

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19596

研究課題名（和文）時空間的トランスクリプトミクスによる骨格系幹細胞の運命決定機構の解明

研究課題名（英文）Identification and characterization of skeletal stem cells by spatio-temporal transcriptomics

研究代表者

波多 賢二（Hata, Kenji）

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496

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）：骨格系幹細胞は骨格形成の主体をなす軟骨細胞および骨芽細胞の起源となる細胞集団であるが骨格系幹細胞の細胞特性やそのマーカー遺伝子構については未だ不明な点が多く残されている。本研究では、シングルセルゲノミクスの解析技術を骨格系幹細胞の研究に応用し、骨組織の細胞集団を時空間的トランスクリプトミクスにより解析した結果、骨格系幹細胞と推定されるクラスターとその細胞集団に発現する遺伝子を同定した。さらに、これらの遺伝子は複数のWnt遺伝子の発現を促進していることを見出した。本研究より、骨格系幹細胞によるWntシグナルの制御が骨格形成に関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、最先端のシングルセルゲノミクスを駆使して、未だ解明されていない骨格系幹細胞の細胞特性の解明を目指す研究である。現在まで本研究のように骨格系幹細胞を時空間的に解析する研究アプローチは見られないことから、新規性の高い研究結果が得られると考えられる。骨格系幹細胞は骨格形成のみならず骨・軟骨再生における骨芽細胞/軟骨細胞の供給源であり、本研究で同定する骨格系幹細胞マーカー遺伝子は、骨・軟骨形成能の高い幹細胞の採取にきわめて有用である。したがって、本研究は骨・軟骨再生のための科学的基盤を創出し、骨・軟骨疾患治療にも貢献すると期待され、挑戦的研究としての波及効果は高い。

研究成果の概要（英文）：Skeletal stem cells are the cell population which are the origin of chondrocytes and osteoblasts and they play important roles in skeletal development. In this study, we applied single-cell genomic technology to the study of skeletal stem cells and analyzed the cell population of bone tissue using spatio-temporal transcriptomics. We performed scRNA-seq analysis using bone tissues and identified differentially expressed genes in the cluster of skeletal stem cells. Furthermore, we found that transcription factors specifically expressed in skeletal stem cells promote the expression of multiple Wnt genes. These findings suggest that skeletal stem cells regulate skeletal development through Wnt signaling.

研究分野：口腔生化学

キーワード：幹細胞 骨格形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎顔面を含むヒトの骨格形成においては、軟骨細胞の分化・増殖による長軸方向への骨の成長と、骨芽細胞による骨形成が中心的役割を担う。これら骨格形成の主体をなす軟骨細胞および骨芽細胞の起源となるのが骨格系幹細胞である。骨格系幹細胞は成長軟骨板、骨膜または骨髄中に存在することが報告されている。例えば、成長板軟骨では PTHrP 陽性細胞が骨格系幹細胞として機能していることが明らかとなっている(Mizuhashi et al 2028)。しかし、骨格系幹細胞の細胞特性やそのマーカー遺伝子、また幹細胞の維持に必要な微小環境である幹細胞ニッチの局在や制御機構については未だ不明な点が多く残されており、その解明が強く望まれている。

骨格系幹細胞の細胞特性や運命決定機構を分子レベルで解明するために、現在まで様々なアプローチで遺伝子発現解析(トランスクリプトミクス)が行われてきた。しかし、ヘテロな細胞で構成される骨組織からバルクとして RNA を回収し平均化する従来の解析では、骨格系幹細胞など少数の細胞集団の遺伝子発現を検出できない、遺伝子発現の空間的位置情報が失われるなど、骨格系幹細胞の解析を困難にする多くの課題が残されていた。

近年、1細胞レベルでゲノム解析を行うシングルセルゲノミクスの技術が発展し多くの研究に実装されている。シングルセル RNAseq (scRNAseq)では、1細胞ごとに RNA を回収し遺伝子発現パターンを比較することで、従来法では困難であった「細胞集団のクラスタリングとマーカー遺伝子の抽出」や、細胞分化の連続的な遷移プロセスを解析する「時間軸に沿った分化の軌道解析」が可能になった。空間的トランスクリプトミクス解析は、組織サンプルにおける全ての遺伝子活動を測定し、それがどこで行われているかを検出することで遺伝子の空間的情報を取得することが可能となっている。骨格系幹細胞は、骨格形成のみならず骨再生における骨芽細胞の供給源として重要な役割を演じていることから、骨格系幹細胞の研究は骨再生医療の研究領域の発展にも貢献すると期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、これらシングルセルゲノミクスの解析技術を骨格系幹細胞の研究に応用し、骨組織の細胞集団を scRNAseq によりクラスタリングすることで骨格系幹細胞のクラスターとマーカー遺伝子を同定し、その機能的役割の解明を行う。さらに、空間的トランスクリプトミクスと統合的に解析することで骨格系幹細胞の局在とその幹細胞ニッチの解明に挑戦した。

