

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301  
研究種目：挑戦的研究（萌芽）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K19603  
研究課題名（和文）体細胞分化の鍵となる遺伝子探索のための新方法論：インバース・ジェネティクスの開拓

研究課題名（英文）Inverse genetics: A new methodology for the identification of key genes of somatic cell differentiation

研究代表者  
久保田 聡（Kubota, Satoshi）  
岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：90221936  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：体細胞をリプログラミングしてもiPS細胞になるのはごく一部である。本研究では分化経路の逆を辿った細胞だけがiPS細胞になるという仮説の下、軟骨細胞がiPS細胞に変化する際トランスクリプトームがどう変遷するかをシングルセルRNA-seq解析で追った。軟骨細胞をiPS細胞に導くと、少数の細胞は軟骨細胞分化のマスター遺伝子SOX9の発現をオフにしたあとiPS細胞へと向かった。残る多数細胞は表層関節軟骨細胞マーカー遺伝子PRG4を高発現する細胞に落ち着いた。以上は分化を遡った細胞のみがiPS細胞となることを示しており、それはSOX9強発現でiPS化が阻害されること(iPS干渉)によっても確認された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では軟骨細胞にリプログラミング因子を発現させ、iPS細胞となる細胞の中で起こるトランスクリプトームの変化をシングルセル解析で追うことで、リプログラミングでは分化過程で起こる現象を時間を逆転させた形で再現されることを示すことができた。この反転遺伝学(インバース・ジェネティクス)的手法を用いれば、幹細胞からの分化のプロセスが明らかではない体細胞の分化経路を、体細胞から幹細胞までのリプログラミング過程を辿ることで知ることができる。つまりこの新手法はあらゆる体細胞分化のマスター遺伝子の探索に有用と考えられ、さまざまな細胞、組織、臓器の医学生命科学研究の進歩に大きく貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Among the somatic cells being reprogrammed, only a limited population of the cells eventually metamorphose into iPS cells. In this study, under a hypothesis that the cells that followed their proper differentiation pathway backwards to pluripotent stem cells only could become iPS cells, we chased the transcriptomic transition of each cell under reprogramming by time-coursed single cell RNA-seq analyses. A minor population of chondrocytes being reprogrammed turned off SOX9, a master gene of chondrocyte differentiation, and then moved forward to iPS cells. The other off-targeted cells formed a major population and followed a single pathway to PRG4-positive articular surface zone chondrocyte-like cells. These findings indicate only the cells that retrospectively followed their proper differentiation pathway become iPS cells. This hypothesis was further confirmed by the fact that overexpression of SOX9 interfered with the iPS cell conversion of chondrocytes (iPS interference).

研究分野：硬組織分子生物学

キーワード：reprogramming iPS cell chondrocyte transcription factor lncRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

代表者は20年前までは米国のレトロウイルス学者だったが、帰国後は骨軟骨研究に注力している。一方代表者の研究は一貫して遺伝子発現制御とその意義に重きをおいており、10年前にいち早く lncRNA の遺伝子制御機能に着目し研究を始め、その一種 urothelial cancer associated 1 (UCA1) が軟骨細胞分化を制御することを発見した。UCA1 は軟骨細胞分化のマスター遺伝子 *SOX9* に先んじて発現するため、代表者はこの lncRNA も軟骨細胞分化の鍵を握る分子と考えている。そしてこの UCA1 はヒト内在性レトロウイルス (HERV) の産物なのである (Ishikawa et al., *J Cell Physiol*, 2018; 233: 4825-4840)。HERV は霊長類の進化過程最後の段階でゲノムの中で拡大・進化し、ヒトゲノムに7000コピー以上存在する。興味を惹かれた代表者は文献を探すうち「iPS細胞を樹立する過程で多数のHERVが一過性に強く活性化され、それが多能性獲得に重要な役割を演じている」という論文 (Ohnuki et al., *PNAS*, 2014)に出会った。しかしいったいHERVはここで何をやっているのか? その疑問に部分的にせよ答えたのが「ES細胞核内に構築される遺伝子の空間配置 (topologically associated domains: TAD) がHERVによって構築維持される」という別の論文 (Zhang et al., *Nat Genet*, 2019; 51:1380-1388)であった。HERVが細胞種特異的TADの構築を通じ細胞形質を支えているという事実は、代表者がUCA1について得た成果とも符合する。そしてこの2論文は代表者を本研究構想へと導いた。iPS細胞に至るプロセスは、いわゆる山中因子と呼ばれる *OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* の4遺伝子 (OSKM)を発現すれば一足飛びに「無垢な多能性幹細胞」に若返るという単純なものではない。長い時間をかけて、HERVなど分化の鍵を握る遺伝子群が、分化を逆に辿りつつ呼び醒まされたものだけがiPS細胞になれる。つまりリプログラミング過程でも、細胞への分化を運命づけた遺伝子は特徴的な動態を示すに違いない - この考えが本研究提案の端緒となった。

