



Title	シングルセルゲノミクスによる成長板軟骨細胞の多様性・階層性の解明
Author(s)	山村, あかね
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91870
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

シングルセルゲノミクスによる成長板軟骨細胞の
多様性・階層性の解明

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻
口腔分子免疫制御学講座（生化学教室）

山村 あかね

I 緒言

脊椎動物において、軟骨組織は胎生期から成体まで多様な機能を担う主要な運動器の一つである。成体においては永久軟骨として関節や鼻中隔などの組織に存在し、運動器の潤滑な動きと荷重吸収、さらには組織構造の維持などにおいて重要な役割を担う(1)。一方、胎生期において軟骨細胞は骨格のテンプレートとなる軟骨原器を形成することで骨を形成し、成長期では成長板軟骨として骨の長軸方向への伸長を担うことで骨を成長させる。この軟骨細胞による骨格形成機構は軟骨内骨化と呼ばれ、ヒトにおいては、椎骨、肋骨、四肢の長管骨など大部分の骨格形成を担う(2,3)。顎顔面骨格形成においても軟骨細胞は重要な役割を演じており、下顎頭軟骨は顎関節の機能に、鼻中隔軟骨や脳頭蓋底に存在する蝶形篩骨軟骨、蝶形骨間軟骨、蝶形後頭軟骨および後頭骨間軟骨は中顔面の形成に重要である(4,5)。そして、遺伝的要因による軟骨細胞の機能不全は軟骨無形成症をはじめとする重篤な骨格形成不全の原因となり、歯科領域においても頭蓋底部軟骨結合の成長が障害されることによる上顎骨劣成長とそれに伴う反対咬合などを引き起こす(6,7)。したがって、様々な遺伝性骨格疾患の病態を理解し治療へと応用するためには、骨格形成を制御する軟骨内骨化の分子メカニズムを解明することが重要なアプローチとなる。

軟骨細胞は、骨芽細胞と同様に、肢芽を形成する中胚葉(mesoderm)および顔面骨を形成する神経堤(neural crest cells)から発生する間葉系幹細胞をその起源とする(8)。間葉系幹細胞の中でも骨芽細胞、軟骨細胞および骨髄間質細胞など骨格形成に重要な細胞への分化能を有する幹細胞は骨格系幹細胞(skeletal stem cell)と呼ばれ、生涯にわたって骨格の形成や維持に関与する(9,10)。間葉系幹細胞は将来的に軟骨原基が形成される部位に凝集する間葉系細胞凝集が引き金となって軟骨細胞への分化を開始する(2,3)。軟骨細胞の細胞系譜へとコミットした未熟軟骨細胞は、骨端側から骨の中心部に向かって、表層軟骨細胞、球状の形態をした静止軟骨細胞、扁平な形態の増殖軟骨細胞へと分化した後に増殖を停止させ、前肥大化軟骨細胞、巨大な肥大化軟骨細胞へと連続的な分化を遂行する(2,3)。この一連の軟骨細胞分化は骨の伸長方向に向かって行われるため、成長板軟骨では表層軟骨細胞から肥大化軟骨細胞に向かって、分化段階の異なる軟骨細胞が柱状に並ぶ特徴的な階層構造を示す(2,3)。そして、成熟した肥大化軟骨細胞は軟骨基質の石灰化を経てアポトーシスに陥り、血管侵入に続く破骨細胞前駆細胞ならびに骨芽細胞前駆細胞の出現により骨組織へと置換される(2,3)。軟骨内骨化の最

終段階において機能する骨芽細胞前駆細胞の起源として、軟骨膜に存在する骨格系幹細胞が骨芽細胞へと分化する経路 (11,12)と、肥大化軟骨細胞から骨芽細胞へと直接的に細胞転換する経路 (13,14)の2つが報告されている。

成長板軟骨の特徴の一つである連続的な細胞分化は、軟骨細胞の形態学的な変化のみならず、ダイナミックな遺伝子発現の変動を引き起こす。軟骨細胞は分化段階に応じて特異的なマーカー遺伝子を発現することが知られており、その遺伝子発現は緻密に制御されている。静止軟骨細胞と増殖軟骨細胞では、II型コラーゲン (*Col2a1*) (15)、XI型コラーゲン (*Col11a2*) (16)およびアグリカン(*Acan*) (17)が、前肥大化軟骨細胞では Indian hedgehog (*Ihh*) (18)および Parathyroid hormone (PTH) 受容体が (19)、肥大化軟骨細胞ではX型コラーゲン (*Col10a1*) (20)および Matrix metalloprotein13 (*Mmp13*) (21)が特異的に発現する。

