

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04403

研究課題名(和文) 部位特異的エピゲノム編集による骨再生法に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Fundamental study of bone regeneration with site-specific epigenome editing

研究代表者

大庭 伸介 (Ohba, Shinsuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：20466733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞から骨芽細胞、骨格系細胞を誘導する手法を開発し、ヒト多能性幹細胞由来の軟骨内骨化様組織において、遺伝子発現プロファイリングおよびオープンクロマチンプロファイリングを行うことで、骨芽細胞を含む各骨格系細胞集団に特徴的な遺伝子発現とオープンクロマチン領域が明らかとなった。一連のデータはヒト骨格発生過程におけるエピゲノム動態、さらには骨芽細胞形成を司るエンハンサー領域を提示するものと考えられる。引き続き、種間での保存性なども考慮した統合的な解析を行うことで、部位特異的エピゲノム編集による骨再生法の治療標的となるエンハンサー領域の同定につながるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「部位特異的エピゲノム編集による骨再生」という新しいアプローチに向けた基礎的知見の集積を目指したものである。マウス初代細胞における解析に加え、ヒト多能性幹細胞の骨芽細胞分化系を用いた解析を併用することで、ヒトの骨芽細胞分化におけるエピゲノム動態を、その遺伝子発現動態との関連も含めて明らかにした。取得されたエピゲノムデータは骨芽細胞分化を司るエンハンサー領域に関する情報を含んでいる。したがって、これらの領域は「部位特異的エピゲノム編集による骨再生」のための標的となりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first developed methods for generating skeletal cells, including osteoblasts, from human pluripotent stem cells (hPSCs). Gene expression profiling and open chromatin profiling in hPSC-derived endochondral bone tissues further identified cell-type-distinct gene expression profiles and open chromatin regions. Our datasets provide not only epigenome dynamics, but also enhancer regions that govern osteoblast differentiation during human skeletal development. Integrative analyses of the datasets, including cross-species analysis for conservation of target regions, will lead to identification of target enhancer regions for epigenome editing-mediated bone regeneration.

研究分野：骨軟骨生物学、幹細胞生物学

キーワード：再生医学 骨 エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞運命の決定と細胞の分化・成熟によって器官形成は進行する。遺伝子の転写が一連の過程の根幹にあるといっても過言ではなく、遺伝子の発現時期と量が厳密に制御されることで細胞の活動・性質が決められる。研究代表者らは、骨格発生過程における細胞運命決定・分化・成熟のメカニズムを遺伝子転写機構の観点から理解し、骨再生へ応用することを目指して研究を進めてきた。特に、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-seq) と RNA シーケンス法 (RNA-seq) を駆使して、マウス胚性幹細胞の多能性維持機構[1]や骨格形成の中期から後期におけるマスター転写因子群 (Sp7, Sox9, AP-1) の作動様式を明らかにした[2-8]。一連の知見により、骨格発生過程における遺伝子転写機構が明らかにされつつある。

DNA は通常、クロマチン構造をとって核内で凝縮・収納されているため、転写因子が結合しづらい状態にあり、転写抵抗性を有する。ヒストンのメチル化・アセチル化に伴うクロマチン構造の変化により、転写因子の DNA へのアクセシビリティが部位特異的に付与されることで転写は開始される。このように、DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構をエピジェネティクス、その情報の集まりをエピゲノムと呼ぶ。つまり、エピゲノムが遺伝子発現のメインスイッチであり、塩基配列依存性にゲノムへ結合する転写因子は、発現量を調節するポリユームとして働くと考えられる。エピゲノムが遺伝子発現のメインスイッチであるならば、細胞運命決定に関わる遺伝子の発現制御領域 (エンハンサー) のエピゲノムを特異的に調節・編集することで、エンハンサー活性をコントロールし、分化のメインスイッチをオンにできると考えられる。これにより一連の分化カスケードを開始させられれば、母細胞の分化段階や由来に依存しない組織再生法、さらには体細胞のダイレクトリプログラミングの効率化につながる可能性がある。