### 2. 研究の目的

ヒト体細胞から多能性幹細胞を樹立する方法が確立された今日では、多能性幹細胞を、目的とする体細胞への分化に導く分子メカニズムを知ることが大きな課題となった。実際歯科領域でも「歯の再生」を究極の目的として、象牙芽細胞などの歯をつくる細胞への分化の鍵となる遺伝子の探索が盛んに行われている。そこで本研究ではこういった探索を推進すべく幹細胞を体細胞に分化させる鍵となる遺伝子を見つけるまったく新しい方法を開拓する。

分化の進んだヒト体細胞にOSKMを強制発現すればiPS細胞を樹立できる。この現象からはOSKM産物があらゆる細胞固有のトランスクリプトームを一掃するという図式を思い描きがちだが、実はそんな単純なものではない。もしそうなら4遺伝子の発現する細胞はみなiPS細胞化するはずだが、実際にiPS細胞となる細胞は1%にも満たない。この事実は「OSKMは幹細胞に向かわせる駆動力であり、その力でたまたま正しい分化の道筋をさかのぼった細胞だけがiPS細胞になれる」という仮説で説明できる。山の頂上に位置する幹細胞が、分化の谷間を辿って山を下り裾野で体細胞になる、と例えるなら、iPS細胞になるにはそれを遡らねばならない。しかし分化した細胞をOSKMの力で頂上に向かって引っ張っても、ほとんどの細胞は尾根にぶつかり谷につまずいてあらぬ方向に行ってしまうというわけである。そしてこの仮説は実は、近年開発された「iPS干渉法」(Hikichi et al., *PNAS*, 2013;110:6412-7)の基盤をなしている。この方法では「細胞分化のマスター転写因子を強制発現しておく、OSKMを導入してもiPS細胞に戻れない」ことを利用してマスター転写因子を探索する。すなわちiPS干渉法は、iPS細胞に向かう細胞はマスター転写因子がオフになる点を通過する、言い換えればリプログラミングの過程で自らの分化過程を逆に辿ることを前提としている。ならばもっと直截に体細胞からiPS細胞になる過程をたどれば、多能性幹細胞から体細胞に分化する道筋を知ることができるだろう。本研究ではこの「反転遺伝学: インバース・ジェネティクス」の手法によって上記仮説を証明し、同時に幹細胞を「歯をつくる細胞」を含む、あらゆる細胞に分化させる際に鍵となる遺伝子群の発見に、広く応用できる方法の確立に挑んだ。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞と遺伝子導入ベクター

ヒト正常関節軟骨細胞をLonza社から購入し、同社の供給する chondrocyte growth medium にて培養、増殖させたのち実験に供した。山中4因子を含む6つのリプログラミング因子の遺伝子導入には、Tokiwa Bio社から購入したセンダイウイルスベクターSRV iPSC-3を使用した。軟骨細胞分化のマスター転写因子 *SOX9* の遺伝子導入はレトロウイルスベクターを用いて行った。

#### (2) 軟骨細胞のiPS細胞へのリプログラミング

培養した正常軟骨細胞にSRV-iPSC-3を感染させ、Takara Bio社のiMatrix-511を用いたフィーダー細胞を必要としない培養系にて10-12日間にわたり培養し、多能性幹細胞へのリプログラミングを行なった。

### (3) リアルタイム RT-PCR 解析

レトロウイルスベクターを用いて導入した *SOX9* の発現を確認するため、リアルタイム RT-PCR 法によって *SOX9* mRNA 量を細胞間で相対的に評価した。

### (4) 時系列を追ったシングルセルトランスクリプトーム解析

リプログラミング開始後毎日細胞をサンプリングし、10x Genomics 社の実験システムを用いてそれぞれの細胞集団のラベリングを行ったあと、single cell RNA sequencing (scRNA-seq) 解析を実施した。結果的に総計 4 億リードのデータから細胞あたり 63,000 リードのトランスクリプトーム情報が得られた。データは同社の Cell Ranger によって時系列上に再配置するとともに、Seurat R package を基本として開発した R Shiny software により解析した。すなわち得られたトランスクリプトームデータから differentially expressed gene (DEG) 解析、uniform manifold approximation and projection (UMAP) による次元削減解析を行い、二次元平面上にトランスクリプトームを可視化した。また DEG 解析の結果に基づいた gene set enrichment 解析、scVelo による RNA velocity 解析、STREAM による pseudotime trajectory 解析も行なった。