一方、成長板軟骨の一部は永久軟骨として骨端に残存し関節を形成する。将来的に関節が形成される部位は、軟骨原基の内部に形成される細胞密度の高い領域、すなわちインターゾーンによって決定される (22)。胎生期に出現するインターゾーン細胞は軟骨原基を分断しながら二本の骨とそれらを連結する関節を形成する。インターゾーン細胞の特異的なマーカー遺伝子として Growth differentiation factor5 (*Gdf5*)が報告されているが、その発現は関節形成の初期段階における一過的なものであり、マウスの膝では胎生 15 日から GDF5 の発現は減弱していく (23)。しかし、*Gdf5* 陽性細胞は *Gdf5* 発現が消失した後もインターゾーンにおいて分化・増殖し、関節軟骨、十字靱帯および半月板などの関節構成体を形成する (24)。

これらの軟骨細胞の分化マーカーとなる遺伝子群は分化段階に特異的な転写因子によって直接制御されている。例えば静止軟骨細胞および増殖軟骨細胞においては、SRY-box transcription factor (*Sox*)ファミリーに属する転写因子 *Sox9* とその転写コファクター *Sox5* および *Sox6* が特異的に発現し、*Col2a1* (25), *Col11a2* (26)および *Acan* (27)のエンハンサー領域に直接結合することでその遺伝子発現を促進している。一方、肥大化軟骨細胞では *Runx2* および *Sp7/Osterx* が *Ihh* (28), *Col10a1* (29)および *Mmp13* (30)の遺伝子発現を制御している。しかし、*Sox9* による静止軟骨細胞および増殖軟骨細胞、ならびに *Runx2* および *Sp7* による肥大化軟骨細胞の分化や機能制御については上記の通り多くの研究がなされてきているが、増殖軟骨細胞から肥大化軟骨細胞への移行期に存在する前肥大化軟骨細胞については未だ解明すべき点が多く残されている。例えば、前肥大化軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子として認知されているのは *Ihh* と PTH 受

容体だけであり、前肥大化軟骨細胞に特異的に発現する他のマーカー遺伝子やその発現制御機構はほとんど解明されていない。さらに、上記の転写因子だけで骨格形成の分子メカニズムを説明することは不可能であり、軟骨細胞分化を俯瞰的に捉えその連続性や階層性を制御する分子メカニズムの解明が強く望まれている。

成長板軟骨細胞の分子メカニズムが未だ解明に至っていない理由の一つとして、従来の遺伝子発現解析法の技術的限界があげられる。これまで行われてきた遺伝子発現解析法は、ヘテロな細胞集団からなる成長板軟骨細胞を一つのバルクとして取り扱い、個々の細胞の遺伝子発現を全ての細胞で平均化することで評価している (31)。そのため、希少な細胞集団の遺伝子発現を検出することが不可能であり、複数の細胞集団から構成される軟骨細胞の多様性を解明することが困難であった。一方、近年の解析技術の進歩により個体や組織を一細胞レベルにまで分解し、解析するシングルセルゲノミクスが開発され、多くの研究に実装されている。その一つであるシングルセル RNA シークエンス(scRNA-seq)は、バルクではなく数千個におよぶ細胞個々の遺伝子発現プロファイルを検出し、数理的解析と組み合わせることで、遺伝子発現を一細胞レベルで網羅的に解析する技術である (32)。一細胞レベルでの解析は、従来の解析技術では困難であった細胞多様性の可視化と遺伝子発現に基づく細胞クラスタリング、さらにはバルク解析では検出できなかった少数細胞集団の特定とその特異的遺伝子を同定することを可能にする (33)。この遺伝子発現に基づく細胞集団の分類は、形態学的特徴では見出せない遺伝子レベルでの細胞不均一性を明らかにすることも可能である。さらには、遺伝子発現プロファイルの類似性をもとに疑似時間を仮定することで、連続的な細胞状態の遷移プロセスを再現することも可能である (34,35)。したがって、分化段階の異なるヘテロな細胞集団である成長板軟骨細胞の多様性や階層性を分子レベルで明らかにするためには、scRNA-seq を応用したシングルセル解析が有効な研究アプローチになると考えられる。

