23.　骨格形成における細胞運命決定機構の解明

大阪大学大学院歯学研究科組織・発生生物学講座　教授　　大庭　伸介

概要

我々の骨格組織は膜内骨化と軟骨内骨化という二つの異なる骨化様式によって形成される。いずれの骨化様式も Sox9 陽性の骨格形成性間葉細胞の凝集から始まるが、「凝集間葉がいかにして膜内骨化あるいは軟骨内骨化を選択するか？」という根本的な問いの答えは不明なままである。そこで本研究は、骨格形成性間葉細胞における膜内骨化と軟骨内骨化への運命決定機構の包括的理解を目的とした。

目的を達成するため、現在までにマウス発生過程における細胞系譜解析から骨格形成性間葉細胞の同定を試み、骨格形成性間葉細胞に対する空間トランスクリプトーム解析に着手した。その結果、マウス胎生 11.5 日で標識された *Sox9* 発現細胞系譜は、胎生 12.5 日の膜内骨化と軟骨内骨化における骨格形成性間葉細胞であることが確認され、本研究が解析対象とする細胞集団であると考えられた。空間トランスクリプトーム解析としては PIC（photo-isolation chemistry）法を採用した。基礎検討がすでに終了し、マウス肢芽および頭部における *Sox9* 発現細胞系譜を用いた解析の準備を進めている。

今後はシングルセルマルチオーム解析に進み、空間トランスクリプトームデータとの統合的解析を行う予定である。さらに、代表研究者らが独自に開発したヒト多能性幹細胞の骨格発生再現系においても同様の解析を行うことで、ヒト骨格発生においても、骨格形成性間葉の膜内骨化と軟骨内骨化への運命決定機構の理解を目指す。

現所属に着任して間もないことから、研究環境の整備が急務であった。本助成によって研究用試薬や消耗品の拡充のみならず、研究員を雇用できたことから、上記実験系の速やかな立ち上げと遂行が可能となった。

背景および目的

骨格組織は部位によって発生学的な由来が異なる。大まかに、頭頸部骨格は神経堤、体幹の骨格（軸骨格）は沿軸中胚葉、四肢の骨格は側板中胚葉に由来する（図 1）。また、膜内骨化および軟骨内骨化という二つの骨化様式が存在する。神経堤由来の骨格の多くは膜内骨化、中胚葉由来の骨格は主に軟骨内骨化によって形成される（図 1）。膜内骨化、軟骨内骨化ともに、Sox9 陽性の骨格形成性間葉細胞の凝集から始まる（図 2）。膜内骨化では、間葉系細胞から骨芽細胞前駆細胞への運命決定がなされ、骨形成が進行する。一方、軟骨内骨化では、まず軟骨形成が起こり、軟骨が徐々に骨に置換される。

1950 年代に 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、発現した遺伝子の作用の連鎖によって細胞系譜の分岐が生み出され、個体発生における細胞運命が決定することを視覚的に説明するモデルである（文献 1）。さらに、1969 年には Roy J. Britten と Eric H. Davidson が細胞分化における「遺伝子発現を制御するネットワーク」の存在を提唱した（文献 2）。近年の次世代シークエンサー（next-generation sequencer: NGS）による解析は一連の概念をほぼ実証しているが、一方で細胞運命決定プロセスの可塑性も示唆している。代表研究者および協同研究者も NGS を用いたエピゲノム・トランスクリプトーム解析を通じて、骨格発生のマスター転写因子（Sox9, Runx2, Sp7）の作動様式や活性型エンハンサーのクラスター（スーパーエンハンサー）の意義、さらには遺伝子制御ネットワークを明らかにしてきた（文献 3-8）。

このように、骨芽細胞と軟骨細胞への分化に関わる遺伝子発現制御機構については知見が集積している。しかしながら、「凝集間葉がいかにして膜内骨化あるいは軟骨内骨化を選択するか？」という根本的な問いの答えは不明なままである（図 2)。そこで本研究は、骨格形成性間葉における膜内骨化と軟骨内骨化への運命決定機構の包括的理解を目的とした。マウス発生過程とヒト多能性幹細胞の骨格発生再現系において、NGS を用いたトランスクリプトーム解析・エピゲノム解析から得られる知見を統合し、エピジェネティックランドスケープ・遺伝子発現制御ネットワークの観点から上記の運命決定機構を明らかにすることを目指して行われた。

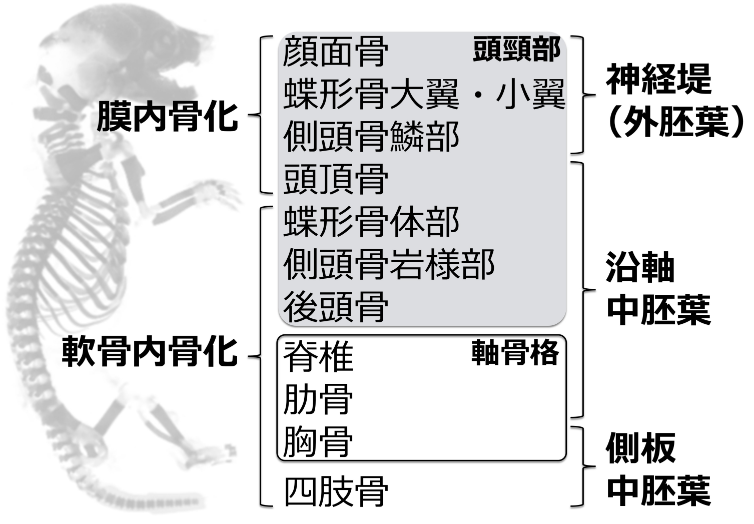

図 1. 骨の由来と骨化様式.

