

審査の結果の要旨

氏名 谷 彰一郎

本研究はヒト骨発生過程における詳細な分子機序を明らかにするため、ヒト多能性幹細胞を用いてヒト骨発生を模倣する骨組織誘導系を確立し、クロマチンアクセシビリティおよび遺伝子発現を統合した1細胞多層解析を用いて転写制御ネットワークの解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト多能性幹細胞を用いて体幹骨の起源として知られる椎板細胞への分化誘導の最適化を行い、異種成分やタンパク質製剤を用いない新たな誘導法を確立した。分化誘導の評価にはRNA-seq (sequencing)解析による網羅的な遺伝子発現解析を行い、椎板へと至る各分化段階に特異的な発現遺伝子の推移が示された。さらに1細胞RNA-seq解析を用い、目的とする骨格系細胞集団への分化を評価する一方で、異なる血管系への分化指向性を有するもう一つの細胞集団の存在が示された。椎板は複数の分化指向性を有する細胞集団であることが知られており、*in vitro*分化誘導系においてもその多様性が部分的に再現されている可能性が示された。
2. ヒト多能性幹細胞より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、骨組織が形成されることが μ CTおよび組織学的解析によって示された。移植後8週および18週目の組織学的解析から、得られた組織が内軟骨性骨化過程を模倣した組織像を呈することが示された。さらに、免疫組織学的染色によって血球系を除く骨格系細胞がヒト細胞由来であることも示された。以上から、移植した細胞が、内軟骨性骨化を再現する骨組織を形成したことが示された。
3. 得られた骨組織に対して1細胞RNA-seq解析を用い、ヒトの各種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いることが示された。また、公共データベースより取得したヒト胎児長管骨(8週)データセットとの統合解析から、誘導した骨組織が胎児期の骨組織との類似する細胞集団および分化系譜を有していることが示された。
4. 得られた骨組織に対して1細胞多層解析を用い、遺伝子発現に加えてオープンクロマチン領域の検証が行われた。骨格系細胞の分化系譜に沿ったオープンクロマチン領域とそれに関連する遺伝子発現のダイナミックな変動が示された。また、骨芽細胞特異的な遺伝子発現、RNA velocity、およびクロマチンアクセシビリティを用いた統合解析の結果から、骨形成を制御する転写因子候補が同定された。既知の因子を除いた結果、最終的にZEB2が新規転写因子候補として同定された。
5. 新たに同定されたZEB2は、先天性疾患の原因遺伝子としても知られる因子であったが、骨関連領域においてはその機能は明らかでなかったため、その機能解析が行われた。

誘導骨組織中における *ZEB2* の発現パターンが 1 細胞解析の結果と合致し、部分的に骨芽細胞マスター転写因子である *RUNX2* や *SP7* と共発現することが *in situ hybridization* 法を用いて示された。また、ヒト間葉系幹細胞に対する *ZEB2* のノックダウンによって、*RUNX2* や *SP7* を含む複数の骨芽細胞分化関連遺伝子群の発現が低下することが RNA-seq 解析によって示された。上記結果から、新規に同定した *ZEB2* が、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された。

以上、本論文はヒト多能性幹細胞から椎板細胞への *in vitro* 分化誘導に加え、マウスへの移植による *in vivo* 骨組織誘導まで含む系の確立に加え、1 細胞解析を用いてヒトの骨発生過程における転写制御ネットワークの一端を明らかにし、骨分化を制御する新規転写因子を同定した。本研究によって確立された骨組織誘導法やそこから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や知見は、ヒトの骨発生における転写制御ネットワーク等の分子機序解明だけでなく、新たな治療標的の検索にも重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。