

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 谷 彰一郎

高齢人口の増加に伴い、既存の医療技術で対処困難な **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が、既存の研究手法にはいくつか課題が存在する。例えば、モデル動物とヒトの種差や 2 次元培養と 3 次元組織の差が挙げられる。動物実験で得られた結果が、ヒトにおいて必ずしも再現されないという問題は、治療法開発における大きな障壁である。また、2 次元で培養された細胞の挙動や性質が、生理的な組織内と同等とは必ずしも言えない点も課題である。加えて、ヒトの組織を利用した研究は、倫理的な制約のため、容易でない場合も多い。一方で、人工多能性幹細胞 (**induced pluripotent stem cell: iPS 細胞**) の登場により、倫理的制約の克服だけでなく、様々な細胞種への分化誘導やそ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未だ困難である。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞を用いて骨発生過程を再現する骨組織の作製を目指した。そして、ヒトの骨発生過程の機序解明を通じて、骨組織研究における基盤技術を確立し、新規骨再生法確立に向けた足掛かりとすることを目標とした。

まず本研究では、体幹骨の起源である沿軸中胚葉由来の椎板細胞を、ヒト多能性幹細胞から分化誘導する方法の確立を試みた。従来法において課題であった、手法の煩雑さや異種成分および組換えタンパク質の汎用を解決し、異なる細胞株でも高い再現性を有する分化誘導法の確立を目指した。初めに、文献に基づいて、分化誘導に重要なシグナルを選別し、それらの活性を調整する低分子化合物の組み合わせを、分化段階ごとに比較・最適化した。分化段階特異的な発現遺伝子を指標に、**RT-qPCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)** で評価を行った。最終的に、最適化した分化誘導法は、異なる 3 種の **iPS 細胞** および 2 種の胚性幹細胞 (**embryonic stem cell: ES 細胞**) で高い再現性がみられた。また、**RNA sequencing (RNA-seq)** 解析による網羅的な遺伝子発現解析を行い、分化段階特異的な発現遺伝子の推移を確認した。さらに、誘導した椎板細胞の妥当性や多様性を検証する目的で、1 細胞 **RNA-seq** 解析を行った。その結果、誘導した細胞集団は、目的とする骨格系細胞種への分化指向性を有する細胞集団に加えて、血管平滑筋への分化指向性を有する細胞集団が確認された。また、**RNA velocity** 解析においても、両者への分化系譜が確認された。椎板の一部は血管形成に寄与することが知られており、*in vitro* 分化誘導系において、部分的に椎板細胞の多様性が再現されているのではないかと推察された。

続いて、誘導した細胞を免疫不全マウス腎被膜下へ移植し、骨組織を誘導した。移植後の 2 週毎に **micro-CT** で観察し、石灰化組織が時系列で成長することを確認した。移植後 8 週

および 18 週目の組織を用いた組織学的解析の結果、8 週時点では軟骨優位であったが、18 週目には骨髄構造を含む内軟骨性骨化による骨組織像が観察された。未分化な細胞を移植した場合に生じる奇形腫の形成は見られなかった。免疫化学染色の結果、得られた骨組織は、骨軟骨に特異的なマーカーをそれぞれ発現しており、血球系を除く骨格系細胞がヒト核抗原陽性であることを確認した。以上から、移植した細胞が、マウス生体内において内軟骨性骨化を再現し、ヒト骨組織を形成したことが示唆された。

得られた骨組織の妥当性を遺伝子発現レベルでさらに詳細に検証することを目的に、1 細胞 RNA-seq 解析を行った。内軟骨性骨化初期 (7 週) および後期 (19 週) の組織を用いて解析を行った。得られたデータセットは、遺伝子発現プロファイルから、ヒトの骨格系細胞およびマウスの血管・血球系細胞から構成されており、キメラ組織であることが示唆された。ヒトの骨格系細胞には、細胞種特異的な遺伝子発現パターンを有する骨芽細胞、軟骨細胞および肥大軟骨細胞、そして前駆細胞群が確認された。そこで、得られたデータセットの外挿性を検証するため、公共データベースより取得したヒト胎児長管骨 (8 週) データセットと統合解析を行った。その結果、胎児期の骨格前駆細胞を含む、様々な骨格系細胞種を両者で共有していることが明らかになった。加えて、Pseudotime 解析により、骨格前駆細胞から骨芽細胞および軟骨細胞への分化系譜が描出された。以上より、得られた骨組織が内軟骨性骨化を再現していることが、1 細胞レベルの遺伝子発現プロファイルから確認された。