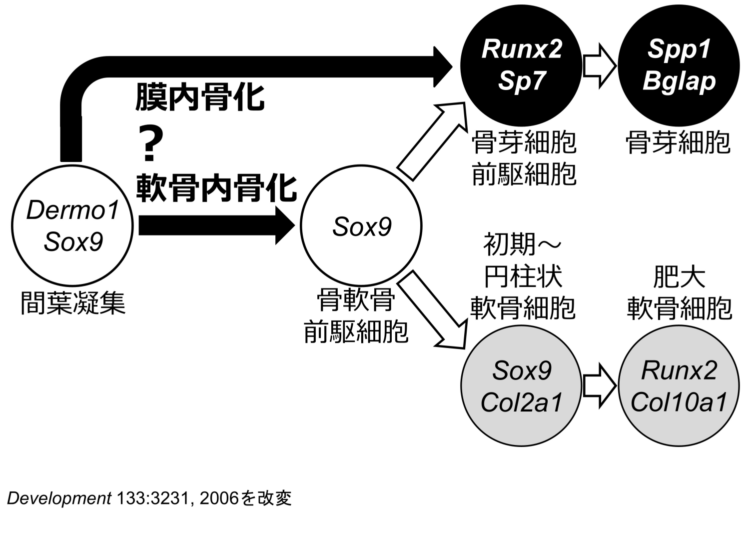

図 2. 骨格系細胞の分化モデル.

これまでの成果

1. マウス骨格形成性間葉細胞の同定

軟骨内骨化および膜内骨化における骨格形成性間葉細胞の解析を行うため、まずマウス発生過程における骨格形成性間葉細胞の標識を試みた。マウス骨格発生過程初期に凝集する間葉細胞は骨化様式に関わらず *Dermo1* あるいは *Sox9* を発現する（文献 9, 10）。そこで、Dermo1-Cre あるいは Sox9-CreERT2 制御下に ZsGreen あるいは lacZ を発現するレポーターマウスを作出し、肢芽（軟骨内骨化）および頭部（膜内骨化）におけるレポーター発現細胞の解析を行った。*Dermo1-Cre;R26-lacZ* マウスにおける X-gal 染色から、胎生 10.5～12.5 日胎仔の肢芽において *Dermo1* 発現細胞の凝集を認めたが、骨形成予定領域以外にも *Dermo1* 発現細胞が存在していた。次に、タモキシフェン（TM）投与により時期特異的に *Sox9* 陽性細胞を蛍光標識できる *Sox9-CreERT2;R26-ZsGreen* マウスの解析に取り組んだ。胎生 9.5～12.5 日にかけて、異なる TM 投与時期と採材時期について合計 8 パターンを検討した。その結果、胎生 11.5 日に TM 投与を行って胎生 12.5 日に採材したサンプル（E11.5TM→E12.5 採材）の肢芽および頭部において、骨形成予定領域への *Sox9* 発現細胞系譜の凝集を認めた。さらに、胎生 11.5 日に TM 投与後、生後 0 日で回収した長管骨および頭蓋骨においては *Sox9* 発現細胞系譜が骨組織全体に存在していた。以上より、*Sox9-CreERT2;R26-ZsGreen* マウスにおいて E11.5TM→E12.5 採材で認めた *Sox9* 発現細胞系譜は、肢芽（軟骨内骨化）と頭部（膜内骨化）いずれにおいても凝集した骨格形成性間葉細胞であり、本研究が解析対象とする細胞集団であると考えられた。

続いて、上記の *Sox9* 発現細胞系譜に対するシングルセル解析を視野に入れ、肢芽および頭部から骨格形成性間葉細胞を採取する基礎検討を行った。その結果、E11.5TM→E12.5 採材の *Sox9-CreERT2;R26-ZsGreen* マウスの肢芽および頭部より約 30%の ZsGreen 陽性細胞を回収できる条件を見出した。

2. マウス骨格形成性間葉細胞に対する空間トランスクリプトーム解析

Sox9 発現細胞系譜に対するシングルセル解析に先立ち、空間トランスクリプトーム解析に着手した。本研究においては、高解像度かつ高い検出感度で組織切片上の関心領域のトランスクリプトーム解析が可能とされる PIC（photo-isolation chemistry）法（文献 11）を採用した。これまでに、熊本大学生命資源研究支援センター・沖真弥教授のご支援のもと、PIC 法により *Sox9-CreERT2;R26-ZsGreen* マウス肢芽および頭部の組織切片から RNA-seq ライブラリーを構築するための基礎検討が終了している。現在、E11.5TM→E12.5 採材の *Sox9-CreERT2;R26-ZsGreen* マウス肢芽および頭部における Sox9 発現細胞系譜（骨格形成性間葉細胞）を用いた解析に向けて準備を進めている。