### (5) iPS 干渉法

リプログラミング因子の導入と同時にレトロウイルスベクターで *SOX9* を導入した細胞群と、陰性対照群に対して上述の方法でリプログラミングを行なった。12 日後、形成された幹細胞コロニーに対して多能性幹細胞を特異的に染色する rBC2LCN-635 にて処理し、多能性幹細胞コロニー数を計測、両群間で比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 軟骨細胞リプログラミング過程におけるトランスクリプトーム遷移経路の解明

ヒト正常関節軟骨細胞にリプログラミング因子を強制発現し、日を追ってトランスクリプトームの変化を UMAP 上で追ったところ、強制発現後 3 日で細胞群は 2 つのはっきり異なる方向のトランスクリプトーム遷移を見せた。ひとつは *SOX2* 陽性細胞クラスターに向かう方向に 2 日以内に急速に変化する細胞集団で、数としてはマイノリティであった。これに対して他の細胞はほぼすべて、3 日かけてこれら細胞とはまったく別の *SOX2* 陰性クラスターに集合した。したがって前者が iPS 細胞に向かうリプログラミング中の細胞であり、後者がリプログラミングに失敗した、いわゆるオフターゲット細胞であることが確認された。これはリプログラミング因子を導入しても iPS 細胞に到達できる細胞は少数であるという、現在までの知見と一致する。その一方、オフターゲット細胞が揃って同じ方向にトランスクリプトームを変化させるという事実は想定外であった。研究開始当初、リプログラミングに失敗した細胞は運命の定まらない、バラバラな方向に向けて変化すると予測していたが、少なくとも軟骨細胞についてはそうではなかった。これも本研究がもたらした新たな発見のひとつである。

### (2) インバース・ジェネティクスによる *SOX9* の軟骨分化マスター転写因子としての再発見

続いて上記の 2 つのルートを進る細胞のうち、リプログラミングに向かう少数派細胞群における遺伝子発現変動を詳細に分析した。その結果、リプログラミング後 2 日、つまり *SOX2* 陽性クラスターに移行する早期に *SOX9* 発現がほぼ消失することが明らかになった。これは多能性幹細胞から間葉系幹細胞を経て、ついに軟骨細胞に分化する前に *SOX9* 発現が誘導される本来の分化経路を、リプログラミング過程では逆に迎えていることを意味し、当初の仮説がここに証明された。言い方を変えれば、このインバース・ジェネティクスの手法により、*SOX9* を軟骨細胞分化マスター遺伝子として再発見が可能であった。なおオフターゲット細胞の中にも *SOX9* を発現しない細胞が多数含まれることから、*SOX9* の発現を消すことだけではリプログラミングの遂行には十分ではなく、iPS 細胞に向かうトランスクリプトーム遷移ルートの早期にそれが起こらねばならないことも示された。なおこれら細胞は 3 日後以降は 10 日後まで、時間をかけてトランスクリプトームを変化させて多能性幹細胞マーカーである *NANOG* 陽性細胞へと変容した。この過程、すなわち細胞が *SOX2* 陽性 *SOX9* 陰性細胞クラスターから *NANOG* 陽性クラスターに移る過程のトランスクリプトーム遷移を gene set enrichment 解析で分析したところ、幹細胞に特徴的な代謝のリプログラミング、胚盤胞形成、幹細胞への変化、細胞間接着の促進と、細胞分化、細胞間情報伝達、細胞運命決定、胎盤形成の抑制に向けてトランスクリプトームが変化していることも確認できた。

### (3) RNA velocity 解析の結果とその解釈

各遺伝子からのスプライシング前後の pre-mRNA と成熟 RNA の量に基づいて、直後の mRNA 量の増減を推測する RNA velocity 解析では、RNA を採取した時点で細胞のトランスクリプトームが遷移する方向を推測できるとされている。またひとつひとつの細胞のトランスクリプトームの類似性から、時系列を推測してトランスクリプトーム遷移の軌跡を描き出すことが可能で、こうして得られた軌跡は pseudotime trajectory と呼ばれる。ところがリプログラミング中の軟骨細胞のトランスクリプトームにつきこの解析を行なったところ、pseudotime trajectory の軌跡は実際の時系列に沿って細胞が描いた軌跡とは符号したが、RNA velocity の示す方向は、実際に細胞