古くからエピゲノム操作に使用されてきた DNA メチル基転移酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は部位選択性を持たない。しかし、CRISPR-Cas9 システムを利用した部位選択的なエピゲノム編集法が報告された[9]。本法は、ヌクレアーゼ活性を除去した Cas9 とヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) 活性や脱メチル化酵素活性を有する蛋白質断片の融合蛋白質を、目的とするエンハンサー部位に相補的なガイド RNA と共に細胞内に導入することで、その部位のアセチル化や脱メチル化を誘導し、標的遺伝子の転写活性化を達成する。本法は、前述のエピゲノム編集による分化誘導を達成する強力なツールとなりうると考えられた。しかし、骨再生を考えたとき、骨芽細胞分化過程におけるエピゲノム動態は完全には解明されておらず、治療標的となるエンハンサー領域とそのヒストン修飾の候補はまだ明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究は、「部位特異的エピゲノム編集による骨再生法」を開発するための基盤的知見の集積を目的に、多能性幹細胞の骨格系細胞分化システムおよびマウスから分取した初代骨格系細胞における遺伝子発現プロファイリング、オープンクロマチン領域プロファイリングに基づいて、骨芽細胞分化過程におけるエピゲノム動態・遺伝子発現制御機構の理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト多能性幹細胞の高効率骨芽細胞分化系の最適化

研究代表者らの知見に基づいて[1, 10, 11]、低分子化合物のみを用いた defined な条件 (無血清) で、中胚葉分化を経由して多能性幹細胞から骨芽細胞を形成する手法をすでに開発していた[12]。そこで、ヒト骨芽細胞分化過程におけるエピゲノム解析のために、本分化系のさらなる最適化を行った。多能性幹細胞 (胚性幹細胞、人工多能性幹細胞) を in vitro で培養し、各種シグナル経路の活性を調節する低分子化合物を分化誘導因子として使い、その処理濃度・期間を検討した。定量的 RT-PCR 法による骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現解析、免疫染色・フローサイトメトリーによるマーカー蛋白質の発現解析、及び von Kossa 染色による石灰化の検証を行った。

また、研究代表者らが開発した骨芽細胞特異的に活性化する I 型コラーゲンプロモーター 2.3 kb 断片 (Col2.3) の制御下に蛍光蛋白質を発現するトランスジーン[13]を応用し、Col2.3GFP あるいは Col2.3Cherry を safe harbor locus に有する hESC あるいは hiPSC[14]

において蛍光発現を利用した分化判定も行った。

(2) マウス・ヒト骨芽細胞分化過程におけるエピゲノム動態、遺伝子発現動態の解析

① マウス初代骨芽細胞系における解析

マウス新生仔の頭蓋骨より、SP7 陽性骨芽細胞（運命決定期～幼弱骨芽細胞）をそれぞれ採取し、ATAC-seq を行った。研究代表者らがこれまでに使用してきた Sp7-EGFP マウス [4] を利用し、GFP を指標にしたセルソーティングにより各細胞集団を特異的に取得した。

② ヒト骨芽細胞分化系における解析

(1) で確立した分化誘導系において、各タイムポイントにおいて各種マーカー遺伝子の遺伝子発現、および遺伝子発現プロファイリング (RNA-seq) あるいはオープンクロマチン領域プロファイリング (ATAC-seq) を行った。また、単一細胞レベルで、同一細胞における RNA-seq と ATAC-seq を行うシングルセル・マルチオーム解析を行った。シングルセル解析については、10xGenomics 社の Chromium プラットフォームを用いた。

(3) エピゲノムデータに基づいた骨芽細胞分化に関わるエンハンサー領域の同定と検証

シーケンスデータを通法によって処理し、発現遺伝子 (RNA-seq) およびオープンクロマチン領域を同定した。続いて、バイオインフォマティクス的手法を用いて、エピゲノムデータ解析及び遺伝子発現データとの統合的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト多能性幹細胞の高効率骨芽細胞分化系の最適化

① 多能性幹細胞による三次元骨様組織誘導法の開発 (Zujur et al. *Sci Adv*, 2017) [15]