今後の展望および課題

現在までに、マウス骨格発生過程における骨格形成性間葉細胞の同定と、軟骨内骨化と膜内骨化における空間トランスクリプトーム解析の基礎検討が終了し、本実験に向けた準備を進めている。今後はさらに、シングルセルマルチオーム解析（RNA-seq による遺伝子発現プロファイリングと ATAC-seq によるクロマチンプロファイリング）に進み、空間トランスクリプトームデータとの統合的解析により本研究目的の達成を目指す。さらに、代表研究者らが独自に開発したヒト多能性幹細胞の骨格発生再現系（文献 3）においても同様の解析を行うことで、ヒト骨格発生においても、骨格形成性間葉の膜内骨化と軟骨内骨化への運命決定機構の理解を目指す。

本研究によって、骨格形成性間葉が骨芽細胞あるいは軟骨細胞へ分化する際の運命決定因子が明らかになると期待される。これらは、骨粗鬆症や変形性関節症といった骨格系変性疾患に対する病態修飾療法や組織再生療法の分子標的候補となる。さらに、細胞運命決定を切り口にした病態理解や個別化医療に貢献するものと思われる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、PIC 法についてご支援いただきました熊本大学生命資源研究・支援センターの沖真弥教授、および協同研究者の大阪大学大学院歯学研究科の阿部真土講師、東京大学大学院医学系研究科の北條宏徳准教授に心より感謝申し上げます。最後に、本研究をご支援いただきました三菱財団に深謝いたします。

（完）

発表論文

1） Hojo H, Tani S, Ohba S: Modeling of skeletal development and diseases using human pluripotent stem cells. ***J Bone Miner Res*** 40(1):5-19, 2024 (10.1093/jbmr/zjae178)

2） Eldeep D, Okada H, Suzuki Y, Seki M, Tanaka J, Mishima K, Chung UI, Ohba S, Hojo H: Exploring the role of DNMT1 in dental papilla cell fate specification during mouse tooth germ development through integrated single-cell transcriptomics and bulk RNA sequencing. ***J Oral Biosci*** 66(3):530-538, 2024 (10.1016/j.job.2024.06.010)

3） Saeki N, Inui-Yamamoto C, Ikeda Y, Kanai R, Hata K, Itoh S, Inubushi T, Akiyama S, Ohba S, Abe M: Deletion of Trps1 regulatory elements recapitulates postnatal hip joint abnormalities and growth retardation of Trichorhinophalangeal syndrome in mice. ***Hum Mol Genet*** 33(18):1618-1629, 2024 (10.1093/hmg/ddae102)

引用文献

1） Waddington CH: The strategy of the genes. George Allen & Unwin, 1957

2） Britten RJ, Davidson EH: Gene regulation for higher cells: a theory. ***Science*** 165(3891):349-357, 1969 (doi: 10.1126/science.165.3891.349)

3） Tani S, Okada H, Onodera S, Chijimatsu R, Seki M, Suzuki Y, Xin X, Rowe DW, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Ohba S, Hojo H: Stem-cell-based modeling and single-cell multiomics reveal gene regulatory mechanisms underlying human skeletal development. ***Cell Rep*** 42(4):112276, 2023 (doi: 10.1016/j.celrep.2023.112276)

4） Hojo H, Saito T, He X, Guo Q, Onodera S, Azuma T, Koebis M, Nakao K, Aiba A, Seki M, Suzuki Y, Okada H, Tanaka S, Chung UI, McMahon AP, Ohba S: Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. ***Cell Rep*** 40(10):111315, 2022 (doi: 10.1016/j.celrep.2022.111315)

5） Hojo H, McMahon AP, Ohba S: An emerging regulatory landscape for skeletal development. ***Trends Genet*** 32(12):774-787, 2016 (doi: 10.1016/j.tig.2016.10.001)

6） He X, Ohba S (co-first), Hojo H, McMahon AP: AP-1 family members act with Sox9 to promote chondrocyte hypertrophy. ***Development*** 143(16):3012-3023, 2016 (doi: 10.1242/dev.134502)

7） 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*** 37(3):238-253, 2016 (doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.002)

8） Ohba S, He X, Hojo H, McMahon AP: Distinct transcriptional programs underlie Sox9 regulation of the mammalian chondrocyte. ***Cell Rep*** 12(2):229-243, 2015 (doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.013)

9） Li L, Cserjesi P, Olson EN: Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. ***Dev Biol*** 172(1):280-292, 1995 (doi: 10.1006/dbio.1995.0023)

10）Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, de Crombrugghe B: Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 102(41):14665-14670, 2005 (doi: 10.1073/pnas.0504750102)

11）Honda M, Oki S, Kimura R, Harada A, Maehara K, Tanaka K, Meno C, Ohkawa Y: High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. Nat Commun 12(1):4416, 2021 (doi: 10.1038/s41467-021-24691-8)