が呈したトランスクリプトームの遷移とほぼ逆となった。その原因を探るために再び gene set enrichment 解析を行ったところ、NANOG 陽性クラスターに細胞が移動する際、グローバルに RNA スプライシングを抑制する力が働いている可能性が示された。すなわち多能性幹細胞に至る直前では、スプライシングの全面的抑制という転写後調節がゲノムワイドに行われ、成熟 mRNA を減少させると同時に RNA velocity を見かけ上増加させることとなり、解釈困難な所見を生んだと考えられる。なおオフターゲット細胞においてはトランスクリプトーム変化と RNA velocity 変化の方向に矛盾はみとめられず、発生初期では特に転写後調節が重要な役割を果たしていることをも、インバース・ジェネティクスで再確認できたとも言える。

#### (4) リプログラミングに失敗した軟骨細胞の運命

リプログラミング開始後3日で、トランスクリプトーム的にほぼ単一のクラスターに集合したオフターゲット細胞群は、その後一週間かけて関節軟骨表層細胞マーカー遺伝子である PRG4 を非常に強く発現する2つのクラスターに向けて遷移した。その間、細胞には PRG4 の発現だけでなく、SOX9 や ACAN などの軟骨細胞マーカー遺伝子発現も誘導されたが、成長板肥大軟骨細胞のマーカーである COL10A1 の発現は誘導されなかった。この2つのクラスターに共通して強く発現している遺伝子としては、PRG4 に加えて bone marrow stromal cell antigen 2 や、インターフェロン誘導性の MX dynamin-like GTPase-1 および interferon alpha inducible protein 6 遺伝子などが含まれていた。以上の事実は、リプログラミングに失敗したヒト軟骨細胞は、本研究で用いた細胞培養条件下では、関節軟骨表層細胞の特徴を色濃く有する細胞に向けて揃って分化することが明らかになった。

#### (5) 2つの異なった運命を辿る細胞群における CCN ファミリー遺伝子の発現変動

CCN ファミリーは6つのメンバーからなる遺伝子ファミリーであり、さまざまな分子との相互作用の下、調和のとれた組織形成を指揮するタンパク質をコードしている。その中でも CCN2 は哺乳類の骨格形成に必要であり、関節軟骨細胞の分化を、肥大化を誘導することなく促進し、損傷した関節軟骨を再生させる。その他の CCN ファミリーメンバーについても骨格形成への関与を示す報告があるため、多能性幹細胞へ向かうルート、および関節軟骨表層細胞に向かうルートで CCN ファミリー遺伝子の発現がどう変動するかを解析した。するとリプログラミングに向かう細胞では2日以内にほぼすべての細胞で CCN2 発現は減衰し、多能性幹細胞クラスターでは最低となった。これに対してオフターゲット細胞では3日間でひとつのクラスターに集合する同時に、CCN2 発現が非常に強く誘導され、その後関節軟骨表層細胞に向かうとともに全細胞平均発現量程度に減衰した。さらに CCN1 と CCN4 は発現量は CCN2 と比較して低いものの、CCN2 と同様の挙動を示した。またその間、その他のファミリーメンバーの発現に変化は見られなかった。

#### (6) iPS 干渉法による SOX9 のマスター転写因子としての機能的再確認

軟骨細胞のリプログラミング過程早期に、分化のマスター転写因子である SOX9 の発現がオフになることは上記のように確認できた。続いて、そうなることが機能的に必要なかを確認するため iPS 干渉実験を行った。具体的には SOX9 をリプログラミング因子と同時にレトロウイルスベクターで追加導入し、持続発現させつつリプログラミングを行い iPS 細胞コロニーを形成させ、何も追加しない場合および GFP を追加した場合と比較した。その結果 SOX9 を導入した群では iPS 細胞コロニーが劇的に減少し、SOX9 発現が下がらなければリプログラミングは進まないことが明らかになった。これは SOX9 の変動がリプログラミングにおいても分化過程と同様に必要で、軟骨細胞分化におけるマスター転写因子であることを示す事実である。