3. 研究の方法

Col11-enh-Cre マウスと ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen マウスを交配し、骨格系幹細胞、軟骨細胞および骨芽細胞が ZsGreen で標識された Col11-ZsGreen マウスを作製する。E15.0 の Col11-ZsGreen マウスの脛骨および大腿骨をコラゲナーゼ処理により 1細胞レベルまで分離した後、10xChromium システムを用いて scRNAseq を行う。次世代シーケンサーにより得られたデータを解析し骨格系細胞のクラスタリングとその特異的遺伝子を抽出した。

スライドの位置情報を含んだ DNA バーコードが Visium Gene Expression スライドに E15.0 マウス脛骨の凍結切片を貼付し、RNA の抽出と位置情報が紐付けされた cDNA ライブラリーの作製した。得られたライブラリーを解析し E15.0 マウス脛骨の空間的トランスクリプトミクス解析を行った。

4. 研究成果

(1) Col11-ZsGreen マウスの作製

骨格系細胞集団のシングルセル RNA-seq とクラスタリングを行うために、Col11-enh-Cre マウスと ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen マウスを交配し、骨格系幹細胞、軟骨細胞および骨芽細胞が ZsGreen で標識された Col11-ZsGreen マウスを作製した。Col11-ZsGreen マウスにおける ZsGreen の発現を検討す

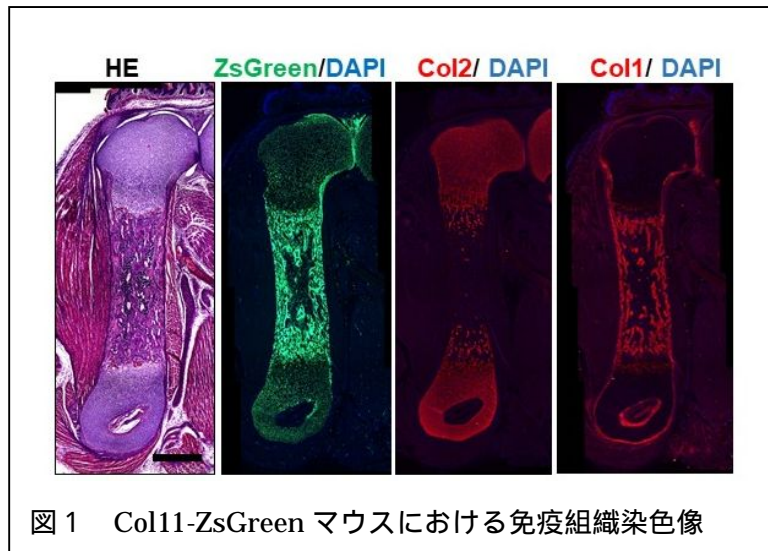


図1 Col11-ZsGreen マウスにおける免疫組織染色像

るために、軟骨内骨化が活発に骨を成長させている時期である生後 0 日齢および胎生期 15 日齢の大腿骨および脛骨を用いて組織学的解析を行った。その結果、ZsGreen は 型コラーゲン成長板軟骨だけでなく 型コラーゲン陽性の骨芽細胞においても発現していることが明らかとなった(図 1)。さらに胎生 15.5 日齢の骨格組織では、大腿骨と脛骨の間に存在し将来関節が形成されるインターゾーンに ZsGreen を強く発現する細胞集団が観察された。興味深いことに、インターゾーンには 型コラーゲンおよび 型コラーゲンのどちらか、または両方が陽性を示す細胞が存在しており、ヘテロな細胞集団で構成されていることが確認された以上の結果より、ZsGreen 陽性細胞は軟骨細胞、骨芽細胞および関節の前駆細胞を多く含むインターゾーン細胞を含むことが明らかとなった。

(2) Col11-ZsGreen マウス由来骨格系細胞のシングルセル解析

骨格系幹細胞、成熟骨芽細胞および軟骨細胞を多く含む胎生期 14 日目 (E14.5) の Col11-ZsGreen マウスの脛骨をコラーゲナーゼ処理により 1 細胞レベルまで分離した後、10xChromium システムを用いて scRNAseq を行った。次世代シーケンサーにより得られたデータを Seurat により解析し、骨格系幹細胞を含む全ての細胞のクラスタリングとその特異的遺伝子の抽出を行った。その結果、骨格系幹細胞と推察される細胞集団、未熟軟骨細胞から肥大化軟骨細胞まで分化段階の異なる 7 つの軟骨細胞集団、さらには 3 つの骨芽細胞集団と 1 つのインターゾーン細胞にクラスタリングすることが可能となった。そして、これらの細胞クラスターに特異的な遺伝子を抽出することでマーカー遺伝子の候補となる遺伝子をクローニングした。

