列は以下のとおりである。

Forward(5'-3') : GCCACCATGAAGCAGCCGATCATGGC

Reverse(5'-3') : ATGCGGCCGCTTACTTGTCATCGTCATCCT

レトロウイルスベクターの増幅は、大腸菌 (NEB Stable Competent E. coli ; BioLabs、C3040I) を用い、添付のプロトコルに従って行った。シングルコロニーを採取後、抗生剤入り LB 培地で一晩培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen、27106) を用いて抽出した。目的とする産物の確認は、アガロースゲル電気泳動で行った。EcoRI (BioLabs、R3101) を用いて 37 °C、1 時間の条件で切断し、切断部は DNA Polymerase I (BioLabs、M0210) を用いていったん鈍端にした。挿入する cDNA および直鎖化したレトロウイルスベクターを共通の制限酵素 NotI (BioLabs、R3189) を用いて 37 °C、1 時間の条件で切断した。その際、自己環状化防止目的に、ベクターには CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase ; Takara) を添加して脱リン酸化した。アガロースゲル電気泳動を行い、目的の産物を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて抽出操作を行った。得られた cDNA およびベクターは Rapid DNA Ligation Kit (Roche、11635379001) を用

い、プロトコルに従ってライゲーションを行った。ベクターに対して3倍濃度のcDNAを混合し、反応時間は25℃、5分で行った。得られたプラスミドを大腸菌（NEB Stable Competent *E. coli*）へ導入し、前述同様に QIAprep Spin Miniprep Kitで抽出した。ライゲーションの確認は、NotIで切断後にアガロースゲル電気泳動で行った。適切にライゲーションされたサンプルは、大腸菌でさらに増幅し、NucleoBond Xtra Midi（MACHEREY-NAGEL、740410.50）を用いて精製してから実験に使用した。

目的細胞への遺伝子導入は、5-1-4同様に行った。また、GFP発現レトロウイルスベクター（pMX-GFP）⁵⁶をコントロールとして用いた。薬剤選択については2 µg/ml Blasticidin（Wako、029-18701）を培地に添加し、2日間行った。

5-1-8 RT-qPCR

5-1-6と同様の方法でRNAを抽出し濃度等を測定した。その後、1-1-3と同様の方法で一本鎖cDNAを逆転写反応により生成し、RT-qPCRを行った。

5-1-9 統計学的解析

JMP Pro 16を使用し、Dunnettの検定を用いて解析した。分化誘導前のコントロール群をコントロールとし、各群と比較した。

5-2 結果

5-2-1 ヒト多能性幹細胞由来骨組織における ZEB2 の組織学的解析

ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対して *in situ* hybridization を行い、ZEB2 の発現を検討した。比較のために同じファミリーである ZEB1 や骨分化マスター転写因子である RUNX2 および SP7 の発現パターンを検証した。解析の結果、RUNX2 と SP7 の発現は、既存の知見に合致して、骨殻や骨髄の骨組織および軟骨組織の一部でみられた (図 10a)。一方で ZEB2 の発現は、骨組織に比較的強く発現するパターンを呈し、RUNX2 および SP7 と一部共発現していた (図 10a)。これは 1 細胞解析の結果と合致するだけでなく、骨芽細胞分化において RUNX2 や SP7 といった因子との相互作用の可能性を示唆する結果である。

5-2-2 Zeb2-EGFP ノックインマウスにおける ZEB2 の組織学的解析

続いて、Zeb2 遺伝子領域へ GFP をノックインしたマウスを用いて、骨格組織における ZEB2 の発現パターンを検証した。既報の通り、筋肉等で発現がみられる一方で、骨組織においても骨殻や海綿骨に局限する発現がみられた (図 10b)。加えて SP7 への免疫組織化学染色を併用することで、骨組織において ZEB2 と SP7 が共発現していることが示された (図 10b)。以上から、ZEB2 が骨格組織においてヒトおよびマウスに共通した発現パターンを呈することが示された。

RUNX2 や SP7 との共発現の結果から、ZEB2 はこれらの因子群とともに、骨芽細胞の分化や維持に重要な転写制御ネットワークの構築に寄与している可能性が示唆された。

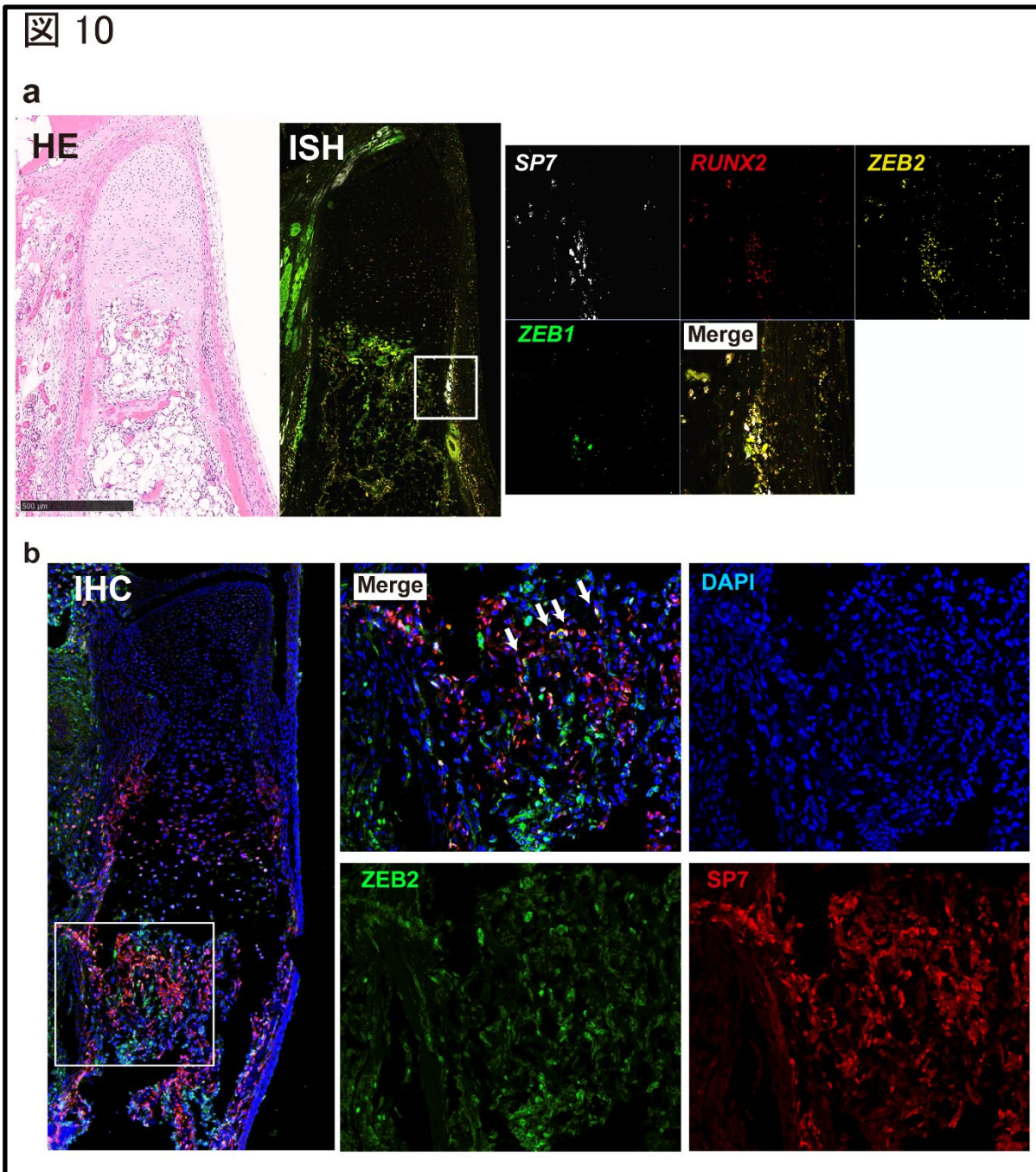


図 10：新規骨形成制御因子候補 ZEB2 の組織学的検証

(a) *in situ* hybridization (RNAscope) を用いた、ヒト多能性幹細胞由来骨組織 (24 週) における ZEB1、ZEB2、RUNX2 および SP7 の遺伝子発現解析、(b) Zeb2-GFP ノックインマウス (E17.5、脛骨) を用いた免疫組織学的解析による ZEB2 (GFP) と SP7 の発現解析。ZEB2/SP7 を共発現する細胞を矢印で示した。