そこで本研究では、成長板軟骨細胞のシングルセル解析を行い、軟骨細胞の多様性、階層性を遺伝子レベルで解明するとともに、得られた知見を骨格形成の分子基盤と遺伝性骨格疾患の病態理解へと発展させることを目的に研究を行った。

II 材料と方法

1. 軟骨細胞レポーターマウスの作製

軟骨細胞特異的に *Cre* 遺伝子を発現することが報告されている *Col11a2-enh-Cre* マウス (36)は, 大阪大学大学院生命機能研究科組織生化学教室の妻木範行教授より供与を受けた。*ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen* マウス (37)はジャクソンラボラトリーより入手した。ジェノタイピングに用いた PCR プライマーを表 1 に示す。*Col11a2-enh-Cre* マウスと *ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen* を交配させて *Col11-ZsGreen* マウスを作出した。*Col11-ZsGreen* は蛍光実体顕微鏡(Leica Microsystems 社 M205FA)により確認した遺伝子組み換えマウスを用いた実験は, 大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会 (承認番号:3852-1) ならびに歯学研究科動物実験委員会(承認番号:動歯-31-005-0)の審査・承認を得て行った。すべてのマウス実験は大阪大学動物実験規定に基づいて実施した。

2. 免疫組織染色

Col11-ZsGreen マウスから下肢を採取したのち, 4%パラホルムアルデヒドに 4°C 一晚浸漬固定後, 通法に従ってパラフィン包埋し, 厚さ 5 μ m の切片を作成した。得られた組織切片は, 脱パラフィン処理後, 2.5%ヒアルロニダーゼ/PBS を用いて 37°C, 30 分の抗原賦活化処理を行った。その後, 1%ウシ血清アルブミンでブロッキングし, 一次抗体として抗 Type II コラーゲン抗体(Chondrex, #7050, 1:500, Woodinville, WA, USA)ならびに抗 Type I コラーゲン抗体(#AB765, Merck Millipore, Burlington, MA, USA)を用いて 4°C にて一晚静置した。二次抗体として Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と結合した抗ラビット IgG 抗体を反応させた後に, VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) にて核を染色し封入した。

3. シングルセル RNAseq (scRNA-seq)

①ZsGreen 陽性軟骨細胞の単離

Col11a2-enh-Cre マウスと *ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen* マウスを交配させ, 胎生 15 日齢の *Col11-ZsGreen* マウスより上肢および下肢を摘出し, 0.25 %コラゲナーゼ Type2 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) を含む DMEM にて 37°C ,2 時間酵素処理により 1 細胞に単離した。40 μ m ナイロンメッシュ (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) で濾過した後, 濾過液中の細胞を遠心し 1 $\times$ 10⁷ 個/ml

PBS に調整した。細胞懸濁液から BD FACS Aria セルソーター (Becton-Dickinson, NY, USA) を用いて ZsGreen 陽性のみを回収し、シングルセル解析に用いた。

②シングルセル RNA-seq(scRNA-seq)

1 細胞に単離した ZsGreen 陽性細胞は 10X Chromium システム(10x Genomics, Pleasanton, CA, USA)を用いて解析を行った。ZsGreen 陽性細胞を、Chromium Controller にてビーズ毎にユニークなバーコード配列を有するプライマー付きのビーズおよび逆転写酵素とともにドロップレットに封入し、シングルセルエマルジョン液滴 (GEM:Gel Bead-in-emulsion) を作製する。その後、GEM 内で逆転写 1st Strand cDNA 合成を行い、1 細胞ごとにユニークなバーコードが付加されたシングルセルライブラリーを調整した。シングルセルライブラリーは NovaSeq6000(Illumina, San Diego, CA, USA)を用いてシーケンスを行った。

4. scRNAseq データ解析

得られたシーケンスデータは図 1 に示すワークフローにしたがって、Cell Ranger 7.1.0 による一次解析と Seurat 4.0 による二次解析を行った。まず cellranger mkfastq により FASTQ ファイルを作製し(コマンド `$cellranger mkfastq --id=[name] --run=[name] --csv=SampleSheet.csv`), cellranger count によるフィルタリング, マッピング, UMI(Unique Molecular Identifier) カウントを行い, 遺伝子発現 Matrix(raw_feature_bc_matrix.h5)として抽出した(コマンド `$ cellranger count [name] [options] --id <id> --transcriptome <PATH>`)。