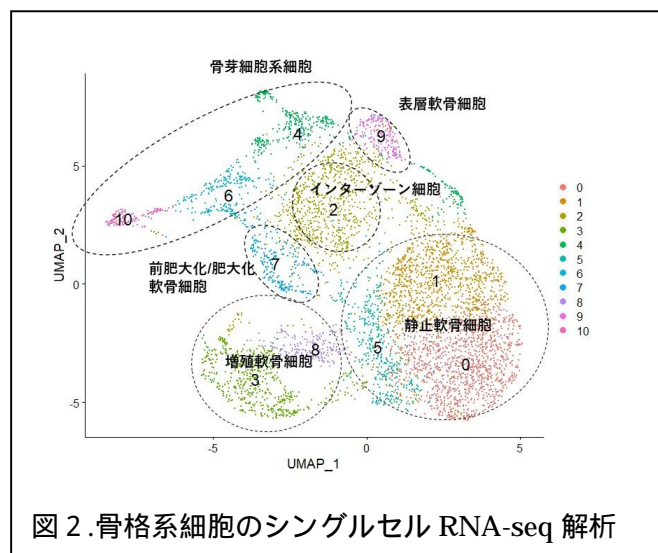


図2.骨格系細胞のシングルセル RNA-seq 解析

Mizuhashi らは成長板軟骨では PTHrP 陽性細胞が骨格系幹細胞として機能していることを報告していることから (Mizuhashi et al 2028)、本研究では PTHrP が特異的に発現する細胞クラスター

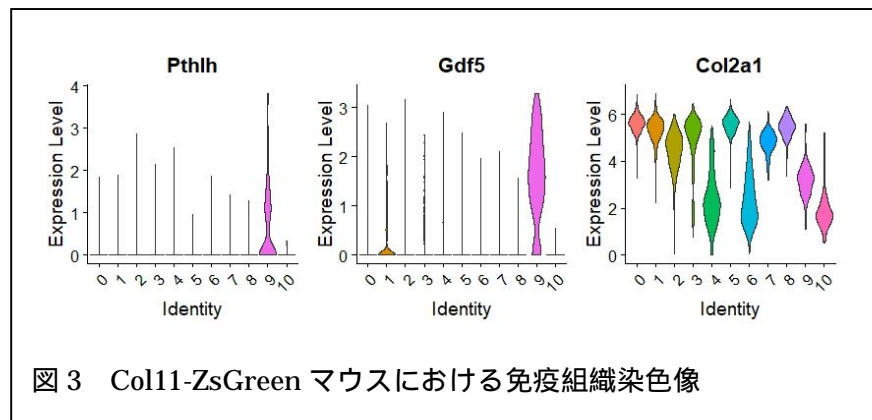


図3 Col11-ZsGreen マウスにおける免疫組織染色像

に着目し検討を行った。PTHrP(Pthlh)はクラスター9に高発現が認められる一方で、軟骨細胞分化マーカー遺伝子である Col2a1 の発現は軟骨細胞クラスターに比較して低かった。さらに興味深いことに、このクラスターには関節組織の Progenitor 細胞のマーカー遺伝子である Gdf5 も特異的に高発現していた(図3)。以上の結果より、クラスター9に含まれる遺伝子は成長板軟骨ならびに関節軟骨の起源となる骨格系幹細胞を多く含む可能性が示唆された。

(3) 成長板軟骨の空間的トランスクリプトミクス解析

次に Col11-ZsGreen マウス由来骨格系細胞のシングルセル解析 2022 年度は 10xGenomics 社によってプラットフォーム化され市販されている Visium 空間的遺伝子発現解析システムを用いて空間的トランスクリプトミクスを中心に解析を行った。まずはじめに E14.5 マウス脛骨の凍結切片から、スライド上の DNA スポットへ RNA を抽出するための細胞透過酵素の反応時間を検討し、酵素処理時間を 60 分とした。そして、Visium Gene Expression スライドに E14.5 マウス脛骨の凍結切片を貼付し、スライドの位置情報を含んだ DNA バーコードを持ったライブラリーが作製される。得られたライブラリーを 3 億ペアリード/サンプルで解析し、10X Genomics のソフトウェアである Space Ranger 解析パイプラインと LoupeBrowser による可視化を行い、E14.5 マウス脛骨の遺伝子発現マップを作製した。その結果、脛骨の細胞群を遺伝子発現により 9 つの細胞クラスターに分類することに成功した。そして、筋肉組織および皮膚組織を除外し骨組織のみを指定し再クラスタリングを行うとともに、細胞クラスターを脛骨の組織切片と比較し空間的情報とをオーバーラップさせた。最終的に、成長板軟骨の骨端部に骨格系幹細胞と推測される細胞集団を見出した。これらの細胞クラスターに特異的な遺伝子を抽出したところ、Gdf5 が同定されシングルセル RNA-seq において骨格系幹細胞と推測された遺伝子群と一致していた。

