

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19647

研究課題名(和文) 1細胞レベルmRNA-ncRNA解析による骨芽細胞のその後の運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of osteoblast fate determination by single cell analysis on mRNA-ncRNA

研究代表者

吉子 裕二 (Yoshiko, Yuji)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：20263709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：シングルセルRNA-Seqによる非翻訳RNA(ncRNA)の遺伝子発現プロファイリングにより骨芽細胞の多様性・運命決定に関わるエピジェネティック制御の一端を明らかにすることを目指した。骨芽細胞でVenusを発現するレポーターマウスから陽性骨芽細胞を分離し、RNAの発現プロファイリングによるクラスタリングを行ったところ、4つのクラスターが得られた。このうち少なくとも1つは、最近我々が報告した既存の骨芽細胞とは異なる形質を持つ細胞集団と一致した。このクラスターの主要な3つのncRNAに着目し、in silicoの解析からこのクラスターの細胞は多分化能の性質を維持していることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨形成後の骨芽細胞は大部分死滅するが、一部は骨細胞へと最終分化し、長寿命を獲得して骨代謝を制御する。また、少数はlining cellとして骨表面に留まり、必要に応じて再び骨芽細胞となると考えられている。このように骨芽細胞はその運命決定において多様性を持つと考えられるが、その制御機構は不明である。骨芽細胞の解析は、これまではバルクが主流で、個々の骨芽細胞が着目されることはほとんどなかった。シングルセルレベルでの解析はこの問題解決のブレイクスルーとなる可能性があり、多様性の分子基盤が明らかになれば、学術的意義のみならず、骨の再生治療や様々な骨疾患の治療に新たな見識を提供することになる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate epigenetic regulation of the diversity and fate determination of osteoblasts. Single-cell RNA-Seq analysis of mouse osteoblasts isolated from reporter mice expressing Venus in osteoblasts was conducted to determine non-coding RNA (ncRNA) expression profiling. Clustering analysis of these RNAs identified a unique population of osteoblasts that was in good agreement with a cell cluster exhibiting unusual traits in our previous report. Three ncRNAs specifically expressed in this cluster were analyzed in silico, suggesting that osteoblasts in this cluster may maintain multipotency.

研究分野：硬組織

キーワード：骨芽細胞 多様性 運命決定 シングルセルRNA-Seq 非翻訳RNA 最終分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

骨形成を担う骨芽細胞の研究については国内外に多くの優れた研究成果があり、骨芽細胞への分化調節機構の詳細が解明されつつある。一方、骨芽細胞が最終分化した骨細胞や lining cells の機能が明らかになるにつれ、骨芽細胞のその後の運命決定が骨代謝に大きな影響をもたらすことがわかってきた。しかし、これまでに骨芽細胞のその後の運命の制御機構は解明されていない。我々はシングル RNA-Seq により骨芽細胞の多様性を明らかにした (ASBMR Plus, <https://doi.org/10.1002/jbm4.10496>)。この解析では、Col1a1 プロモーターで Lyn-Venus を発現するレポーターマウス (Lyn-Venus マウス) から Venus 陽性 (Venus<sup>+</sup>) 細胞を対象とした。これらの Venus<sup>+</sup>細胞は骨表面に分布し、骨芽細胞マーカー ALP を共発現することから、組織学的には骨芽細胞とされる。Venus<sup>+</sup>シングルセルの遺伝子発現をプロファイリングし、骨細胞への分化経路を擬似時間軸に沿って再構成すると、幹細胞マーカーである CD34 を発現する (CD34<sup>+</sup>) 骨芽細胞と、CD34<sup>-</sup>骨芽細胞に大きく分類することができた。後者はさらに複数のクラスターに分類された。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記クラスターをベースに (とくに CD34<sup>+</sup>骨芽細胞のクラスターに着目) ノンコーディング RNA (ncRNA) についての解析を行い、運命決定のエピジェネティック制御の一端を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

- (1) Lyn-Venus マウスを作製し、同マウス新生仔から骨芽細胞フラクションを採取後、FACS にて Venus<sup>+</sup>細胞のみを回収し、単一細胞レベルの RNA-Seq 解析を行う。
- (2) 同マウスの分離 Venus<sup>+</sup>細胞から分離した CD34<sup>+</sup>細胞の特徴を明らかにする。
- (3) ncRNA の発現プロファイルを作成し、in silico で機能解析を行う。
- (4) (3)に基づきノックアウト細胞株を作成し、増殖・分化能を解析する：特定遺伝子の選定が完了しなかったため中止。