研究代表者らがすでに確立した骨芽細胞分化系 [12] をアテロコラーゲンスポンジによる三次元培養系に応用し、分化が誘導されるか検証した。マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いたところ、興味深いことに、培養皿を用いた従来の二次元培養系とは異なり、三次元培養系では多能性維持因子 (低分子化合物) 非存在下でもマウス ES 細胞の多能性を維持できることを見出した。続いて三次元培養系で骨芽細胞分化を誘導したところ、中胚葉系細胞を介して骨芽細胞様細胞および骨細胞様細胞が形成され、石灰化が誘導された。Col2.3GFP-マウス ES 細胞における蛍光発現も確認した。また、この三次元骨様組織にマウス初代破骨細胞前駆細胞を加えると、組織内に破骨細胞が誘導された。

以上より、本法は骨芽細胞分化におけるエピゲノム解析のみならず、骨芽細胞と破骨細胞によって調節される骨代謝を *in vitro* で再現する手法に発展させることで、骨代謝機構の解析に貢献することが期待された。

② ヒト多能性幹細胞の骨芽細胞分化誘導法の開発 (Zujur et al. *Regen Ther*, 2020) [16]

前述の骨芽細胞分化系では、ヒト多能性幹細胞における分化誘導効率はそれほど高くなかった。そこで、分化誘導条件の最適化を試みた。その結果、Essential 8 システムによる維持培養に続いて、4 つのステップにより、異種成分と未知な因子を含まない培養条件で (zeno-free, defined)、骨芽細胞を誘導できることを見出した。4 つのステップは次の通り: CHIR99021 とサイクロパミンによる 3 日間の中胚葉誘導→ヘッジホッグシグナル活性化剤 SAG と骨形成性低分子 TH (ヘリオキサンチン類縁体) による 7 日間の骨芽細胞前駆細胞誘導→CHIR99021 と TH による 4 日間の骨芽細胞誘導→7 日間の成熟骨芽細胞誘導。

本法によって、段階的な分化マーカーの発現と石灰化が誘導された。本法で培養した Col2.3Cherry-ヒト iPS 細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、約 20% の細胞が Cherry を発現し、50-70% の細胞が RUNX2 (骨芽細胞のマスター制御因子) を発現することを確認した。また、本法は三次元培養系にも応用可能であった。

③ ヒト多能性幹細胞による軟骨内骨化再現系の開発 (Tani et al. 投稿中)

単一細胞種への分化に加えて、複数の骨格系細胞種により構成される 3 次元骨組織の誘導を目指し、ヒト多能性幹細胞から発生過程を模倣しながら軟骨内骨化を再現する誘導系の開発に取り組んだ。まず、体幹の骨格要素の多く (軸骨格) が、沿軸中胚葉から体節を経て形成される椎板に由来することから、*in vitro* でヒト多能性幹細胞から段階的に椎板を誘導する手法の開発に取り組んだ。発生学的に重要なシグナル経路の活性を調節する低分子化合物でヒト多能性幹細胞を段階的に処理することで、原始線条、沿軸中胚葉、体節、椎板の各マーカー遺伝子を発現する細胞が段階的に形成された。

続いて、誘導した椎板細胞による組織形成を誘導するために、免疫不全マウスの腎被膜下へ移植した。 μ CTで経時的に観察すると、移植後6週よりx線不透過像が認められ、観察期間中その領域は増大した。組織学的解析により、形成された組織は、軟骨のカラム構造、骨殻および骨髄からなる軟骨内骨化様の骨組織構造を有しており、細胞種特異的な分化マーカーの発現を示した。さらに、Col2.3GFP-ヒトES細胞に本法を適用すると、誘導された軟骨内骨化組織の一次骨化中心および骨殻領域におけるGFP陽性細胞(=骨芽細胞)の存在も確認した。

以上より、本法は、ヒト多能性幹細胞から軟骨内骨化を再現するシステムであり、ヒト骨格発生の研究に寄与するものと考えられた。

- (2) ヒト・マウス骨芽細胞分化過程におけるエピゲノム動態、遺伝子発現動態の解析
- (3) エピゲノムデータに基づいた骨芽細胞分化に関わるエンハンサー領域の同定と検証
一連の検討項目となるため、以下にまとめて記載する。

① マウス初代骨芽細胞系におけるエピゲノム・遺伝子発現動態解析 (Hojo et al. 投稿中; <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3988393>)