(4) 骨格系幹細胞に特異的な遺伝子の機能解析

最後に研究(3)および(4)から明らかとなった骨格系幹細胞に重要な遺伝子が骨格形成過程において構築する遺伝子ネットワークの解明を行った。骨胎生期 E11.5 日齢のマウス肢芽より採取した肢芽間葉系細胞に骨格系幹細胞に重要な遺伝子を過剰発現させたのち RNA を回収し RNAseq を行った。その結果、骨格系幹細胞に特異的な遺伝子は Wnt3、Wnt4、Wnt7a、Wnt7b および Wnt10a といった Wnt ファミリー遺伝子の発現を促進することが明らかとなった。また、GO biological process を対象としたエンリッチメント解析においても Cell Cell signaling by Wnt や Canonical wnt signaling pathway といった Wnt シグナル経路が促進していた。したがって、本研究で明らかにした骨格系幹細胞の維持に重要な遺伝子は Wnt シグナルを介して骨格形成に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahata Yoshifumi, Hagino Hiromasa, Kimura Ayaka, Urushizaki Mitsuki, Yamamoto Shiori, Wakamori Kanta, Murakami Tomohiko, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulatory Mechanisms of Prg4 and Gdf5 Expression in Articular Cartilage and Functions in Osteoarthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4672 ~ 4672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23094672	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 Takahata Yoshifumi, Hagino Hiromasa, Kimura Ayaka, Urushizaki Mitsuki, Kobayashi Sachi, Wakamori Kanta, Fujiwara Chika, Nakamura Eriko, Yu Kayon, Kiyonari Hiroshi, Bando Kana, Murakami Tomohiko, Komori Toshihisa, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 4
2. 論文標題 Smoc1 and Smoc2 regulate bone formation as downstream molecules of Runx2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1199-1209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02717-7	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 Nakamura Eriko, Hata Kenji, Takahata Yoshifumi, Kurosaka Hiroshi, Abe Makoto, Abe Takaya, Kihara Miho, Komori Toshihisa, Kobayashi Sachi, Murakami Tomohiko, Inubushi Toshihiro, Yamashiro Takashi, Yamamoto Shiori, Akiyama Haruhiko, Kawaguchi Makoto, Sakata Nobuo, Nishimura Riko	4. 巻 4
2. 論文標題 Zfhx4 regulates endochondral ossification as the transcriptional platform of Osterix in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1258-1268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02793-9	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hata K, Kobayash S, Takahata Y, Murakami T, Nishimura R
2. 発表標題 Identification of Chondrocyte-specific Sox9 Enhancers Important for Skeletal Development
3. 学会等名 Japan Bone Academy 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hata K
2. 発表標題 Transcriptional control of skeletal development
3. 学会等名 第20回松山国際学術シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Hata, K. Ono, E. Nakamura, S. Kobayashi, Y. Takahata, T. Murakami, R. Nishimura.
2. 発表標題 Dmrt2 promotes transition of endochondral ossification by linking Sox9 and Runx2
3. 学会等名 2021 ECTS Digital Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 紗知, 波多 賢二, 高畑 佳史, 村上 智彦, 高野 洋志, 八尾良司, 鶴澤 成一, 西村 理行
2. 発表標題 軟骨細胞におけるSox9遺伝子の発現制御機構の解明
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 紗知, 波多 賢二, 高畑 佳史, 村上 智彦, 西村 理行
2. 発表標題 軟骨細胞におけるSox9遺伝子のエンハンサー領域の同定と機能解析
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 S. Kobayashi, K. Hata, Y. Takahata, T. Murakami, N. Uzawa, R. Nishimura
2. 発表標題 Identification of Chondrocyte-specific Sox9 Enhancers Important for Skeletal Development
3. 学会等名 米国骨代謝学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 波多賢二	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 667
3. 書名 最新の骨粗鬆症学（第二版）「サイトカイン」	

〔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
研究分担者	宇佐美 悠 (Usami Yu) (80444579)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	

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