5-2-3 ヒト間葉系幹細胞における *ZEB2* ノックダウンを用いた遺伝子発現解析

ZEB2 の骨芽細胞分化における役割を検証すべく、ヒト間葉系幹細胞に対して shRNA によるノックダウン法を行った。骨芽細胞分化前後における遺伝子発現を RNA-seq 解析によって網羅的に解析した。その結果、k-means クラスタリング解析により、分化誘導もしくは *ZEB2* ノックダウンによって発現が変動する遺伝子群を同定した (図 11a)。また、PCA 解析の結果からも *ZEB2* ノックダウンによって、本来骨芽細胞に分化する細胞集団が、異なる遺伝子発現プロファイルを有する細胞集団へ分化していることが示された (図 11a)。コントロール群と比較して、*ZEB2* ノックダウン群で発現が変動する遺伝子群に着目して Gene Ontology 解析を行ったところ、発現増加群では血管形成などに関連する GO term が数多く抽出された一方で、発現低下群では骨芽細胞分化や骨化に関する GO term が抽出された (図 11a)。以上より *ZEB2* は骨芽細胞分化を正に、血管形成を負に制御している可能性が示唆された。

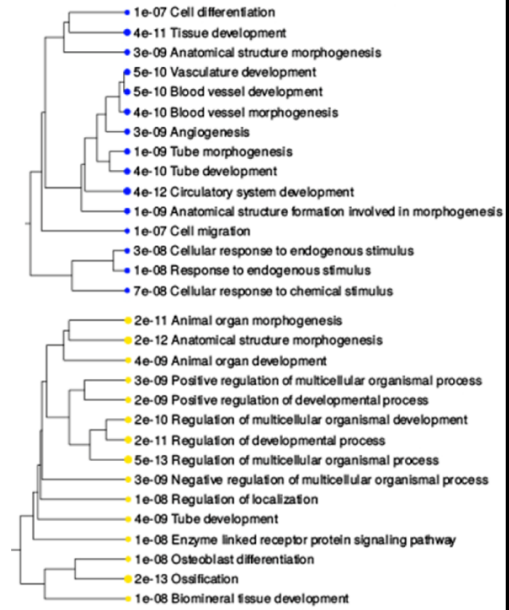
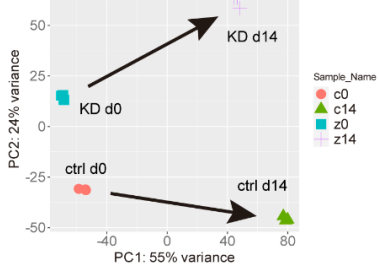
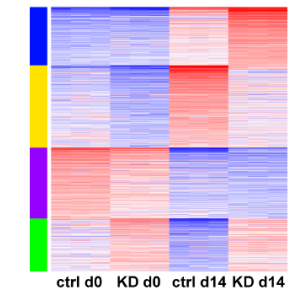
さらに、*ZEB2* ノックダウンにより発現が低下した遺伝子群には、*ZEB2* に加えて *RUNX2* や *SP7* を含む複数の既知の骨分化関連遺伝子がみられた。(図 11b)。したがって、*ZEB2* がこれらの骨分化関連因子の発現に関与していることが示唆された。

5-2-4 ヒト間葉系幹細胞における *ZEB2* 発現ベクターを用いた遺伝子発現解析

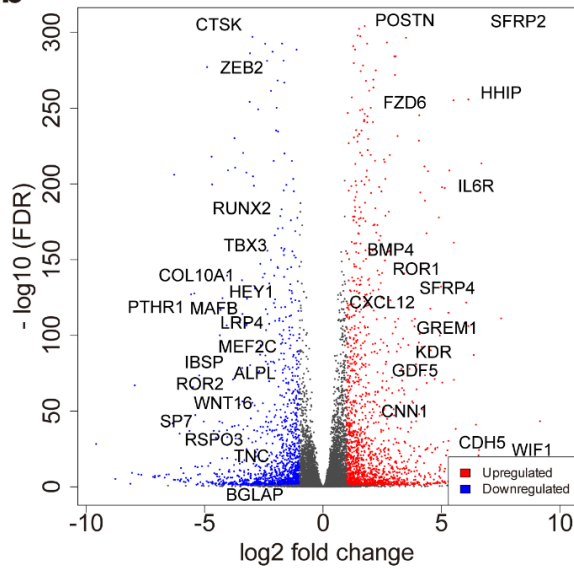
骨芽細胞分化に対する *ZEB2* の役割をさらに検証する目的で、*ZEB2* 発現レトロウイルスをヒト間葉系幹細胞に感染させ、機能獲得系実験を行った。その結果、*ZEB2* の発現上昇に加えて、骨芽細胞分化に関連する複数のマーカー遺伝子 (*SP7*、*IBSP*、*SPPI*、*ALP*、*BGLAP*) の発現上昇が確認された (図 11c)。以上の結果は、機能喪失実験の結果と一致しており、*ZEB2* が骨芽細胞分化に対して正の制御を行っている可能性を強く示唆するものである。

11

a



b



c

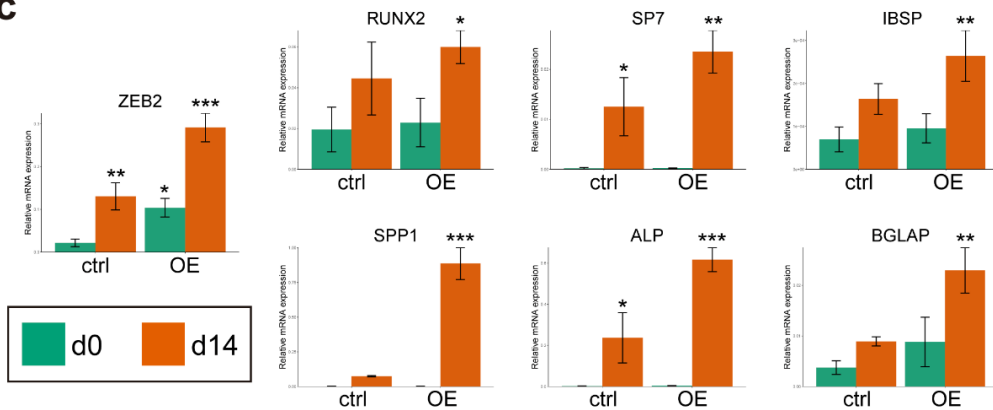


図 11： *in vitro* における機能喪失系および獲得系を用いた ZEB2 の機能解析

(a-b) ヒト間葉系幹細胞を用いた ZEB2 の shRNA ノックダウン解析。shRNA 導入後、骨芽細胞分化誘導培地で 14 日間培養した細胞を回収して RNA-seq 解析を行った (n=3)。(a)左上：サンプル間で特異的な発現遺伝子群をヒートマップで表示した。左下：ノックダウンおよび分化誘導前後におけるサンプル間の遺伝子発現プロファイルに基づいた関係性を PCA プロットによって示した。右：分化誘導後にノックダウンによって上昇もしくは低下傾向がみられた遺伝子集団について Gene Ontology 解析を行った。(b)ZEB2 ノックダウンによる発現変動遺伝子群の Volcano plot。骨芽細胞分化誘導培地で 14 日間培養した細胞を使用。骨芽細胞分化に関連することが知られている主要な遺伝子についてはその位置に遺伝子名を追記した。(c) ヒト間葉系幹細胞における ZEB2 強制発現による遺伝子発現解析。ZEB2 発現レンチウイルスを細胞に感染させ、骨芽細胞分化誘導培地で 14 日間培養した細胞を回収して RT-qPCR による主要な骨分化マーカー遺伝子の発現解析を行った (n=3)。ctrl；コントロール群、KD；ZEB2 ノックダウン群、OE；ZEB2 過剰発現群、d0；分化誘導前、d14；分化誘導後。統計解析は Dunnett の検定を用い、分化誘導前コントロール群 (ctrl d0) をコントロールとして各群と比較した。n.s；有意差なし、*； $p < 0.05$ 、**； $p < 0.005$ 、***； $p < 0.0001$