生後1日のSp7-EGFPマウス頭蓋骨よりGFP陽性細胞を取得し、通法に従ってATAC-seq解析に供した。本GFP陽性細胞はSp7陽性の運命決定期から初期の骨芽細胞であると想定される。Sp7-GFP陽性細胞の遺伝子発現プロファイリング(RNA-seq)データについては、先行研究においてすでに取得していた[4]。また、比較のための増殖軟骨細胞および肥大軟骨細胞のデータとして、Col2a1-ECFP(増殖軟骨細胞)およびCol10a1-mCherry(肥大軟骨細胞)よりそれぞれECFPあるいはmCherry陽性軟骨細胞を採取し、ATAC-seqおよびRNA-seqに供した。

principal component analysis (PCA)より、Sp7-GFP陽性骨芽細胞のオープンクロマチン領域のプロファイル(ATAC-seq)、遺伝子発現プロファイル(RNA-seq)ともに、軟骨細胞のものとは大きく異なっており、細胞種特異的なパターンを示すことが明らかとなった。gene ontology解析から、このSp7-GFP陽性骨芽細胞特異的なオープンクロマチン領域は、骨格発生や骨化に関わる遺伝子の転写を制御している可能性が考えられた。つづいて、de novo motif解析によりオープンクロマチン領域に存在する転写因子モチーフを検索したところ、Sp7-GFP陽性骨芽細胞特異的なオープンクロマチン領域には、骨芽細胞のマスター制御因子であるRunx2およびSp7のモチーフが有意に濃縮していることが明らかとなった。さらに、Sp7-GFP陽性骨芽細胞特異的なオープンクロマチン領域において、骨芽細胞の分化に重要と思われるエンハンサーを同定した。

以上より、マウス骨芽細胞におけるエピゲノム状態、それらの生理的意義・妥当性、さらには骨芽細胞分化に関わるエンハンサー領域の一部が明らかとなった。

② ヒト骨芽細胞分化系におけるエピゲノム・遺伝子発現動態解析 (Tani et al. 投稿中)

(1)–(3)で開発した軟骨内骨化再現系において、エピゲノム・遺伝子発現動態解析を試みた。まず、RNA-seq解析によって、ヒト多能性幹細胞から原始線条、沿軸中胚葉(未分節中胚葉)、体節、椎板それぞれを特徴づける遺伝子発現プロファイルの推移が確認された。さらに、シングルセルRNA-seq解析から、誘導された椎板を構成する細胞の構成と性質が明らかとなった。

次に、誘導された軟骨内骨化組織において、遺伝子発現(RNA-seq)とオープンクロマチン領域(ATAC-seq)を同一細胞で検出する単一細胞多層解析を行った。その結果、組織内に存在する細胞はその遺伝子発現プロファイルとオープンクロマチンプロファイルから複数の細胞集団(クラスター)に分類された。クラスターは、前駆細胞様の集団、複数の分化段階を示す軟骨細胞および骨芽細胞の集団を反映すると考えられた。系譜解析によって、前駆細胞様の手段から、軟骨細胞と骨芽細胞の集団それぞれへと向かう2つの分化系譜が予測された。それぞれの細胞集団を特徴づけるマーカー遺伝子の発現上昇とそれらの遺伝子近傍におけるオープンクロマチンの形成が確認された。この所見は、骨格系細胞の分化を規定するエピゲノム状態の遷移を反映していること、さらに一連のオープンクロマチン領域に骨格系細胞の分化を司るエンハンサー領域が含まれていると考えられた。そこで、オープンクロマチン領域に濃縮している転写因子モチーフを検索し、遺伝子発現データと統合することで、各細胞集団で特徴的な転写因子から構成される細胞種特異的な遺伝子制御ネットワークを予測した。

(4) まとめ

本研究を通じて、ヒト多能性幹細胞から骨芽細胞、骨格系細胞を誘導する手法を開発した。続いて、マウス初代骨芽細胞およびヒト多能性幹細胞由来の軟骨内骨化様組織において、遺伝子発現プロファイリングおよびオープンクロマチンプロファイリングを行い、骨芽細胞を含む各骨格系細胞集団に特徴的な遺伝子発現とオープンクロマチン領域を同定した。さらに、ヒト軟骨内骨化様組織において取得されたデータを統合的に解析することで、細胞種特異的な遺伝子制御ネットワークを予測した。一連のデータはヒト骨芽細胞分化過程におけるエピゲノム動態、さらには骨格系細胞の分化を司るエンハンサー領域を提示するものと考えられる。引き続き、種間での保存性なども考慮した統合的な解析を行うことで、部位特異的エピゲノム編集による骨再生法の治療標的となるエンハンサー領域の同定につながるものと期待される。