以上の事実より、ヒト関節軟骨細胞が多能性幹細胞にリプログラミングされる際、マスター転写因子の発現のサイレンシングを経て分化を遡ることがわかった。この方法をあらゆる体細胞に適用することにより、新たに分化のマスター転写因子や、それをさらに上流で制御している遺伝子の発見が可能と思われる。この上流で分化を制御する「鍵遺伝子」は「研究開始当初の背景」に述べたように、HERV などから出力される lncRNA ではないかと考え、現在これを実証するための研究に着手したところである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kubota Satoshi, Kawaki Harumi, Perbal Bernard, Takigawa Masaharu, Kawata Kazumi, Hattori Takako, Nishida Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Do not overwork: cellular communication network factor 3 for life in cartilage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 353 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-023-00723-4	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 Uchida-Fukuhara Yoko, Hattori Takako, Fu Shanqi, Kondo Sei, Kuwahara Miho, Fukuhara Daiki, Islam Md Monirul, Kataoka Kota, Ekuni Daisuke, Kubota Satoshi, Morita Manabu, Ikegame Mika, Okamura Hirohiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Maternal Gut Microbiome Decelerates Fetal Endochondral Bone Formation by Inducing Inflammatory Reaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10051000	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 Kubota Satoshi, Aoyama Eriko, Takigawa Masaharu, Nishida Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Fibroblast Growth Factors and Cellular Communication Network Factors: Intimate Interplay by the Founding Members in Cartilage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158592	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 Hirose Kazuki, Kuwahara Miho, Nakata Eiji, Tetsunaga Tomonori, Yamada Kazuki, Saiga Kenta, Takigawa Masaharu, Ozaki Toshifumi, Kubota Satoshi, Hattori Takako	4. 巻 23
2. 論文標題 Elevated Expression of CCN3 in Articular Cartilage Induces Osteoarthritis in Hip Joints Irrespective of Age and Weight Bearing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232315311	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 Kubota Satoshi	4. 巻 CCN proteins
2. 論文標題 Utilizing Public Molecular Biological Databases for CCN Family Research	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2744-0_12	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 Kubota Satoshi, Kawaki Harumi, Takigawa Masaharu	4. 巻 CCN proteins
2. 論文標題 Protocols for Screening Peptides Binding to CCN Family Proteins and Their Extended Utility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 87 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2744-0_8	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 Takeuchi-Igarashi Hiroko, Tachibana Toshiaki, Murakashi Etsuko, Kubota Satoshi, Numabe Yukihiro	4. 巻 132
2. 論文標題 Effect of cellular communication network factor 2/connective tissue growth factor on tube formation by endothelial cells derived from human periodontal ligaments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105279 ~ 105279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2021.105279	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 Kubota Satoshi, Kawaki Harumi, Perbal Bernard, Kawata Kazumi, Hattori Takako, Nishida Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Cellular communication network factor 3 in cartilage development and maintenance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 533 ~ 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-021-00629-z	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 Mizukawa Tomomi, Nishida Takashi, Akashi Sho, Kawata Kazumi, Kikuchi Sumire, Kawaki Harumi, Takigawa Masaharu, Kamioka Hiroshi, Kubota Satoshi	4. 巻 236
2. 論文標題 RFX1 mediated CCN3 induction that may support chondrocyte survival under starved conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 6884 ~ 6896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30348	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 Kawata Kazumi, Narita Keishi, Washio Ayako, Kitamura Chiaki, Nishihara Tatsuji, Kubota Satoshi, Takeda Sen	4. 巻 150