遺伝子発現マトリックスとして得られた scRNAseq データは Seurat 4.0 (38)により解析した。まずはじめに raw_feature_bc_matrix.h5 を Seurat object に変換し(コマンド `$Col11ZS_raw.data <- Read10X_h5("raw_feature_bc_matrix.h5")`), 発現遺伝子数 (200 以上 6000 以下) とミトコンドリアリード率 (5%以下) による細胞のフィルタリング (コマンド `$ Col11zs_raw <- subset(Col11zs_raw, subset=nFeature_RNA> 200 & nFeature_RNA< 6000 & percent.mt < 5)`), ならびに細胞ごとの総 UMI 数が 10,000 に統一する正規化を行った(コマンド `$ Col11zs_raw <- NormalizeData(Col11zs_raw, normalization.method = "LogNormalize", scale.factor = 10000)`)。その後、主成分分析 (PCA: Principal Component Analysis)による次元削減に用いる次元数を決定し (コマンド `$ Col11zs_raw <- RunPCA(Col11zs_raw, features = VariableFeatures(object = Col11zs_raw))` print(Col11zs_raw[["pca"]], dims = 1:5, nfeatures = 5), UMAP (Uniform

Manifold Approximation and Projection) による二次元プロットを行った (コマンド \$ Col11zs_raw <- RunUMAP(Col11zs_raw, dims = 1:19))。最後に、各クラスターで発現が変動している遺伝子を抽出した (コマンド \$ Col11zs_raw.markers <- FindAllMarkers(Col11zs_raw, only.pos = TRUE, min.pct = 0.25, logfc.threshold = 0.25) \$ Col11zs_raw.markers %>% group_by(cluster) %>% top_n(n = 2, wt = avg_logFC)。

5. *In Situ* ハイブリダイゼーション

胎生 15.5 日齢マウスより脛骨を採取したのち、4%パラホルムアルデヒドに 4°C 一晚浸漬固定後、通法に従ってパラフィン包埋し、厚さ 6μm の切片を作成した。得られた組織切片は、脱パラフィン処理、プロテアーゼ処理、アセチル化処理を行った後、Pre-Hybridization バッファー(50% Gormamide, x5 SSC, 0.5mg/ml Heparin, 0.2mg/ml torula yeast RNA)で前処理 (65°C, 30 分) を行った。その後、*lhh*, *Uts2b*, *Baiap2l2*, *Mpz*, *Serinc5*, *Efemp1* および *Ttll3* に特異的な Dig 標識 RNA プローブを、50ng/100ul ハイブリダイゼーションバッファー(G-Hybo, ジェノスタッフ株式会社, 東京)となるように希釈し、ハイブリダイゼーション (65°C, 一晚) を行った。各遺伝子の検出に用いた標的配列および RNA ポリメラーゼを表 2 に示す。*lhh* の RNA プローブ作製用に用いたプラスミドは小守壽文教授 (長崎大学生命医科学講座) より供与を受けた (28)。遺伝子特異的 RNA プローブをハイブリダイズしたサンプルは、洗浄液 1 (50% ホルムアミド/2×SSC pH7.0, 65°C 30 分×3 回), 洗浄液 2 (2×SSC pH7.0, 65°C 20 分×1 回), 洗浄液 3 (0.2×SSC pH7.0, 65°C 20 分×2 回) で洗浄したアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識された抗 Dig 抗体 (1:2500, Sigma) と反応させ、ALP の基質である NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride, Roche) および BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Roche) を用いた発色反応により目的遺伝子を検出した。

6. マイクロマス培養

肢芽細胞の採取および培養はマイクロマスカルチャー法を用いて行った (39)。すなわち、胎生 12 日齢の ICR マウス (日本 SLC, 静岡) の肢芽を実体顕微鏡下において分離し、0.2%コラゲナーゼ Type2 (Worthington Biochemical Corporation) を含む DMEM にて 37°C 20 分酵素処理を行った。消化後、セルストレーナーで濾過し、濾過液中の細胞を遠心して、肢芽細胞を単離した。細胞濃度が 2×10⁷ 細胞/ml になるよう 10 % ウシ胎仔血清を含む DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) を追加し、5 % 二酸化炭素気相