5-3 小括

1 細胞解析の統合解析により抽出した新規転写因子 ZEB2 は、骨組織の中で特に骨芽細胞で強く発現し、RUNX2 や SP7 と一部共発現していた。ZEB2 の発現は、ヒトおよびマウスで類似しており、骨発生における機能が種間で保存されている可能性が示唆された。さらに、ヒト間葉系幹細胞を用いた機能喪失・獲得系による評価の結果、ZEB2 の発現と主要な骨分化関連マーカー遺伝子の発現が正の相関を示した。これらの結果から ZEB2 は骨分化過程における転写制御ネットワークを正に制御している可能性が示唆された。

考察

本研究で得られた主な知見は以下の通りである。

1. ヒト多能性幹細胞から椎板細胞を効率的に誘導する方法を確立した。低分子化合物の組み合わせを最適化することで、組換えタンパク質製剤を汎用する既存の報告と同程度の性能を持った椎板細胞を、より簡便・安価に誘導することが可能になった。さらに、網羅的遺伝子発現解析によって、段階的な分化誘導過程の妥当性を示し、1細胞解析によって、*in vitro* 分化誘導における椎板細胞の多様性を明らかにした。
2. 誘導したヒト椎板細胞を免疫不全マウスへ移植することで、骨組織が形成されることを明らかにした。組織学的解析および1細胞解析によって、本法により形成される骨組織が、生理的な内軟骨性骨化過程をよく再現したものであることが明らかになった。
3. 1細胞多層解析を用いることで、骨形成過程における前駆細胞から骨芽細胞および軟骨細胞への運命決定・分化に伴う、ダイナミックな遺伝子発現・クロマチンアクセシビリティのランドスケープを明らかにした。

4. 骨芽細胞運命決定に関わる主要な転写因子群を明らかにした。加えて、新規転写因子 ZEB2 が、RUNX2 や SP7 と協調し、ヒトの骨形成における転写制御ネットワークの一端を担っていることを示した。

以上より、本研究はヒト沿軸中胚葉の分化過程から内軟骨性骨化による体幹骨の形成過程まで、幅広くヒトの骨格形成過程を解析するためのツールとなりえることから、将来的に更なる応用が期待される。また、本研究で得られた遺伝子発現・オープンクロマチンデータセットは、ヒト骨発生の研究基盤としての利用が期待され、臨床応用に向けた基礎的研究においても有用であると考えられる。

1. ヒト多能性幹細胞を用いた *in vitro* 椎板細胞誘導法の最適化

ヒト多能性幹細胞を用いた椎板細胞誘導は、これまでに報告されたいずれの方法においても、組換えタンパク質製剤を複数使用することを前提としている^{12,20,21}。本研究では低分子化合物のみを使用し、組み合わせを最適化することで、5日間という短期間でも同様の分化誘導が可能であることを示した。既存の文献で示されているように、組み換えタンパク質製剤を用いることで、多少の分化効率改善が得られる可能性は残るが、少なくとも本実験系においては明らかな差

は見られなかった。また、多能性幹細胞から椎板への段階的な誘導を RNA-seq 解析によって、誘導した椎板の多様性を 1 細胞 RNA-seq 解析によって詳細に評価し、十分な分化誘導が得られていることを示した。加えて、異なる複数のヒト ES 細胞および iPS 細胞株を用いた分化誘導においても、細胞株の種類によらず高い再現性を示した。したがって本法は、椎板細胞および移植による骨組織誘導という目的において、十分な妥当性と有用性を有していると考えられる。さらに、基礎培地や誘導因子を簡便化している点は、既報と比較して本法の進歩性を支持するものであると考えられる^{12,20,21}。

既存の文献では、発生時期の解剖学的な位置による椎板の多様性が示されており、*in vitro* 分化誘導系においても同様に、遺伝子発現の点で多様な細胞集団の存在が示唆されている^{10,21}。しかし、その多様性に関して 1 細胞レベルで詳細に検討した報告はなく、今回 1 細胞解析を用いてその多様性を検討したことは、新規性が高いと考えられる。

一方、本研究における 1 細胞解析の結果は、異なる分化指向性を有する椎板細胞が複数存在することを示しており、骨軟骨を形成する特定の椎板細胞集団のみが誘導されているわけではないと考えられる。そのため、分化指向性の厳密な制御は、今後の検討課題である。異なる性質や分化能を有する多様な椎板細胞群

の中から、ある特定の細胞集団を選択的に誘導できれば、さらに効率的な骨形成が可能となると考えられる。

2. ヒト多能性幹細胞由来骨組織の誘導

マウス生体内へ細胞を移植することで組織形成を促す方法は、幹細胞研究においてよく用いられる手法であり、*in vitro* 培養系における組織形成の限界を解消するという点で、有効な手段である^{21,58}。移植部位は文献によって異なるが、およそ皮下と腎皮膜下が用いられている^{21,33}。本法では、その旺盛な骨形成から皮下ではなく腎被膜下を選択した²¹。

また、マウスへの移植を介した骨組織誘導法として、次の2点が考えられた。一つは、本法のように椎板細胞もしくは他の骨格系幹細胞、前駆細胞を移植する方法である。もう一つは、多能性幹細胞や椎板細胞からあらかじめ *in vitro* で誘導した軟骨組織を移植する方法である²¹。上記によって得られる骨軟骨組織は、その構造や成長が異なり、それぞれに利点と欠点が考えられる。軟骨組織を移植する場合、組織の大きさは移植時と比較してあまり変わらないのに対して、椎板細胞を移植する場合は、時に数cmの大きさに組織が成長することがある（既報⁸、²¹ および本研究の比較）。これは、胎生期の細胞である椎板細胞が、移植時点で

高い分化・増殖能を有していることを示唆している。そして、いったん軟骨形成を介した分化誘導が行われると、その旺盛な分化・増殖能は失われると考えられる。一方で、ある程度組織化された軟骨を移植したほうが、より整った組織を誘導できると予想される。つまり、運命決定や空間・足場がある程度制限されることで、分化や組織形成の方向性が、より秩序立てて制御されやすいのではないかと想定される³。逆に、細胞集団を単純に移植した場合は、秩序形成が不完全になりやすく、不均一な組織になりやすいのではないかと想定される。実際、本法における椎板細胞のマウスへの移植を介した骨形成では、完全に方向性が統率された組織構築は難しい。そのため、骨組織形成における方向性の制御は、今後の検討課題の一つであると考えられる。加えて、人体を構成する骨は200を超えるにも関わらず、それぞれが正確な位置関係、形状、そして大きさを保っている。これは、細胞自身の能動的な分化や成熟だけではなく、細胞同士または周囲の環境との受動的な相互作用によって、位置・形状・大きさが複雑かつ精密に制御されていると考えられる。この骨における“形”の制御機構は、先天性疾患の病態解明などにも関連するため、将来的にも機序の解明が期待される。

また、本法も含めて実験動物への移植を伴う組織形成の場合、ホスト動物の細胞混入は不可避である。本研究では、免疫染色および1細胞解析から、骨組織中

の血管および血球はホストであるマウス由来であると考えられた。そのため、骨形成におけるマウス細胞の関与は完全には除外できず、生理的なヒト骨発生と同一の機構であるとは断言できない。この点が、本法も含めた骨誘導におけるもう一つの検討課題である。しかし一方で、異なる種の異なる細胞種同士が、互いに協調して一つの組織を構築している（キメラ組織）点は、種間で保存された共通の骨形成機構が存在することを示唆するものであり、生物学的には更なる検討の価値があるかもしれない。残念ながら、臨床応用を念頭に置いた場合、異種動物成分が完全に除去できなければ、移植材としての使用は困難である。したがって、将来的には *in vitro* 培養系において、完全ヒト細胞由来の骨組織形成（骨オルガノイド）を実現することが望まれる。

3. ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する 1 細胞解析

ヒト椎板細胞をマウスへ移植することで誘導した骨組織に対して 1 細胞解析を行うことで、組織中の細胞の生物種を同定することが可能であった。本研究で用いた骨組織は、ヒトの骨格系細胞に加えてマウスの血管・血球系細胞が検出されたことから、ヒトおよびマウスの細胞が混在するキメラ組織であることが示唆された。本法で誘導した椎板細胞は、遺伝子発現の点から血管平滑筋への分化

能を有している可能性が示唆されたものの、組織中にはヒト血管平滑筋細胞の存在を確認できなかった。したがって、分化指向性に関して多様性を有していると考えられた椎板細胞から、どのように骨・軟骨細胞への限定的な分化が生じたのかという点については、未だに明らかになっていない。低酸素環境が軟骨形成を促進するとの報告があることから^{59,60}、移植細胞周囲の微小環境が、細胞の運命決定に関与した可能性は否定できない。もしくは、マウスへの移植時点で、まだ椎板細胞の分化指向性に可塑性が残っており、いずれの細胞も軟骨細胞へ運命決定された可能性も考えられる。重要なことに、未分化な多能性幹細胞の移植によって生じる奇形腫は、組織学的解析・1細胞解析いずれにおいてもみられなかった。以上より、その安全性については十分に担保できたものの、椎板細胞が有する分化指向性の精密な制御や、細胞の運命決定に関する機序解明は今後の課題である。

本研究では、誘導した骨組織のデータと公共データベース上のヒト胎児長管骨の1細胞解析プロファイルを統合・比較解析した結果、誘導した骨組織は、比較的未熟な胎生期に相当すると想定された。このように、多能性幹細胞から誘導した組織に対して、1細胞解析を用いて検証する方法は、他の臓器においてはそ

の有用性とともにも複数報告されているが、骨組織では未だ報告はなく、世界初の取り組みである^{61,62}。

4. ヒト多能性幹細胞由来骨組織に対する 1 細胞多層解析を用いた新規転写因子の探索と同定

本研究では、誘導した骨組織を用いた 1 細胞解析により、次にあげる新規データセットを構築した。これまでヒト骨発生における類似のデータセットは報告されておらず、初めての報告となる可能性が高い。

第一に、ヒト骨発生過程において、骨軟骨前駆細胞（胎児期骨格前駆細胞）から骨芽細胞系譜および軟骨細胞系譜を網羅するダイナミックな遺伝子発現プロファイルを取得した。本プロファイルには、成熟骨芽細胞分化マーカーである *BGLAP* 発現細胞や、前肥大・肥大軟骨細胞マーカーである *IHH* および *COL10A1* 発現細胞も含まれる。前述の通りヒト胎児骨組織由来データでは、このような成熟細胞がほとんど含まれておらず、本研究で得られたデータの価値は高い。今後は、骨芽細胞からさらに分化が進んだ骨細胞や、種々の骨格系幹細胞のプロファイルが含まれるか、解析を進める予定である。特に骨格系幹細胞は、その多様な性質や特徴から、様々なマーカー遺伝子とともに様々な細胞集団が報告されて

いる。代表例としては、古くから知られている間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal stromal cell) があるが、様々な臓器に存在する不均一な細胞集団であることが示唆されており、統一した見解に乏しいという欠点がある²。近年では、ヒトにおいて胎児期よりその存在や機能が示されている Skeletal stem cell (SSC)^{58,63} や、造血幹細胞のニッチ形成も担うとされる CXCL12 abundant reticular cell (CAR 細胞)⁶⁴ など、様々なマーカー発現に基づいた骨格系幹細胞がその有用性ととも報告されている²。しかしながら、各定義に基づく幹細胞集団の関係性は、未だ十分に明らかになっていない。そこで、本プロファイルを用いてその特異性を検証し、有用な骨格幹細胞マーカーの探索に加えて、様々な骨格幹細胞における性質の類似性や相違性を検討する予定である。

第二に、1細胞多層解析 (ATAC-seq および RNA-seq) により、骨発生におけるダイナミックなオープンクロマチン領域を同定した。オープンクロマチン領域の大部分は転写制御領域として機能することが知られており、本プロファイルは、骨発生における転写ネットワークを理解するための基盤となる。生物種間の保存性が高いことが知られている骨芽細胞特異的 *COL1A1* プロモーターや肥大軟骨細胞特異的 *COL10A1* 制御領域において、各細胞種特異的なクロマチンアクセシビリティが検出されたことから、得られたデータの妥当性は支持さ

れる。さらに、本プロファイルを用いた転写因子モチーフ解析に、遺伝子発現解析および RNA velocity 解析を統合することで、骨芽細胞における転写因子ネットワークの探索を試みた。本解析により得られた重要転写因子群の中には、骨芽細胞マスター転写因子の RUNX2 をはじめ、骨芽細胞分化に関わることが知られている転写因子群が複数含まれており、解析の妥当性を支持するものであった。今後、骨軟骨前駆細胞や異なる分化段階の軟骨細胞においても同様の解析を行い、骨発生における転写制御ネットワークの全貌解明に取り組む予定である。

また、これまでの転写ネットワークの理解は、主にマウス遺伝学を駆使した遺伝子改変マウスを用いた解析により蓄積されてきた。今後、マウス・ヒトの種間解析を行うことで、マウスで得られた知見のヒトへの外挿性の検証と、骨発生に関わる転写因子群の種間の相異性を検証する予定である。

5. 新規骨形成転写制御因子 ZEB2 の機能解析

本研究では、骨芽細胞の分化を制御する新規転写因子 ZEB2 を同定した。前述の通り ZEB2 は様々な発生過程、がん、遺伝病に関与することが知られているが、今まで ZEB2 の骨芽細胞分化や骨形成における役割は全く明らかにならなかった。従来の報告通りであれば、本研究においても ZEB2 が体節および椎板形

成時期に重要な働きを有していることが想定される⁵⁴。一方で、骨芽細胞の分化系譜は、Sox9 陽性の骨軟骨前駆細胞、続いて Runx2 陽性の骨芽細胞前駆細胞、その後 Runx2/Sp7 陽性の骨芽細胞前駆細胞を経て、Bglap 陽性の成熟骨芽細胞へと至ることが知られている⁶⁵。そして、今回の 1 細胞解析や組織学的解析において、ZEB2 の発現は成熟骨芽細胞および一部の骨芽細胞前駆細胞のみでみられた (図 9d、図 10)。したがって、ZEB2 は既知である初期発生に加えて骨芽細胞への分化過程、もしくは骨芽細胞の性質維持において機能を有している可能性があると考えられる。また、RNA velocity 解析において ZEB2 が Driver gene として検出されており、細胞の状態変化 (骨芽細胞分化) に際して ZEB2 の発現がダイナミックに変化 (増加) していることから、骨芽細胞分化の過程で機能している可能性がより高いのではないかと推測される。

これまでの報告では、ZEB2 は転写抑制因子としてはたらくことが知られていた^{66,67}。一方、本研究では骨芽細胞の分化を正に制御し、血管形成を負に制御する可能性が示されている。ZEB2 の作用機序を考えるための一例として、マウスの海馬形成において ZEB2 が Wnt シグナル経路において抑制的な機能を有する SFRP1 を負に制御することで、結果的に Wnt 活性を制御していることが報告されている⁶⁸。ロックダウンの結果でも Wnt シグナル経路に関与する因子が複数

挙げられており、骨芽細胞分化における Wnt シグナルの重要性を考慮すると、ZEB2 の同様の関与があるかもしれないと考えられる。したがって、その詳細なメカニズム解明のため、今後、クロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-seq) 解析を予定している。ZEB2 に対する ChIP-seq 解析により、ゲノムワイドな ZEB2 の DNA 結合部位を同定する。さらに、エンハンサー領域およびプレッサー領域を標識する特異的ヒストン修飾 (H3K27ac および H3K27me) に対する ChIP-seq 解析を行い、これらの統合解析によって、各標的遺伝子近傍における ZEB2 結合のクロマチン活性に対する役割を明らかにする。