2. 論文標題 Odontoblast differentiation is regulated by an interplay between primary cilia and the canonical Wnt pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116001 ~ 116001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116001	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 Nishida Takashi, Akashi Sho, Takigawa Masaharu, Kubota Satoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Angiotensin II on Chondrocyte Degeneration and Protection via Differential Usage of Angiotensin II Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9204 ~ 9204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179204	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 Elseoudi Abdellatif, Nishida Takashi, Mizukawa Tomomi, Hattori Takako, Kawata Kazumi, Taha Eman A., Takigawa Masaharu, Kubota Satoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Bipartite regulation of cellular communication network factor 2 and fibroblast growth factor 1 genes by fibroblast growth factor 1 through histone deacetylase 1 and fork head box protein A1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 81 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-020-00600-4	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67件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Do, H.T., Ono, M., Wang, Z., Kitagawa, W., Dang, A.T., Yonezawa, T., Kuboki, T., Oohashi, T., Kubota, S.
2. 発表標題 Retrospective re-discovery of the transcription factor that controls chondrocyte differentiation
3. 学会等名 102nd IADR General session (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hoang, L., Aoyama, E., Hiasa, M., Omote, H., Kuboki, T., Kubota, S., Takigawa, M.
2. 発表標題 S-adenosylmethionine enhances chondrocyte differentiation via polyamine and chondrogenesis-related gene expression.
3. 学会等名 102nd IADR General session (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西田 崇、辰川ひなた、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 線維化におけるCCN2の転写共役様因子としての作用
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 CCN2 は BMPRIb を介して軟骨細胞における GDF5 の生理活性を抑制する。
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河田かずみ、青山絵理子、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 PDGFRL と CCNs の相互作用による Hippo pathway を介した軟骨細胞における細胞増殖・分化調節機構
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ホアン ディン ロック、青山絵理子、日浅未来、表弘志、久保田聡、窪木拓男、滝川正春
2. 発表標題 S- アデノシルメチオニンは、ポリアミン合成と分化関連遺伝子発現を促進することにより、軟骨細胞の分化を調節する。
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桑原実穂、廣瀬一樹、近藤 星、古松毅之、中田英二、原 哲也、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 軟骨組織におけるCCN3の老化マーカーとしての役割と、CCN3の異所性発現による加齢様退行性変化の促進
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十嵐(武内)寛子、久保田聡、立花利公、村櫻悦子、沼部幸博
2. 発表標題 ヒト歯根膜由来内皮細胞によるtube formationに及ぼすCCN2/CTGFの影響
3. 学会等名 第55回日本結合組織学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 難波裕生、井澤 俊、上岡 寛、久保田聡
2. 発表標題 Urothelial cancer-associated 1(UCA1)長鎖ノンコーディングRNAの破骨細胞分化・機能への影響
3. 学会等名 第43回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 CCN2 は GDF5 およびその受容体との結合を介して軟骨細胞分化を制御する。
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河田かずみ、青山絵理子、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞での生物学的作用における Hippo pathway を介した CCNs と PDGFRL の関与
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 難波裕生、井澤 俊、上岡 寛、久保田聡
2. 発表標題 Urothelial cancer-associated 1(UCA1) 長鎖非コード RNAが破骨細胞分化・機能に与える影響
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hoang, L., Aoyama, E., Hiasa, M., Omote, H., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 Positive regulation of S-adenosylmethione on chondrocytic differentiation via stimulation of polyamine production and gene expression of chondrogenic differentiation factors
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 CCN2とGDF5およびその受容体との結合の解析と軟骨細胞における意義
3. 学会等名 第14回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hoang, L., Aoyama, E., Hiasa, M., Omote, H., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 Positive regulation of S-adenosylmethionine on chondrocytic differentiation via stimulation of polyamine production and gene expression of chondrogenic differentiation factors
3. 学会等名 第14回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田 崇、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるCCN2の核移行の意義
3. 学会等名 第14回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河田かずみ、青山絵理子、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞増殖・分化におけるHippo pathwayを介したCCNsとPDGFRLの関与
3. 学会等名 第14回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hoang, L., Aoyama, E., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 Positive regulation of S-adenosylmethionine on chondrocytic differentiation via stimulation of polyamine production and gene expression of chondrogenic differentiation factors
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 服部高子、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 CCN3は軟骨細胞老化マーカーであり、年齢、荷重の有無に関わらず変形性関節症と相関する。
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 GDF5およびその受容体との結合を介したCCN2の軟骨細胞分化制御機構
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hoang, L., Aoyama, E., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 Positive regulation of S-adenosylmethionine on chondrocytic differentiation via stimulation of polyamine production and gene expression of chondrocytic differentiation factors