下で 120 分間培養した後, 10 % ウシ胎仔血清を含む DMEM をさらに追加した。培養液を 3 日後に交換し, 6 日後に 50 µg/mL ascorbic acid and 10 mmol/L β-glycerophosphate を添加した 10 % ウシ胎仔血清を含む α-MEM (Sigma) に交換した。

7. 初代培養軟骨細胞

マウス初代培養軟骨細胞の分離は, Thirion (40)らの方法を一部改良して行った。生後 0 日齢 ICR マウス (日本 SLC, 静岡) より肋軟骨を採取し, 0.25 % コラゲナーゼ Type2 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) を含む DMEM にて 37°C 1 時間酵素処理により軟組織を除去した。その後, 軟組織を除去した肋軟骨を 0.25 % コラゲナーゼ Type2 を含む DMEM 中で, 1 時間ごとに Vortex で攪拌しながら 37°C 6 時間酵素処理を行った。細胞分散液は, 40 µm ナイロンメッシュ (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) で濾過し, 濾過液中の細胞を遠心して, マウス初代培養軟骨細胞として単離した。細胞は, 10%FBS を含む α-MEM (Sigma) 中において 37 °C, 5 % 二酸化炭素気相下で培養した。

8. 細胞培養

マウス胚性腫瘍由来細胞株 ATDC5 ならびにマウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 は理研細胞バンク (茨城) より購入した。ATDC5 細胞は, 10 % ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum; FBS, JRH Bioscience, Lenexa, KA, USA) を含む D-MEM / Ham's F-12 培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 中で, C3H10T1/2 は 10%FBS を含む DMEM (Sigma) 中で, 37°C, 5 % 二酸化炭素気相下で培養した。ATDC5 細胞は 5 % ウシ胎仔血清を含む DMEM:F12(1:1)培地 (Sigma) で培養し, インスリン 5 µg/mL, トランスフェリン 5 µg/mL, 亜セレン酸ナトリウム 5 ng/mL (Sigma; ITS)存在下で培養することにより軟骨細胞分化を誘導した。

C57BL/6 マウス由来 間葉系幹細胞(MSC:Mesenchymal Stem Cells)は, cyagen 社 (Santa Clara, CA, USA)より購入した (カタログ番号:MUBMX-01001)。間葉系幹細胞は 10 % ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地 (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて 37 °C, 5 % 二酸化炭素気相下で培養し, 継代 2 回目以内の細胞を実験に用いた。

9. Serinc5 レンチウィルスの作製

マウス Serinc5 cDNA プラスミドを GenScript 社から購入した。KOZAK 配列なら

びに制限酵素サイトを付与したプライマーを用いて Serinc5 cDNA を PCR で増幅し、SIN 型レンチウイルスベクター pLentiCMV-puro(TAKARA BIO INC., 滋賀)にライゲーションした(pLVSIN-Serinc5)。pLVSIN-Serinc5 を pLentiviral High Titer Packaging Mix (TAKARA BIO)とともに LentiX-293T 細胞にトランスフェクションし、72 時間後に培養上清をレンチウイルスとして回収した。

10. 細胞増殖アッセイ

Serinc5 レンチウイルスまたは Empty Vector レンチウイルスを感染させた初代培養軟骨細胞を(5,000 個/well)を 96 穴プレートに播種し、24 時間後にメディウムを交換し、0, 24, 48 時間培養した。細胞増殖試薬(WST-1 ; Roche Holding AG, Basel, Switzerland)を用いてプロトコールに従い発色させ、マイクロプレートリーダー(Model 550 ; Nippon Bio-Rad Laboratories, 東京)を用いて吸光度を測定した。

11. Real-time Polymerase Chain Reaction (real time PCR)

細胞を PBS にて 2 回洗浄した後、NucleoSpin RNA Plus Kit (Macherey Nagel, Duren, Germany)を用いて全 RNA を精製した。回収した全 RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, 大阪, 日本)を用いてゲノム DNA の除去ならびに逆転写反応を行い、cDNA を合成した。遺伝子発現は、Taqman PCR protocol にしたがって Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)を用いて遺伝子ごとに検量線を作製することで定量化し、内在性コントロール遺伝子として β -アクチンを使用した。Real time PCR に使用した Taqman プローブおよびプライマーを表 3 に示す。