参考文献

1. Zhang X, Peterson KA, Liu XS, McMahon AP, Ohba S. Gene regulatory networks mediating canonical Wnt signal-directed control of pluripotency and differentiation in embryo stem cells. *Stem Cells* **2013**, *31*, 2667-2679.
2. Ohba S, He X, Hojo H, McMahon AP. Distinct Transcriptional Programs Underlie Sox9 Regulation of the Mammalian Chondrocyte. *Cell Rep* **2015**, *12*, 229-243.
3. He X, Ohba S, Hojo H, McMahon AP. AP-1 family members act with Sox9 to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* **2016**, *143*, 3012-3023.
4. 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* **2016**, *37*, 238-253.
5. Hojo H, McMahon AP, Ohba S. An Emerging Regulatory Landscape for Skeletal Development. *Trends Genet.* **2016**, *32*, 774-787.
6. Hojo H, Ohba S. Insights into Gene Regulatory Networks in Chondrocytes. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*.
7. Hojo H, Ohba S. Gene regulatory landscape in osteoblast differentiation. *Bone* **2020**, *137*, 115458.
8. Hojo H, Ohba S. Sp7 Action in the Skeleton: Its Mode of Action, Functions, and Relevance to Skeletal Diseases. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 5647.
9. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* **2015**, *33*, 510-517.
10. Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S. Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5530-5537.
11. Ohba S, Nakajima K, Komiyama Y, Kugimiya F, Igawa K, Itaka K, Moro T, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Chung UI. A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *357*, 854-860.
12. Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports* **2014**, *2*, 751-760.
13. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J* **2007**, *21*, 1777-1787.
14. Xin X, Jiang X, Wang L, Stover ML, Zhan S, Huang J, Goldberg AJ, Liu Y, Kuhn L, Reichenberger EJ, Rowe DW, Lichtler AC. 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*, 1125-1137.
15. Zujur D, Kanke K, Lichtler AC, Hojo H, Chung UI, Ohba S. Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. *Sci Adv* **2017**, *3*, e1602875.
16. Zujur D, Kanke K, Onodera S, Tani S, Lai J, Azuma T, Xin X, Lichtler AC, Rowe DW, Saito T, Tanaka S, Masaki H, Nakauchi H, Chung UI, 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. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Kanazawa S, Okada H, Hojo H, Ohba S, Iwata J, Komura M, Hikita A, Hoshi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells in the bone marrow niche consist of multi-populations with distinct transcriptional and epigenetic properties.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94186-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tani S, Okada H, Chung UI, Ohba S, Hojo H	4. 巻 22
2. 論文標題 The progress of stem cell technology for skeletal regeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Onodera S, Saito A, Hojo H, Nakamura T, Zujur D, Watanabe K, Morita N, Hasegawa D, Masaki H, Nakauchi H, Nomura T, Shibahara T, Yamaguchi A, Chung UI, Azuma T, Ohba S	4. 巻 15
2. 論文標題 Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 125-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tani S, Chung UI, Ohba S, Hojo H	4. 巻 52
2. 論文標題 Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Mol Med	6. 最初と最後の頁 1166-1177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-020-0482-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohba S	4. 巻 21