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桑原実穂、廣瀬一樹、近藤 星、Fu Shanqi、大野充昭、古松毅之、中田英二、滝川正春、久保田聡、服部 高子
2. 発表標題 軟骨組織の加齢とともに発現が上昇するCCN3は、その発現上昇と軟骨変性度が年齢、荷重の有無に関わらず相関する。
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Do, H.T., Ono, M., Wang, Z., Kitagawa, W., Dang, A.T., Yonezawa, T., Kuboki, T., Oohashi, T., Kubota, S.
2. 発表標題 Inverse genetic tracing of the entire differentiation pathway of human chondrocytes by single cell RNA-seq.
3. 学会等名 第44回岡山歯学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田 崇、長尾有里香、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞における核内CCN2の生理的役割
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 CCN2がGDF5およびその受容体との結合を介して軟骨細胞分化に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hoang, L., Aoyama, E., Hiasa, M., Omote, H., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 S-アデノシルメチオニンによる軟骨細胞保護作用のメカニズム：ポリアミン合成と軟骨細胞関連遺伝子発現の相互作用
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Do, H.T., Ono, M., Wang, Z., Kitagawa, W., Dang, A.T., Yonezawa, T., Kuboki, T., Oohashi, T., Kubota, S
2. 発表標題 Inverse genetics to trace the differentiation pathway of human chondrocytes retrospectively by single cell RNA-seq
3. 学会等名 第36回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kubota, S.
2. 発表標題 Quiescence is golden: cellular communication network factor 3 as "Yin" versus "Yang" in cartilage
3. 学会等名 12th International Conference on Dental Science and Education (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kubota S., Kawaki, H., Perbal, B., Takigawa, M., Kawata, K., Hattori, T. and Nishida, T.
2. 発表標題 Do not overwork: CCN3 for life in cartilage
3. 学会等名 The 11th International Workshop on the CCN family of Genes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirose, K., Kuwahara, M., Nakata, E., Tetsunaga, T., Yamada, K., Koura, T., Inoue, T., Takigawa, M., Ozaki, T., Kubota, S., Hattori, T.
2. 発表標題 Correlation between High Expression of CCN3 and Osteoarthritis in hip joints
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬一樹、服部高子、滝川正春、中田英二、鉄永智紀、山田和希、佐藤嘉洋、小浦卓、尾崎敏文、久保田聡
2. 発表標題 変形性股関節症とCCN3発現の相関
3. 学会等名 第42回日本形態計測学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬一樹、服部高子、桑原実穂、滝川正春、中田英二、鉄永智紀、山田和希、佐藤嘉洋、小浦卓、尾崎敏文、久保田聡
2. 発表標題 変形性関節症とCCN3発現の相関
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 GDF5とCCN2との結合が軟骨細胞に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hoang Dinh, L., Aoyama, E., Hiasa, M, Omote, H., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 S-adenosylmethionine can promote polyamine production and growth factor genes expression thereby regulating chondrocytic differentiation.
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田崇、薬師寺翔太、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 メトホルミンの軟骨細胞におけるlong non-coding RNA, UCA1およびCCN2の発現制御と代謝における意義
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤壮真、河田かずみ、西田崇、水川朋美、飯田征二、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるCCN2由来環状RNAの発現とその機能の探索
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬一樹、服部高子、桑原実穂、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 CCN3の関節軟骨における発現は、年齢、荷重の有無に関わらず変形性関節症と相関する -股関節を用いた研究-
3. 学会等名 第13回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ホアンディン ロック、青山絵理子、久保田聡、窪木拓男、滝川正春
2. 発表標題 S-アデノシルメチオニンはポリアミン産生だけでなく増殖因子の遺伝子発現を促進することによって軟骨細胞分化を促進する。
3. 学会等名 第64回 歯科基礎医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤壮真、河田かずみ、西田崇、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるCCN2由来環状RNAの発現
3. 学会等名 第64回 歯科基礎医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬一樹、中田英二、鉄永智紀、山田和希、佐藤嘉洋、小浦卓、服部高子、桑原実穂、滝川正春、久保田聡、尾崎敏文
2. 発表標題 変形性股関節症とCCN3発現の相関
3. 学会等名 第37回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	桑原実穂、近藤星、Fu Shanqi、大野充昭、古松毅之、中田英二、滝川正春、服部高子、久保田聡
2. 発表標題	軟骨組織の加齢変性におけるCCN3の機能
3. 学会等名	第95回日本生化学会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Hoang, L., Aoyama, E., Hiasa, M., Omote, H., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題	S-アデノシルメチオニンによるポリアミン産生および成長因子発現を介した軟骨細胞分化の制御
3. 学会等名	第95回日本生化学会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	近藤星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田崇、薬師寺翔太、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題	軟骨細胞におけるメトホルミンによる long non-coding RNA, UCA1およびCCN2の発現制御
3. 学会等名	第45回日本分子生物学会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	ホアンディン ロック、青山絵理子、日浅未来、表弘志、久保田聡、窪木拓男、滝川正春
2. 発表標題	S-アデノシルメチオニンは軟骨細胞のポリアミン合成および成長因子遺伝子発現を介して分化を促進する。