また、本研究では、*in vitro* 実験系で ZEB2 の役割を検討したものの、*in vivo* における機能解析は行っていなかった。そこで、次にあげる実験を計画している。ゲノム編集法を用いた ZEB2 遺伝子欠損と、本研究で確立した骨組織誘導法を用いて、ヒト多能性幹細胞由来骨形成における ZEB2 欠損の表現型を検討する。しかしながら、前述の通り ZEB2 は発生過程で様々な機能を有していることが予想されるため、Cre-LoxP システム等を用いた骨芽細胞特異的な ZEB2 欠損が求められる。同様に遺伝子改変マウスを用いた解析を検討している。Zeb2-flox マウスに対して、骨格系細胞特異的な種々の Cre ライン (Sox9-Cre や Sp7-Cre など) を掛け合わせることで、骨格系細胞の分化段階特異的な Zeb2 欠損が可能になる。

以上の解析を通して、ZEB2の骨発生における役割とその作動様式を明らかにする予定である。

骨芽細胞分化に関与するのであれば、骨発生だけではなく、骨の恒常性維持や再生過程においても、ZEB2の機能検証の余地があると考えている。すでに使用しているレポーターマウスを用いて、骨再生過程の組織学的解析をまず行う予定である。もし骨再生過程でZEB2の十分な発現がみられるのであれば、すでにRUNX2やSP7などとの関係が示されていることから、再生においても機能している可能性も十分想定される。加えて、前述のCre-LoxPシステム等を用いた骨格系細胞特異的な*Zeb2*欠損マウスを用いることで、骨再生における表現型の差も検証できるかもしれないと考えている。このように、様々な場面におけるZEB2の機能が明らかになることで、最終的に創薬や治療介入を含めた新規骨再生法へつながることを期待している。

6. 本研究の今後の発展性・将来展望 (図 12)

臨床における治療法の開発は、概ねモデル動物や *in vitro* 実験系におけるデータの蓄積から始まり、安全性や効果の確認を経て初めて治験へ進み、改めて安全性や効果の検証が行われる。この過程には非常に多くの労力と時間を要し、動物実験でみられた有効性や安全性がヒトでは再現されないケースもある。このような実用化までのギャップを縮小可能とするために、ヒト組織の再現は以下の点で非常に有用である。種差への配慮が不要、*in vitro* と比較してより生体 (*in vivo*) に近い条件で検証が可能、均質かつ大量のサンプルを用いた網羅的なスクリーニングが可能、そして遺伝子改変技術や患者由来 iPS 細胞を用いることで病態や治療応答性の再現も可能、といった点が挙げられる。本研究で誘導したヒト骨組織は研究材料としては十分妥当であるが、マウス循環系とのキメラ組織である可能性が高い。したがって、将来的には *in vitro* で複数種のヒト細胞のみで構成される骨組織 (骨オルガノイド) の作製が望まれる。そのためにも正常な骨形成過程を詳細に解析し、*in vitro* と *in vivo* の差を埋める取り組みも必要である。今後は、病態モデルや損傷・再生モデルなど様々な観点からヒト多能性幹細胞由来骨組織を用いる予定で、基礎から臨床応用まで広い視野に基づいた基礎研究およびトランスレーショナルリサーチとなることを期待している。

図 12

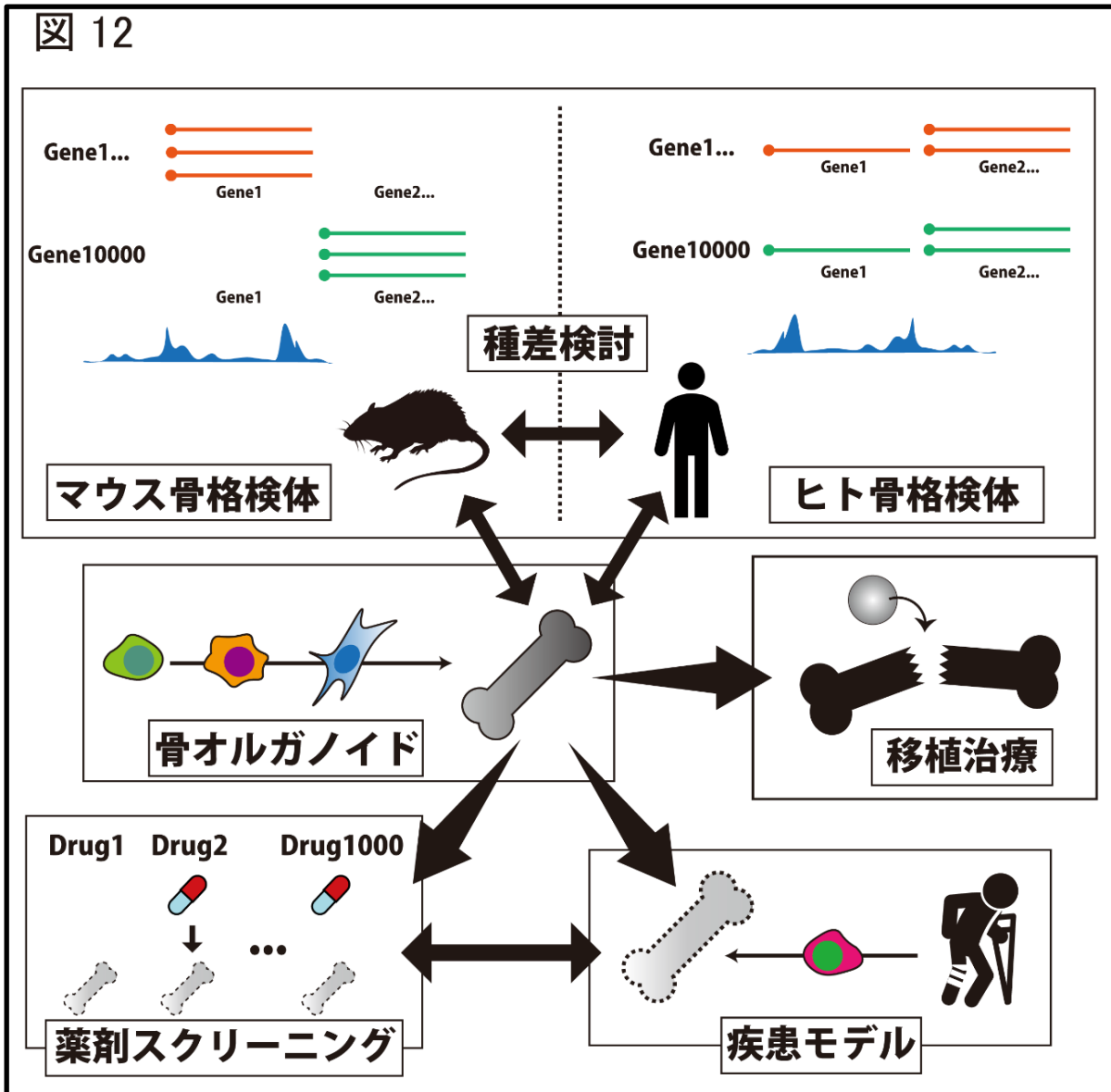


図 12：本研究の将来展望

本研究は、単に正常なヒトの骨格形成を解析するツールにとどまらず、モデル動物とヒトにおける種差解消のための移行的役割を果たすことが期待される。将来的には、マウスへの移植を伴わない完全なヒト骨組織（骨オルガノイド）の作製を目指している。本研究において作成した組織は単純に移植材として使用するだけでなく、疾患モデルへの応用も期待される。均質な組織を大量に作製できれば、臨床実験の前段階として再現組織において治療薬スクリーニングや安全性試験も可能であると考えられる。