12. リコンビナント BMP2 の作製

ラット BMP2 cDNA を組み込んだ発現ベクターを Lenti-X 293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に培養液を 10%FBS 含有 DMEM に交換した。さらに 48 時間後に Lenti-X 293T 細胞培養液を回収し、フィルター滅菌した培養上清をリコンビナント BMP2 として実験に用いた。

13. ウェスタンブロッティング

細胞を PBS で洗浄後、RIPA バッファー(50mM Tris-HCl Buffer(pH7.6), 150mM NaCl,

1% Nonidet P40 Substrate, 0.5% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, ナカライテスク株式会社, 京都)にプロテアーゼ阻害剤カクテル(ナカライテスク株式会社, 京都)を加えた細胞溶解液にて溶解し, 4°C で 10 分間回転混和した後, 4°C, 15,000rpm で 15 分間遠心し, 上清に試料用緩衝液(2ME を添加した Sample Buffer Solution ; 0.125M Tris-HCl, 4w/v% SDS, 20w/v% Glycerol, 0.002w/v% Bromophenol Blue, 10vol% 2-Mercaptoethanol pH6.8, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)を加え, 無処理のサンプル並びに熱溶解(95°C, 5 分間)したサンプルを作製した。サンプルを 10%SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法により分離し, ニトロセルロースメンブレンに転写後, 熱処理したサンプルは一次抗体としてマウス抗 β -Actin 抗体(1:1000, #M177-3, MBL ライフサイエンス, 名古屋)およびラビット抗 Sox9 抗体(1:500, #AB5535, Merck Millipore)と 4°C で一晩反応させた。熱処理していないサンプルは, ラビット抗 Serinc5 抗体(1:5000, #ab204400, Abcam, Cambridge, UK) と 4°C で一晩反応させた。二次抗体として抗マウス IgG 抗体(1:10000, cat. no. 330, MBL ライフサイエンス, 名古屋), 抗ラビット IgG 抗体(1:5000, cat. no. 458, MBL ライフサイエンス)と反応させた。イムノスターLD (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)を用いて発光シグナルを増幅した後, X 線フィルム(Kodak, NY, USA)に現像した。

14. ATAC-seq

ATAC-seq は Buenrostro (41)らの方法に従って行った。初代培養軟骨細胞ならびに間葉系幹細胞をトリプシン-EDTA を用いて培養ディッシュから剥離し, 500g で 5 分間遠心分離を行った後, 冷 1×PBS を用いて洗浄した。細胞を 50,000 個/500 μ l PBS に調整し 500g で 5 分間遠心分離した後に上清を捨て, 溶解バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ and 0.1% IGEPAL CA-630) 用いて細胞を溶解させた。溶解後すぐに 500g で 10 分間の遠心分離を行い, ペレットを細胞核とした。細胞核にトランスポザーゼ反応ミックス (25 μ L 2×TD buffer, 2.5 μ L transposase (Illumina), 22.5 μ L nuclease-free water) 加えて 37°C で 30 分間処理した。トランスポーズ反応を行ったサンプルは, NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Marcherey Nagel) を用いて精製した。精製後, 1×NEBnext PCR master mix と 1.25 μ M の PCR プライマー

Ad1_noMX (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCGTCGGCAGCGTCAGATGTG-3') および Ad2.1_TAAGGCGA (5'-CAAGCA GAAGACGGCATACTGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT-3')を用いて,

72 °C 5 分, 98 °C 30 秒, [98 °C 10 秒, 63 °C 30 秒, 72 °C 1 分]×10 サイクルの PCR 反応を行った後, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up で精製したサンプルを ATAC-seq 用ライブラリーとした。ATAC-seq 用ライブラリーから TruSeq ChIP Sample Prep Kit(Illumina)を用いて次世代シーケンサー用ライブラリーを作製し, Illumina HiSeq 2500 を用いてリード長 100bp, ペアエンド, 2,000 万リードペアで解析した。

15. クロマチン免疫沈降(ChIP : Chromatin Immunoprecipitation)