3. 学会等名	第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 CCN2とGDF5やそのレセプターとの結合が軟骨細胞へ及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤壮真、河田かずみ、水川朋美、西田崇、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるCCN2由来環状RNAの探索とその機能
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久保田聡
2. 発表標題 持続可能な軟骨代謝を支えるCCN3
3. 学会等名 第23回日本骨粗鬆症学会 / 第39回日本骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田聡
2. 発表標題 成長因子の再誕：その隠された分子機構と相互作用
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河田かずみ、青山絵理子、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 CCN2、CCN3とPDGFRLの軟骨細胞への作用におけるHippo pathwayの関与
3. 学会等名 第12回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、明石 翔、河田かずみ、菊池 董、川木晴美、滝川正春、上岡 寛、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞でのRFX1によるCCNファミリータンパク質3遺伝子制御メカニズム
3. 学会等名 第12回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hoang Dinh, L., Aoyama, E., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 Chondrocyte differentiation is positively regulated by S-adenosyl- methionine via polyamine biosynthesis.
3. 学会等名 第12回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田 崇、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 メトホルミンの軟骨細胞分化促進作用におけるUCA1とCCN2の役割
3. 学会等名 第12回日本CCNファミリー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fu, S., 桑原美穂、内田瑤子、近藤 星、池亀美華、丸山雄介、服部淳彦、林 大智、下村侑司、高垣安紗美、西田 崇、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 Circadian production of melatonin and its receptor influence metabolism and rhythmic gene expression in chondrocytes
3. 学会等名 第62回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河田かずみ、青山絵理子、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 CCN2、CCN3とPDGFRLの軟骨細胞における生物学的作用へのHippo pathwayの関与
3. 学会等名 第62回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、明石 翔、堀 彩花、高柴正悟、上岡 寛、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞糖阻害剤NaFの線維化抑制効果とCCNファミリー遺伝子の関与
3. 学会等名 第62回日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hoang Dinh, L., Aoyama, E., Kubota, S., Kuboki, T., Takigawa, M.
2. 発表標題 S-adenosylmethionine positively modulates differentiation in chondrocytes via polyamine biosynthesis.
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬一樹、中田英二、服部高子、鉄永智紀、山田和希、佐藤嘉洋、桑原実穂、滝川正春
2. 発表標題 変形性肩関節症モデルとしてのCCN3過剰発現マウス
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原実穂、武内聡子、近藤 星、Fu Shanqi, 大野充昭、古松毅之、中田英二、滝川正春、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 CCN3は関節軟骨の加齢変性を促進する
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、明石 翔、河田かずみ、菊池 董、川木晴美、滝川正春、上岡 寛、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるRFX1を介したCCN3の発現制御機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬一樹、中田英二、服部高子、鉄永智紀、山田和希、佐藤嘉洋、桑原実穂、滝川正春、久保田聡、尾崎敏文
2. 発表標題 変形性肩関節症とCCN3発現上昇の相関について
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田 崇、薬師寺翔太、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 メトホルミンによるUCA1を介した軟骨保護作用の解析
3. 学会等名 第42回岡山歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田 崇、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 メトホルミンの軟骨細胞におけるUCA1誘導をともなった分化促進作用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河田かずみ、青山絵理子、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞におけるCCN2、CCN3とPDGFRLの生物学的作用におけるHippo pathwayの関与
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 星、服部高子、桑原実穂、Fu Shanqi、西田 崇、薬師寺翔太、吉岡洋祐、森谷徳文、飯田征二、滝川正春、久保田聡
2. 発表標題 メトホルミンによる非コードRNA誘導と軟骨細胞分化促進作用
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東原直裕、青山絵理子、古松毅之、久保田聡、尾崎敏文、滝川正春
2. 発表標題 軟骨細胞におけるGDF5とCCN2との結合の意義
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水川朋美、西田 崇、明石 翔、河田かずみ、菊池 董、川木晴美、滝川正春、上岡 寛、久保田聡
2. 発表標題 軟骨細胞における転写因子RFX1を介したCCN3の発現制御機構とその役割
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬一樹、中田英二、服部高子、鉄永智紀、山田和希、佐藤嘉洋、桑原実穂、滝川正春、久保田聡、尾崎敏文
2. 発表標題 変形性股関節症とCCN3発現の相関
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>口腔生化学分野  <a href="https://www.okayama-u.ac.jp/user/seika/index.html">https://www.okayama-u.ac.jp/user/seika/index.html</a></p>
---

## 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	西田 崇  (Nishida Takashi)  (30322233)	岡山大学・医歯薬学域・准教授    (15301)	
研究分担者	服部 高子  (Hattori Takako)  (00228488)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	高江洲 かずみ (河田かずみ)  (Takaesu Kazumi)  (10457228)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	青山 絵理子  (Aoyama Eriko)  (10432650)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	滝川 正春  (Takigawa Masaharu)  (20112063)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	
研究分担者	大野 充昭  (Ono Mitsuaki)  (60613156)	岡山大学・医歯薬学域・准教授    (15301)	

## 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