遺伝子名	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
<i>MIXL1</i>	GGATCCAGGTATGGTTCCAG	GGGCAGGCAGTTCACATCTA
<i>T</i>	CAGTCAGTACCCACGCCTGT	ACTGGCTGTCCACGATGTCT
<i>TBX6</i>	GTGTCTTTCCATCGTGCAAGC	TATGCGGGGTTGGTACTTGTG
<i>MSGN1</i>	CGGAATTACCTGCCACCTGT	GGTCTGTGAGTTCCTCCGATG
<i>HAND1</i>	CACTCTTCCACCCTTTTGGGA	TCCTGCGTCTGGTTCTCTTT
<i>FOXF1</i>	TCTTTGTGCGAACAACCTTGC	AGCGAAGGAAGAGGAGGAAC
<i>PARAXIS</i>	GAGCTGAGGAGAGTCCCGT	TGTGCCTCTCTCTAGGTCCA
<i>PAX3</i>	CTCCACGCTCCGGATAGTTC	ATCTTGTGGCGGATGTGGTT
<i>PAX1</i>	CGCTATGGAGCAGACGTATGGCGA	AATGCGCAAGCGGATGGCGTTG
<i>PAX9</i>	TGGTTATGTTGCTGGACATGGGTG	GGAAGCCGTGACAGAATGACTACCT
<i>NKX3.2</i>	GGAGGTTAAGACGTGTCGCA	GCAGAGGGCAGAAGGTAGAC
<i>FOXC2</i>	CCTCCTGGTATCTCAACCACA	GAGGGTCGAGTTCTCAATCCC
<i>RUNX2</i>	CAGACCAGCAGCACTCCATA	CAGCGTCAACACCATCATTC
<i>SP7</i>	AAGCTGATCTGGTGGTGCAT	GACTCCACAAAGGGCATGAT
<i>IBSP</i>	TTCATTGAATGGTTTGGGTTG	AGTGTTCATAGGTAGTGCATT
<i>SPP1</i>	GAAGTTTCGCAGACCTGACAT	GTATGCACCATTCAACTCCTCG
<i>ALP</i>	CCTGCCTTACTAACTCCTTAGTGC	CGTTGGTGTGAGCTTCTGA
<i>BGLAP</i>	GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG	AGCAGAGCGACACCCTAGAC
<i>ZEB2</i>	CAAGAGGCGCAACAAGCC	GGTTGGCAATACCGTCATCC

表 2：RT-q PCR に用いたプライマーの一覧

抗体	製造会社	ID	使用濃度	抗原賦活化
Human Nuclei	Millipore	MAB1281	1:500	-
SP7	Abcam	ab22552	1:1000	-
RUNX2	Abcam	ab192256	1:1000	-
SOX9	Millipore	AB5535	1:1000	-
COL1	Abcam	ab6308	1:500	Protease
COL2	Millipore	MAB8887	1:500	Protease
COL10	Invitrogen	14-9771-82	1:500	Protease

表 3：本実験で使用した抗体一覧

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さり、4年間にわたり御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻整形外科 田中栄教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行において、その立案から実験の技術的指導にわたって終始、直接親身に御指導並びに御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻整形外科 斎藤琢准教授、疾患生命工学センター臨床医工学部門 鄭雄一教授、北條宏徳准教授、岡田寛之助教、そして長崎大学生命医科学域細胞生物学分野 大庭伸介教授に謹んで感謝申し上げます。

貴重な実験材料を供与して頂いたのみならず、貴重な御助言を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻 鈴木穰教授、関真秀特任准教授に心より感謝申し上げます。

最後に、整形外科学教室および臨床医工学部門において共に研究し、実験の技術的指導と貴重な御助言を賜りました千々松良太特任助教（現大阪大学医学系研究科特任助教）、東京歯科大学学生化学講座 小野寺晶子講師をはじめ諸先生方、研究室の皆様に深謝致します。

参考文献

1. Yamanaka, S., Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* **2020**, *27* (4), 523-531.
2. Tani, S.; Okada, H.; Chung, U.-I.; Ohba, S.; Hojo, H., The Progress of Stem Cell Technology for Skeletal Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (3), 1404.
3. Yamashita, A.; Morioka, M.; Kishi, H.; Kimura, T.; Yahara, Y.; Okada, M.; Fujita, K.; Sawai, H.; Ikegawa, S.; Tsumaki, N., Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* **2014**, *513* (7519), 507-11.
4. 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.; Ohba, S., Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers. *Regen. Ther.* **2020**, *14*, 19-31.
5. Mandai, M.; Watanabe, A.; Kurimoto, Y.; Hirami, Y.; Morinaga, C.; Daimon, T.; Fujihara, M.; Akimaru, H.; Sakai, N.; Shibata, Y.; Terada, M.; Nomiya, Y.; Tanishima, S.; Nakamura, M.; Kamao, H.; Sugita, S.; Onishi, A.; Ito, T.; Fujita, K.; Kawamata, S.; Go, M. J.; Shinohara, C.; Hata, K. I.; Sawada, M.; Yamamoto, M.; Ohta, S.; Ohara, Y.; Yoshida, K.; Kuwahara, J.; Kitano, Y.; Amano, N.; Umekage, M.; Kitaoka, F.; Tanaka, A.; Okada, C.; Takasu, N.; Ogawa, S.; Yamanaka, S.; Takahashi, M., Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376* (11), 1038-1046.
6. Uchida, H.; Machida, M.; Miura, T.; Kawasaki, T.; Okazaki, T.; Sasaki, K.; Sakamoto, S.; Ohuchi, N.; Kasahara, M.; Umezawa, A.; Akutsu, H., A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. *JCI Insight* **2017**, *2* (1), e86492.
7. Koike, H.; Iwasawa, K.; Ouchi, R.; Maezawa, M.; Kimura, M.; Kodaka, A.; Nishii, S.; Thompson, W. L.; Takebe, T., Engineering human hepatobiliary-pancreatic organoids from pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **2021**, *16* (2), 919-936.
8. Yamashita, A.; Morioka, M.; Yahara, Y.; Okada, M.; Kobayashi, T.; Kuriyama, S.; Matsuda, S.; Tsumaki, N., Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Rep.* **2015**, *4* (3), 404-18.

9. Yamashita, A.; Tamamura, Y.; Morioka, M.; Karagiannis, P.; Shima, N.; Tsumaki, N., Considerations in hiPSC-derived cartilage for articular cartilage repair. *Inflamm. Regen.* **2018**, *38* (1).
10. Tani, S.; Chung, U.-I.; Ohba, S.; Hojo, H., Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52* (8), 1166-1177.
11. Loh, M., Kyle; Ang, T., Lay; Zhang, J.; Kumar, V.; Ang, J.; Auyeong, Q., Jun; Lee, L., Kian; Choo, H., Siew; Lim, Y. Y., Christina; Nichane, M.; Tan, J.; Noghabi, S., Monireh; Azzola, L.; Ng, S., Elizabeth; Durruthy-Durruthy, J.; Sebastiano, V.; Poellinger, L.; Elefanty, G., Andrew; Stanley, G., Edouard; Chen, Q.; Prabhakar, S.; Weissman, L., Irving; Lim, B., Efficient Endoderm Induction from Human Pluripotent Stem Cells by Logically Directing Signals Controlling Lineage Bifurcations. *Cell Stem Cell* **2014**, *14* (2), 237-252.
12. Nakajima, T.; Shibata, M.; Nishio, M.; Nagata, S.; Alev, C.; Sakurai, H.; Toguchida, J.; Ikeya, M., Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells. *Development* **2018**, *145* (16).
13. Fahad Kidwai; H. Mui, B. W.; Deepika Arora; Kulsum Iqbal; Madison Hockaday; Diaz, L. Fernandez D. C.; Natasha Cherman; Daniel Martin; D. Myneni, V.; Moaz Ahmad; Katarzyna Futrega; Sania Ali; K. Merling, R.; S. Kaufman, D.; Janice Lee; G. Robey, P., Lineage-specific differentiation of osteogenic progenitors from pluripotent stem cells reveals the FGF1-RUNX2 association in neural crest-derived osteoprogenitors. *Stem Cells* **2020**.
14. Umehara, Y.; Toyama, S.; Tominaga, M.; Matsuda, H.; Takahashi, N.; Kamata, Y.; Niyonsaba, F.; Ogawa, H.; Takamori, K., Robust induction of neural crest cells to derive peripheral sensory neurons from human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1).
15. Taguchi, A.; Nishinakamura, R., Higher-Order Kidney Organogenesis from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2017**, *21* (6), 730-746 e6.
16. Mori, S.; Sakakura, E.; Tsunekawa, Y.; Hagiwara, M.; Suzuki, T.; Eiraku, M., Self-organized formation of developing appendages from murine pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 3802.
17. Sidhaye, J.; Knoblich, J. A., Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death Differ.* **2020**.
18. Perkel, J. M., Single-cell analysis enters the multiomics age. *Nature* **2021**, *595* (7868), 614-616.