クロマチン免疫沈降を行うために, まず Covaris truChIP® Chromatin Shearing Kit を用いてゲノムの断片化を行った。初代培養軟骨細胞を冷 PBS で洗浄した後, 1 %メタノール非含有ホルムアルデヒド (Thermo Scientific) を用いて DNA/タンパク質結合をクロスリンクさせた。その後, 細胞溶解液を用いて細胞核を抽出し, Shearing Buffer に懸濁したサンプルを Covaris Focused-ultrasonicator M220 を用いて 7°C, Duty Factor 10%, 12 分 でクロマチンを約 200bp-500bp に断片化した。クロマチン断片化効率は 2% アガロースゲルにより確認した。断片化したクロマチンサンプルに, ラビット抗 H3K27ac 抗体 (Cell Signaling Technology #8173) あるいはラビット抗 H3K4me2 抗体 (Cell Signaling Technology #9725) を 2 µg 混合し, 4°C, 4 時間, 反応させてクロマチン免疫沈降を行った。抗体と結合したタンパク質/クロマチン複合体をプロテイン G 磁気ビーズで回収し, 脱架橋およびプロテアーゼ処理を行った後, NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up を用いて精製した。

ChIP-seq は, クロマチン免疫沈降サンプルから, TruSeq ChIP Sample Prep Kit(Illumina)を用いて次世代シーケンサーライブラリーを作製し, Illumina HiSeq 2500 を用いてリード長 100bp, ペアエンド, 2,000 万リードペアで解析した。また, ChIP-real time PCR は, Serinc5 のエンハンサー領域を認識するプライマー (Fwd:5'-ACTTCTACCCTGTATGTGGATCA-3', Rev:5'-GCTGCTGAAGTGGCCTAATT-3') を用いて行った。

16. ATAC-seq および ChIP-seq データ解析

ATAC-seq および ChIP-seq の raw data は, まず fastp(Ver 0.23.2) (42)を用いてクオリティ管理, リードフィルタリング, ベース補正を行った。設定はデフォルトで行い, コマンドは `$ fastp -i. [name].fastq -o. [name]_trimmed.fastq` で行った。ChIP-seq データは, Bowtie2(Ver 2.4.4) (43)を用いてシーケンスリードを mm9 にデフォルト設

定でマッピングし(コマンド `$ bowtie2 -p 4 -x mm9 -1 [name_R1]_trimmed.fastq -2 [name_R2]_trimmed.fastq -S [name].sam`), MACS2(Ver 2.2.7.1) (44)を用いてピークコールを行った (コマンド `$ macs2 callpeak -t [name].bam -f BAM --nomodel --shift -100 --extsize 200 -g mm -n [name] -B`)。マッピングを行った SAM 形式のファイルは, samtools(Ver 1.14) (45)を用いた以下のコマンドで SAM 形式を BAM 形式に変換し (`$ samtools view bhS -F 0x4 [name].sam`), ソートを行い(`$ samtools sort -T [name_sorted].bam`) とインデックスの作成を行った (`$ samtools index [name_sorted].bam`)。ATAC-seq データは, Picard (Ver 2.26.9, <https://broadinstitute.github.io/picard/>) を用いて PCR 重複を除去した後 (コマンド `$ picard MarkDuplicates I=[name].bam O=[name].bam M=[name].txt REMOVE_DUPLICATES=true`), MACS2 を用いてピークコールを行った。データ解析によって得られたピークは IGV(Ver 2.6.2) (46)を用いて可視化した。

17. ルシフェラーゼアッセイ

Col2a1 遺伝子の minimal promoter とイントロン 1 に存在する Sox9 結合配列を組み込んだレポーターコンストラクト(*Col2a1-Luc*)は, 旭化成ファーマ松田昭生博士より供与を受けた (47)。*Acan* 遺伝子の minimal promoter ならびに *Acan* 遺伝子の転写開始点から 10kb 上流に存在し Sox9 が結合するエンハンサー領域 (48)を pGL4.1 ベクター (Promega, Madison, WI, USA) にクローニングし *Acan-Luc* のレポーターコンストラクトを作製した。*Serinc5* 遺伝子のイントロン 1 領域に存在するエンハンサー領域の全長(600bp), 5'側 300bp および 3'側 300bp を PCR で増幅した後, In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (TAKARA) を用いて pGL4.23 ベクター(Promega)組み込み, *Serinc5-Enh-Luc* のレポーターコンストラクトを作製した。レポーターコンストラクトを X-tremeGENE™ HD DNA トランスフェクション試薬 (Merck) を用いて C3H10T1/2 細胞または初代培養軟骨細胞にトランスフェクションし, 48 時間後に細胞溶解液にて細胞を溶解した。すべてのサンプルは, ルシフェラーゼ基質液 (Promega) と混合した後, ルミノメーター (Promega) を用いて発光量を測定した。遺伝導入効率の測定は, ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクターphRL-TK (Promega) を用いて補正を行った。