## 4. 研究成果

シングルセル RNA-Seq で得られた Venus<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞は概ね既存の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現レベルが低いものの、一部の成熟骨芽細胞マーカーは比較的高値を示した。この細胞を FACS で回収し、培養下で骨分化誘導を行ったが、FACS によるダメージが大きく、十分な細胞数を確保できず、骨結節を形成するまでには至らなかった。そこで、Lyn-Venus マウス新生仔頭頂骨を用い、Venus<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞の局在、分布を確認したところ、同細胞は骨表面の一定領域において複数層を形成して分布していた (図 1)。

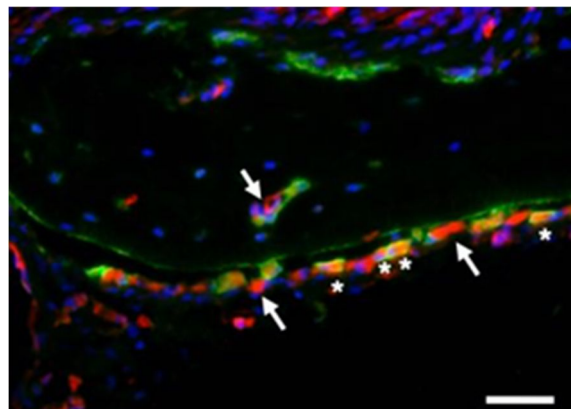


図 1. 28 日齢 Lyn-Venus マウス頭頂骨の免疫染色

赤 ( ) : Venus<sup>+</sup>細胞、緑 : 骨芽細胞、\* : Venus<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞、対比染色 : DAPI、スケールバー : 25 μm

RNA-Seq データから ncRNA のみを抽出し、プロファイリングしたところ、4つのクラスターに分類された (non-coding RNA のデータベース : GENCODE Release M23, [https://www.gencodegenes.org/mouse/release\\_M23.html](https://www.gencodegenes.org/mouse/release_M23.html) )。

図 2 は各クラスター上位 10 の ncRNA によるヒートマップを示す。また、発現レベル上位 3000 の殆どは long ncRNA ( lncRNA ) であった。lncRNA の大部分 ( 78% ) は

組織特異的であることが報告され

ており ( mRNA は 19% ) ( Genes Dev. 2011, 25 ( 18 ): 1915-1927 )、この中には、骨肉腫または骨芽細胞との関連が報告されているものも含まれていた ( 表 1 に 一部を示す )。

また、lncRNA の中には 1 つまたは複数の miRNA を包含しており、例えば、図 2 のクラスター 0 における Dnm3os は miR-199a, miR-199a, miR-214 を配列内に含む。同様にクラスター 3 での Mirg ( miR-379, miR-410 )、Mir99ahg ( miR-99a, miR-125b-2, let7c ) および H19 ( miR-675 ) は他のクラスターよりも発現レベル高値であった。Dnm3os

は miR-199 あるいは hmiR-214 非依存的に骨格形成に必須であることも報告されている ( Dev Dyn. 2008, 237 ( 12 ): 3738-3748; Cell Biosci. 2021, 11 ( 1 ): 47 )。

miRNA の「スポンジ」分子として機能することが知られている Meg3、Snhg14 あるいは Kcnq1ot1 もクラスターリングで特徴的なパターンを示した。mRNA を含むプロファイリングの擬似時間軸において他のクラスターと一線を画した図 3 のクラスター 4 に帰属する細胞は大部分 Cd34<sup>+</sup>細胞であり、これらはほとんどが図 2 のクラスター 3 に一致した。このクラスター 3 ( 図 2 ) において有意に高いレベルで発現している Meg3 ( Gtl2 ), Rian, Mirg は