19. Ranzoni, A. M.; Tangherloni, A.; Berest, I.; Riva, S. G.; Myers, B.; Strzelecka, P. M.; Xu, J.; Panada, E.; Mohorianu, I.; Zaugg, J. B.; Cvejic, A., Integrative Single-Cell RNA-Seq and ATAC-Seq Analysis of Human Developmental Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **2021**, *28* (3), 472-487.e7.
20. Xi, H.; Fujiwara, W.; Gonzalez, K.; Jan, M.; Liebscher, S.; Van Handel, B.; Schenke-Layland, K.; Pyle, A. D., In Vivo Human Somitogenesis Guides Somite Development from hPSCs. *Cell Rep.* **2017**, *18* (6), 1573-1585.
21. Loh, K. M.; Chen, A.; Koh, P. W.; Deng, T. Z.; Sinha, R.; Tsai, J. M.; Barkal, A. A.; Shen, K. Y.; Jain, R.; Morganti, R. M.; Shyh-Chang, N.; Fernhoff, N. B.; George, B. M.; Wernig, G.; Salomon, R. E. A.; Chen, Z.; Vogel, H.; Epstein, J. A.; Kundaje, A.; Talbot, W. S.; Beachy, P. A.; Ang, L. T.; Weissman, I. L., Mapping the Pairwise Choices Leading from Pluripotency to Human Bone, Heart, and Other Mesoderm Cell Types. *Cell* **2016**, *166* (2), 451-467.
22. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S., Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131* (5), 861-872.
23. Ono, M.; Hamada, Y.; Horiuchi, Y.; Matsuo-Takasaki, M.; Imoto, Y.; Satomi, K.; Arinami, T.; Hasegawa, M.; Fujioka, T.; Nakamura, Y.; Noguchi, E., Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Nasal Epithelial Cells Using a Sendai Virus Vector. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e42855.
24. Akutsu, H.; Nasu, M.; Morinaga, S.; Motoyama, T.; Homma, N.; Machida, M.; Yamazaki-Inoue, M.; Okamura, K.; Nakabayashi, K.; Takada, S.; Nakamura, N.; Kanzaki, S.; Hata, K.; Umezawa, A., In vivo maturation of human embryonic stem cell-derived teratoma over time. *Regen. Ther.* **2016**, *5*, 31-39.
25. Xiaonan Xin; Xi Jiang; Liping Wang; Louise Stover, M.; Shuning Zhan; Jianping Huang; Jon Goldberg, A.; Yongxing Liu; Liisa Kuhn; J. Reichenberger, E.; W. Rowe, D.; C. Lichtler, A., A Site-Specific Integrated Col2.3GFP Reporter Identifies Osteoblasts Within Mineralized Tissue Formed In Vivo by Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2014**, *3* (10), 1125-1137.
26. Ge, S. X.; Son, E. W.; Yao, R., iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinform.* **2018**, *19* (1).
27. Zheng, G. X. Y.; Terry, J. M.; Belgrader, P.; Ryvkin, P.; Bent, Z. W.; Wilson, R.; Ziraldo, S. B.; Wheeler, T. D.; Mcdermott, G. P.; Zhu, J.; Gregory, M. T.; Shuga, J.; Montesclaros, L.; Underwood, J. G.; Masquelier, D. A.;

- Nishimura, S. Y.; Schnall-Levin, M.; Wyatt, P. W.; Hindson, C. M.; Bharadwaj, R.; Wong, A.; Ness, K. D.; Beppu, L. W.; Deeg, H. J.; Mcfarland, C.; Loeb, K. R.; Valente, W. J.; Ericson, N. G.; Stevens, E. A.; Radich, J. P.; Mikkelsen, T. S.; Hindson, B. J.; Bielas, J. H., Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14049.
28. Hao, Y.; Hao, S.; Andersen-Nissen, E.; Mauck, W. M.; Zheng, S.; Butler, A.; Lee, M. J.; Wilk, A. J.; Darby, C.; Zager, M.; Hoffman, P.; Stoeckius, M.; Papalexi, E.; Mimitou, E. P.; Jain, J.; Srivastava, A.; Stuart, T.; Fleming, L. M.; Yeung, B.; Rogers, A. J.; Mcelrath, J. M.; Blish, C. A.; Gottardo, R.; Smibert, P.; Satija, R., Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **2021**, *184* (13), 3573-3587.e29.
29. Blondel, V. D.; Guillaume, J.-L.; Lambiotte, R.; Lefebvre, E., Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment* **2008**, *2008* (10), P10008.
30. McInnes, L.; Healy, J.; Melville, J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction 2018, p. arXiv:1802.03426. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2018arXiv180203426M> (accessed February 01, 2018).
31. Bergen, V.; Lange, M.; Peidli, S.; Wolf, F. A.; Theis, F. J., Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38* (12), 1408-1414.
32. Takada, S.; Stark, K. L.; Shea, M. J.; Vassileva, G.; McMahon, J. A.; McMahon, A. P., Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* **1994**, *8* (2), 174-89.
33. Matsuda, M.; Yamanaka, Y.; Uemura, M.; Osawa, M.; Saito, M. K.; Nagahashi, A.; Nishio, M.; Guo, L.; Ikegawa, S.; Sakurai, S.; Kihara, S.; Maurissen, T. L.; Nakamura, M.; Matsumoto, T.; Yoshitomi, H.; Ikeya, M.; Kawakami, N.; Yamamoto, T.; Woltjen, K.; Ebisuya, M.; Toguchida, J.; Alev, C., Recapitulating the human segmentation clock with pluripotent stem cells. *Nature* **2020**, *580* (7801), 124-129.
34. Cairns, D. M.; Sato, M. E.; Lee, P. G.; Lassar, A. B.; Zeng, L., A gradient of Shh establishes mutually repressing somitic cell fates induced by Nkx3.2 and Pax3. *Dev. Biol.* **2008**, *323* (2), 152-65.
35. La Manno, G.; Soldatov, R.; Zeisel, A.; Braun, E.; Hochgerner, H.; Petukhov, V.; Lidschreiber, K.; Kastrioti, M. E.; Lönnerberg, P.; Furlan, A.; Fan, J.; Borm, L. E.; Liu, Z.; Van Bruggen, D.; Guo, J.; He, X.; Barker, R.;

- Sundström, E.; Castelo-Branco, G.; Cramer, P.; Adameyko, I.; Linnarsson, S.; Kharchenko, P. V., RNA velocity of single cells. *Nature* **2018**, *560* (7719), 494-498.
36. Schmitz, N.; Lavery, S.; Kraus, V. B.; Aigner, T., Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage* **2010**, *18*, S113-S116.
37. He, J.; Yan, J.; Wang, J.; Zhao, L.; Xin, Q.; Zeng, Y.; Sun, Y.; Zhang, H.; Bai, Z.; Li, Z.; Ni, Y.; Gong, Y.; Li, Y.; He, H.; Bian, Z.; Lan, Y.; Ma, C.; Bian, L.; Zhu, H.; Liu, B.; Yue, R., Dissecting human embryonic skeletal stem cell ontogeny by single-cell transcriptomic and functional analyses. *Cell Res.* **2021**.
38. Yu, G.; Wang, L.-G.; Han, Y.; He, Q.-Y., clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: J. Integrative Biol.* **2012**, *16* (5), 284-287.
39. Wu, T.; Hu, E.; Xu, S.; Chen, M.; Guo, P.; Dai, Z.; Feng, T.; Zhou, L.; Tang, W.; Zhan, L.; Fu, X.; Liu, S.; Bo, X.; Yu, G., clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation* **2021**, *2* (3), 100141.
40. Stuart, T.; Butler, A.; Hoffman, P.; Hafemeister, C.; Papalexi, E.; Mauck, W. M.; Hao, Y.; Stoeckius, M.; Smibert, P.; Satija, R., Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **2019**, *177* (7), 1888-1902.e21.
41. Trapnell, C.; Cacchiarelli, D.; Grimsby, J.; Pokharel, P.; Li, S.; Morse, M.; Lennon, N. J.; Livak, K. J.; Mikkelsen, T. S.; Rinn, J. L., The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32* (4), 381-386.
42. Cao, J.; Spielmann, M.; Qiu, X.; Huang, X.; Ibrahim, D. M.; Hill, A. J.; Zhang, F.; Mundlos, S.; Christiansen, L.; Steemers, F. J.; Trapnell, C.; Shendure, J., The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* **2019**, *566* (7745), 496-502.
43. Akiyama, H.; Kim, J.-E.; Nakashima, K.; Balmes, G.; Iwai, N.; Deng, J. M.; Zhang, Z.; Martin, J. F.; Behringer, R. R.; Nakamura, T.; De Crombrughe, B., Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (41), 14665-14670.
44. Hojo, H.; Chung, U. I.; Ohba, S., Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration. *Regen. Ther.* **2017**, *6*, 100-107.
45. Shah, K. M.; Stern, M. M.; Stern, A. R.; Pathak, J. L.; Bravenboer, N.; Bakker, A. D., Osteocyte isolation and culture methods. *BoneKEy Rep.* **2016**, *5*, 838.