ヒトの骨発生における遺伝子発現制御機構を明らかにすべく、1 細胞多層解析 (遺伝子発現およびオープンクロマチン領域) を行った。分化系譜におけるオープンクロマチン領域の変化を検討したところ、細胞種特異的なマーカー遺伝子である *COL1A1* や *COL10A1* の遺伝子領域近傍では、遺伝子発現と相関するクロマチンアクセシビリティの上昇が確認された。さらに、得られた遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティのプロファイルから、まず、骨芽細胞に焦点を絞り、その特異的なオープンクロマチン領域を抽出した。Gene Ontology 解析を行い、得られたオープンクロマチン領域の近傍には、骨形成や骨系統疾患に関連する遺伝子群と高い相関があることを確認した。そこで、骨芽細胞の運命決定に関与する新規転写因子の同定を試みた。骨芽細胞集団に特異的な発現遺伝子 (Differentially expressed gene) を抽出し、RNA velocity 解析において骨芽細胞への分化 (状態変化) に寄与すると推定される遺伝子 (Driver gene) との重複を確認した。重複する 20 の転写因子の中で、骨芽細胞特異的なオープンクロマチン領域に関与する 13 の転写因子を抽出した。これらの中には、*RUNX2* や *DLX5* のような既知の因子が含まれることを確認した。さらに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。

新たに同定した *ZEB2* は、*ZEB1* と Zinc Finger E-Box Binding Homeobox (*ZEB*) ファミリーを形成する。上皮間葉移行に関連した重要な因子としてよく知られ、がん領域や筋肉・神経の発達においてよく研究されている。また、モワット・ウイルソン症候群の原因遺伝子としても知られ、頭部における骨格異常について報告はあるものの、ほかの骨格についてはよく知られていない。加えて、*ZEB2* の null 欠失は胎生致死であり、骨格特異的な欠

失における表現型の報告がないため、ZEB2の骨形成への寄与は未だ不明である。そのため本研究では、*in vitro*および*in vivo*実験系において、ZEB2の機能解析を行った。まず、ヒト多能性幹細胞由来骨組織における発現パターンを*in situ hybridization*法を用いて検証し、1細胞解析の結果に矛盾しないこと、およびRUNX2やSP7との共発現を確認した。また、Zeb2-EGFPノックインマウスの骨組織に対して免疫化学染色を用いて、骨組織における特異的な発現パターン、およびSP7との共発現を確認した。以上より、ZEB2がRUNX2やSP7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構築に寄与している可能性が示唆された。次に、ヒト間葉系幹細胞においてshort hairpin RNAを用いたノックダウン法を行った。ZEB2ノックダウンによる遺伝子発現変動をRNA-seq解析で網羅的に検討したところ、ZEB2ノックダウン群では、RUNX2やSP7を含む骨芽細胞分化関連遺伝子群の発現低下および血管形成関連遺伝子群の発現上昇が示された。したがって、ZEB2が、RUNX2やSP7を含む骨分化関連因子の発現制御を介して、骨芽細胞分化を正に制御している可能性が示唆された。

以上のように、ヒト多能性幹細胞から椎板細胞への*in vitro*分化誘導法の確立、マウスへの移植による*in vivo*骨組織誘導に加えて、1細胞解析を中心とした詳細な検討により、系の妥当性だけでなく、ヒトの骨発生過程における転写制御ネットワークを明らかにした。さらにこのネットワーク形成の一端を担う新規転写因子としてZEB2を同定した。本研究で確立した遺伝子発現・クロマチンアクセシビリティのプロファイルは、ヒトの骨発生における骨格系細胞の運命決定などの転写制御ネットワークの全貌解明に寄与するものである。