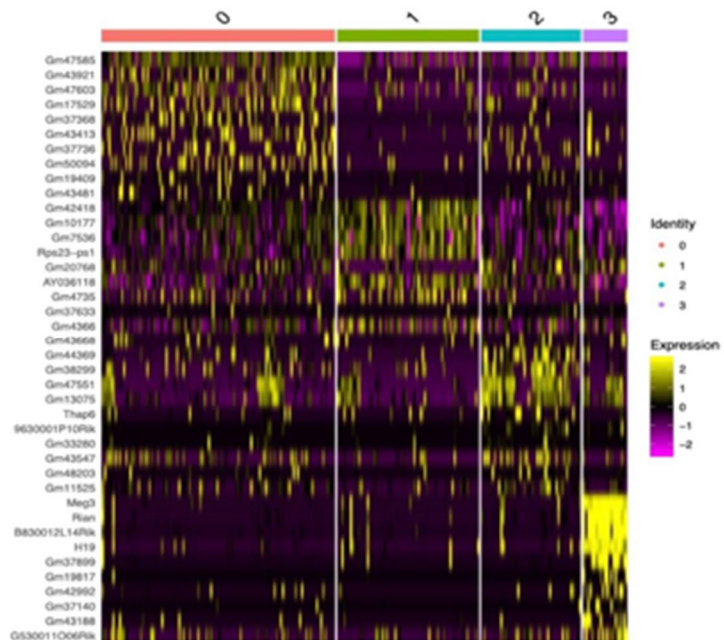


図 2. ncRNA によるクラスターリング

lncRNA	機能
Gas5	骨肉腫細胞増殖抑制/促進, 骨芽細胞分化促進
H19	骨肉腫形成抑制, 遊走・浸潤促進, 骨芽細胞増殖・分化促進
Kcnq1ot1	骨芽細胞分化促進, 破骨細胞分化抑制
Neat1	骨肉腫増殖・浸潤促進, 骨転移促進
Meg3	骨芽細胞分化促進/抑制, 骨肉腫促進/抑制
Mirg	破骨細胞分化促進
Snhg6	骨肉腫促進
Snhg14	骨肉腫促進, 骨芽細胞分化促進

表 1. シングルセル RNA-Seq により「上位にランキングされた lncRNA ( 一部 )

細胞多能性に寄与していることが知られており (Cell Rep. 2015, 12 (9): 1456-1470)  
図2のクラスター3および図3のクラスター4に属する細胞が、Col1a1陽性(骨芽細胞の性質を有する)にも関わらず多分化能を維持している可能性が示唆された。

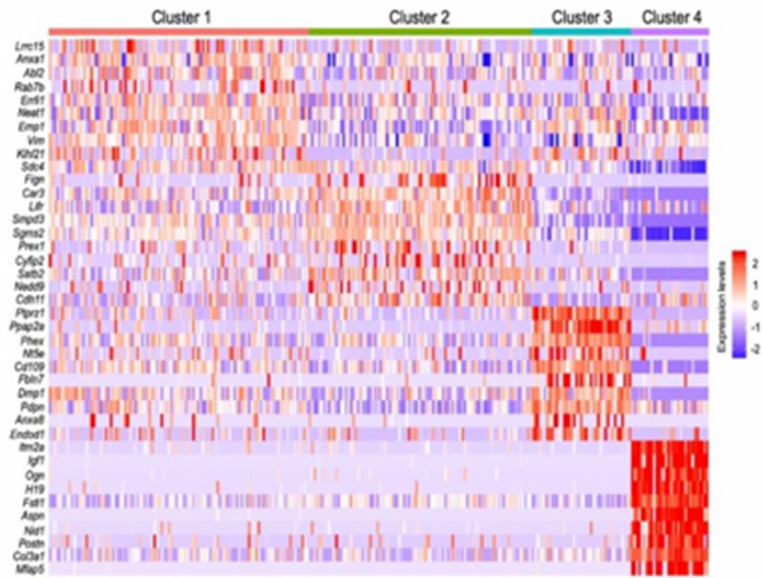


図3. Venus+骨芽細胞の遺伝子発現プロファイル (JBMR Plus, 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野将志, 吉岡広陽, 南崎朋子, 香西克之, 吉子裕二
2. 発表標題 シングルセル解析から見た骨芽細胞の多様性と脂肪細胞分化転換能
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Yoshiko
2. 発表標題 A new paradigm for bone turnover and its potential clinical implications
3. 学会等名 International Dental Scientific Conference and Expo, Dies Forum 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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		
フランス	Institut de Cancérologie de l' Ouest		
カナダ	University of Toronto		