46. Satpathy, A. T.; Granja, J. M.; Yost, K. E.; Qi, Y.; Meschi, F.; McDermott, G. P.; Olsen, B. N.; Mumbach, M. R.; Pierce, S. E.; Corces, M. R.; Shah, P.; Bell, J. C.; Jhutti, D.; Nemecek, C. M.; Wang, J.; Wang, L.; Yin, Y.; Giresi, P. G.; Chang, A. L. S.; Zheng, G. X. Y.; Greenleaf, W. J.; Chang, H. Y., Massively parallel single-cell chromatin landscapes of human immune cell development and intratumoral T cell exhaustion. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37* (8), 925-936.
47. Stuart, T.; Srivastava, A.; Lareau, C.; Satija, R., Multimodal single-cell chromatin analysis with Signac. Cold Spring Harbor Laboratory: 2020.
48. Schep, A. N.; Wu, B.; Buenrostro, J. D.; Greenleaf, W. J., chromVAR: inferring transcription-factor-associated accessibility from single-cell epigenomic data. *Nat. Methods* **2017**, *14* (10), 975-978.
49. Remacle, J. E., New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: delta E1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J.* **1999**, *18* (18), 5073-5084.
50. Grabitz, A. L.; Duncan, M. K., Focus on Molecules: Smad Interacting Protein 1 (Sip1, ZEB2, ZFH1B). *Exp. Eye Res.* **2012**, *101*, 105-106.
51. Fardi, M.; Alivand, M.; Baradaran, B.; Farshdousti Hagh, M.; Solali, S., The crucial role of ZEB2: From development to epithelial - to - mesenchymal transition and cancer complexity. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (9), 14783-14799.
52. Nishizaki, Y.; Takagi, T.; Matsui, F.; Higashi, Y., SIP1 expression patterns in brain investigated by generating a SIP1-EGFP reporter knock-in mouse. *Genesis* **2014**, *52* (1), 56-67.
53. Mowat, D. R.; Croaker, G. D.; Cass, D. T.; Kerr, B. A.; Chaitow, J.; Ades, L. C.; Chia, N. L.; Wilson, M. J., Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J. Med. Genet.* **1998**, *35* (8), 617-623.
54. Maruhashi, M.; Van De Putte, T.; Huylebroeck, D.; Kondoh, H.; Higashi, Y., Involvement of SIP1 in positioning of somite boundaries in the mouse embryo. *Dev. Dyn.* **2005**, *234* (2), 332-338.
55. Higashi, Y.; Maruhashi, M.; Nelles, L.; Van De Putte, T.; Verschueren, K.; Miyoshi, T.; Yoshimoto, A.; Kondoh, H.; Huylebroeck, D., Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* **2002**, *32* (2), 82-84.

56. Hojo, H.; Ohba, S.; He, X.; Lai, P.; Lick; McMahon, P., Andrew, Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. *Dev. Cell* **2016**, *37* (3), 238-253.
57. Nosaka, T., STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* **1999**, *18* (17), 4754-4765.
58. Chan, C. K. F.; Gulati, G. S.; Sinha, R.; Tompkins, J. V.; Lopez, M.; Carter, A. C.; Ransom, R. C.; Reinisch, A.; Wearda, T.; Murphy, M.; Brewer, R. E.; Koepke, L. S.; Marecic, O.; Manjunath, A.; Seo, E. Y.; Leavitt, T.; Lu, W. J.; Nguyen, A.; Conley, S. D.; Salhotra, A.; Ambrosi, T. H.; Borrelli, M. R.; Siebel, T.; Chan, K.; Schallmoser, K.; Seita, J.; Sahoo, D.; Goodnough, H.; Bishop, J.; Gardner, M.; Majeti, R.; Wan, D. C.; Goodman, S.; Weissman, I. L.; Chang, H. Y.; Longaker, M. T., Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell* **2018**, *175* (1), 43-56 e21.
59. Hirao, M.; Tamai, N.; Tsumaki, N.; Yoshikawa, H.; Myoui, A., Oxygen Tension Regulates Chondrocyte Differentiation and Function during Endochondral Ossification. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (41), 31079-31092.
60. Pattappa, G.; Johnstone, B.; Zellner, J.; Docheva, D.; Angele, P., The Importance of Physioxia in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis and the Mechanisms Controlling Its Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (3), 484.
61. Bannier-Hélaouët, M.; Post, Y.; Korving, J.; Trani Bustos, M.; Gehart, H.; Begthel, H.; Bar-Ephraim, Y. E.; Van Der Vaart, J.; Kalmann, R.; Imhoff, S. M.; Clevers, H., Exploring the human lacrimal gland using organoids and single-cell sequencing. *Cell Stem Cell* **2021**, *28* (7), 1221-1232.e7.
62. Wu, C.-L.; Dicks, A.; Steward, N.; Tang, R.; Katz, D. B.; Choi, Y.-R.; Guilak, F., Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1).
63. Ambrosi, T. H.; Marecic, O.; Mcardle, A.; Sinha, R.; Gulati, G. S.; Tong, X.; Wang, Y.; Steininger, H. M.; Hoover, M. Y.; Koepke, L. S.; Murphy, M. P.; Sokol, J.; Seo, E. Y.; Tevlin, R.; Lopez, M.; Brewer, R. E.; Mascharak, S.; Lu, L.; Ajanaku, O.; Conley, S. D.; Seita, J.; Morri, M.; Neff, N. F.; Sahoo, D.; Yang, F.; Weissman, I. L.; Longaker, M. T.; Chan, C. K. F., Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature* **2021**.
64. Omatsu, Y.; Sugiyama, T.; Kohara, H.; Kondoh, G.; Fujii, N.; Kohno, K.; Nagasawa, T., The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity* **2010**, *33* (3), 387-399.

65. Rutkovskiy, A.; Stensløyken, K.-O.; Vaage, I. J., Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research* **2016**, *22*, 95-106.
66. Vandewalle, C.; Comijn, J.; De Craene, B.; Vermassen, P.; Bruyneel, E.; Andersen, H.; Tulchinsky, E.; Van Roy, F.; Berx, G., SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (20), 6566-6578.
67. Verschueren, K.; Remacle, J. E.; Collart, C.; Kraft, H.; Baker, B. S.; Tylzanowski, P.; Nelles, L.; Wuytens, G.; Su, M.-T.; Bodmer, R.; Smith, J. C.; Huylebroeck, D., SIP1, a Novel Zinc Finger/Homeodomain Repressor, Interacts with Smad Proteins and Binds to 5' -CACCT Sequences in Candidate Target Genes. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (29), 20489-20498.
68. Miquelajauregui, A.; Van De Putte, T.; Polyakov, A.; Nityanandam, A.; Boppana, S.; Seuntjens, E.; Karabinos, A.; Higashi, Y.; Huylebroeck, D.; Tarabykin, V., Smad-interacting protein-1 (Zfhx1b) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (31), 12919-12924.