2. 論文標題 Hedgehog signaling in skeletal development: Roles of Indian hedgehog and the mode of its action.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 6665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hojo H, Ohba S	4. 巻 137
2. 論文標題 Gene regulatory landscape in osteoblast differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BONE	6. 最初と最後の頁 115458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zujur D, Kanke K, Onodera S, Tani S, Lai J, Azuma T, Xin X, Lichtler AC, Rowe DW, Saito T, Tanaka S, Masaki H, Nakauchi H, Chung UI, Hojo H, Ohba S	4. 巻 14
2. 論文標題 Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 19-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawata M, Mori D, Kanke K, Hojo H, Ohba S, Chung UI, Yano F, Masaki H, Otsu M, Nakauchi H, Tanaka S, Saito T	4. 巻 13
2. 論文標題 Simple and robust differentiation of human pluripotent stem cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 530-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hojo H, Ohba S	4. 巻 20
2. 論文標題 Insights into gene regulatory networks in chondrocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 6324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20246324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大庭伸介, 北條宏徳	4. 巻 37
2. 論文標題 ゲノムワイドデータとバイオインフォマティクスに基づく転写制御因子とゲノムDNAの相互作用分析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオマテリアル - 生体材料 -	6. 最初と最後の頁 244-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tan Z, Niu B, Tsang KY, Melhado IG, Ohba S, He X, Hunag Y, Wang C, McMahon AP, Jauch R, Chan D, Zhang MQ, Cheah KSE	4. 巻 14
2. 論文標題 Synergistic co-regulation and competition by a SOX9-GLI-FOXA phasic transcriptional network coordinate chondrocyte differentiation transitions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1007346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Qi P, Ohba S, Hara Y, Fuke M, Ogawa T, Ohta S, Ito T	4. 巻 189
2. 論文標題 Fabrication of calcium phosphate-loaded carboxymethyl cellulose non-woven sheets for bone regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 322-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2018.02.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto A, Qi P, Ohba S, Ohta S, Hara Y, Ogawa T, Tomokiyo M, Sasaki A, Takizawa H, Mochizuki M, Ito T, Honnami M	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Bone regeneration by calcium phosphate-loaded carboxymethyl cellulose nonwoven sheets in canine femoral condyle defects.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zujur D, Kanke K, Lichtler AC, Hojo H, Chung UI, Ohba S	4. 巻 3
2. 論文標題 Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Advanvces	6. 最初と最後の頁 e1602875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.1602875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujii Y, Koga-Kawase Y, Hojo H, Yano F, Sato M, Chung UI, Ohba S, Chikazu D	4. 巻 9
2. 論文標題 Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-018-0783-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harata M, Watanabe M, Nagata S, Ko EC, Ohba S, Takato T, Hikita A, Hoshi K	4. 巻 9
2. 論文標題 Improving chondrocyte hargests with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) coated materials in the preparation for cartilage tissue engineering.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2017.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計31件（うち招待講演 15件 / うち国際学会 11件）

1. 発表者名 大庭伸介, 谷彰一郎, 岡田寛之, 鄭雄一, 北條宏徳
2. 発表標題 Understanding skeletal development through single-cell analysis of human pluripotent stem cell-derived endochondral bone tissues.
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷彰一郎, 岡田寛之, 関真秀, 鈴木穰, 齋藤琢, 田中栄, 鄭雄一, 北條宏徳, 大庭伸介
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞由来の3次元骨組織誘導とシングルセル・マルチオーム解析を用いたヒト骨形成機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷彰一郎, 岡田寛之, 関真秀, 鈴木穰, 齋藤琢, 田中栄, 鄭雄一, 北條宏徳, 大庭伸介
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞を用いたヒト骨形成過程の再現と応用
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷彰一郎, 岡田寛之, 齋藤琢, 田中栄, 鄭雄一, 北條宏徳, 大庭伸介
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞由来3次元骨組織誘導法と単一細胞解析を用いたヒト骨形成機構の探索
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tani S, Okada H, Seki M, Suzuki Y, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Hojo H, Ohba S
2. 発表標題 Elucidating human skeletal development by single-cell analyses with a model of endochondral bone formation using human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 ESA (Endocrine Society of Australia)-SRB (Society for Reproductive Biology)-ANZBMS (Australian and New Zealand Bone and Mineral Society) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tani S, Okada H, Seki M, Suzuki Y, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Hojo H, Ohba S
2. 発表標題 Elucidating human skeletal development by integrating single-cell analysis and bone tissue induction using human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 ISSCR/JSRM International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tani S, Okada H, Seki M, Suzuki Y, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Hojo H, Ohba S
2. 発表標題 Elucidating human skeletal development using single-cell analysis by inducing bone tissue formation from human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tani S, Okada H, Seki M, Suzuki Y, Saito T, Tanaka S, Chung UI, Hojo H, Ohba S
2. 発表標題 Exploring human skeletal development using a human bone tissue induced from human pluripotent stem cells.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞由来軟骨内骨化組織の作製
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会・総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた骨形成過程の再現
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 骨軟骨形成機構の理解に向けて
3. 学会等名 第62回日本顕微鏡学会九州支部集会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinsuke Ohba
2. 発表標題 Generation of skeletal cells from pluripotent stem cells.
3. 学会等名 The 68th Meeting of Japanese Association for Dental Research（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 骨・軟骨の形成における遺伝子発現制御機構の探索.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（誌上開催）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 多能性幹細胞由来の骨形成性細胞の作製と応用.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 骨・軟骨発生の理解と多能性幹細胞を用いた発生過程の再現.
3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島健太, 北浦義昭, 長谷川尚, 山崎雄二, 長尾研二, 鄭雄一, 大庭伸介
2. 発表標題 マウス脛骨骨折モデルにおける可溶性Frizzled2による骨折治癒促進.
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北條宏徳, 山川晃, 齋藤琢, 小野寺晶子, 東俊文, 鄭雄一, 大庭伸介
2. 発表標題 Runx2は骨格発生において細胞種特異的な転写制御領域に作用する.
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajima K, Kitaura Y, Hasegawa H, Yamazaki Y, Nagao K, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 Local administration of soluble Frizzled2 accelerate bony callus formation during bone fracture repair process in a mouse model.
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hojo H, Ohba S, Yamakawa A, Guo Q, He X, Saito T, Onodera S, Azuma T, Chung UI, McMahon AP
2. 発表標題 Cell-type distinct Runx2 regulatory action underlies its distinct functions in osteoblast and chondrocytes.
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinsuke Ohba
2. 発表標題 Exploring the gene regulatory landscape in skeletal cells.
3. 学会等名 2019 Gordon Research Conference Cartilage Biology & Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 多能性幹細胞の分化システムとChIP-seqを駆使して骨芽細胞分化における転写制御を理解する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会・総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた骨格系細胞における遺伝子発現制御機構の解析
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会・総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた骨芽細胞分化のインビトロモデリングと分化機序解析への応用
3. 学会等名 第4回日本筋学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 骨再生療法・基礎的観点から
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Yamakawa, Hironori Hojo, Ung-il Chung, Shinsuke Ohba
2. 発表標題 A chondrocyte-specific Indian hedgehog enhancer as an OA-driving enhancer
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (ORS) 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Yamakawa, Hironori Hojo, Ung-il Chung, Shinsuke Ohba
2. 発表標題 Identification of a chondrocyte-specific Indian hedgehog enhancer and Sox9-mediated mechanisms of the enhancer activation
3. 学会等名 2018 OARSI World Congress on Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山川晃, 北條宏徳, 鄭雄一, 大庭伸介
2. 発表標題 軟骨細胞特異的なIndian hedgehogのエンハンサーの同定とSox9による活性化機構
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zujur DC, Hikita A, Kanke K, Hojo H, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 Modeling of bone remodeling by three-dimensional co-culture of mouse embryonic stem cell-derived osteoblasts and osteoclast precursors.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 15th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Zujur DC, Kanke K, Hojo H, Onodera S, Azuma T, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 In vivo bone formation by osteoblasts generated from human induced pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions.
3. 学会等名 39th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinsuke Ohba
2. 発表標題 Genome-scale understanding of gene regulatory landscape in skeletal cells.
3. 学会等名 14th Bone Biology Forum (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大庭伸介
2. 発表標題 骨格形成における遺伝子発現機構をゲノムスケールで理解する.
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/shin-o
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鄭 雄一 (Tei Yuichi) (30345053)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	
研究分担者	北條 宏徳 (Hojo Hironori) (80788422)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授 (12601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	谷 彰一郎 (Tani Shoichiro)	東京大学・大学院医学系研究科・大学院生 (12601)	
研究協力者	ズフル デニス (Zujur Denise)	東京大学・大学院工学系研究科・大学院生 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
	米国	University of Connecticut Health Center	Stanford University
中国	University of Hong Kong		