18. 統計処理

実験結果は, 平均値±標準偏差(SD)で表し, *p* 値が 5%未満のものを有意差ありと

した。2 群間の比較には対応のない Student-t 検定を，3 群間以上の比較は一元配置分散分析(One way ANOVA)を行った後，Tukey-Kramer 検定を用いて多重比較検定を行った。

III 結果

1. 軟骨細胞レポーターマウスの作製

成長板軟骨細胞のシングルセル解析を行うために、軟骨細胞特異的に緑色蛍光タンパク質 **ZsGreen** を発現させた軟骨細胞レポーターマウスの作製を行った。軟骨細胞特異的遺伝子の一つである **Col11a2** 遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域を用いることで、軟骨細胞特異的に **Cre** 遺伝子を発現することが可能な **Col11a2-enh-Cre** マウス (36,49,50) と、**ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen** マウスを交配させ、**Col11a2-ZsGreen** マウスを作出した (図 2)。蛍光実体顕微鏡により、胎生 15.5 日齢 **Col11a2-ZsGreen** マウスの四肢および肋骨などの骨格組織に **ZsGreen** が発現していることを確認した (図 2)。

成長板軟骨における **ZsGreen** の発現を検討するために、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、予想に反して **ZsGreen** は II 型コラーゲン成長板軟骨だけでなく I 型コラーゲン陽性の骨組織においても発現していることが明らかとなった (図 3)。そこで、一次骨化による骨組織が出現する直前の胎生 15.5 日齢の大腿骨および脛骨における **ZsGreen** の発現を検討した。その結果、胎生 15.5 日齢の大腿骨および脛骨に I 型コラーゲン陽性の軟骨膜は検出されたが、骨組織は出現していないことが観察された (図 4A)。一方、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 (図 4A 点線枠および図 4B)。興味深いことに、インターゾーンには I 型コラーゲンおよび II 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 (図 4B)。インターゾーンにおける **ZsGreen** 陽性細胞の発現は、一つの軟骨原器がインターゾーンによって 2 本の骨に分裂しつつある時期の指関節のインターゾーンにも認められた (図 5)。さらに、**ZsGreen** 陽性細胞は軟骨膜や血管侵入に伴って成長板軟骨に流入する I 型コラーゲン陽性の骨芽細胞にも認められることが明らかとなった (図 6 矢頭)。

以上の結果より、成長板軟骨細胞の **scRNAseq** を行うためには、**ZsGreen** 陽性細胞の大部分が軟骨細胞を占める胎生 15.5 日齢 **Col11a2-ZsGreen** マウスが適切であること、また一部ではあるが **ZsGreen** 陽性細胞はインターゾーン細胞および骨芽細胞を含むことが明らかとなった。

2. ZsGreen 陽性細胞の単離と scRNA-seq 解析

胎生 15.5 日齢の *Col11a2-ZsGreen* マウス 3 匹より上肢および下肢を回収し 0.2% コラゲナーゼにて細胞分散を行った後、ZsGreen 陽性細胞のセルソーティングを行った (図 7)。10x Chromium システムを用いて 1 細胞からの RNA 抽出と cDNA 合成を行い scRNA-seq に用いた。得られたシーケンスデータは Cell Ranger にてマッピングならびに UMI (Unique Molecular Identifiers) カウントを行い、遺伝子発現 Matrix データとして出力した (図 1)。シングルセル解析に用いた細胞数は 7,179 個、1 細胞当たりのリード数 31,496、総リード数 226,116,897、1 細胞当たりの 平均検出遺伝子数は 3,164 であった。

一次解析で出力された遺伝子発現 Matrix を用いて、Seurat 4.0 による二次解析を行った (図 1)。細胞フィルタリング、正規化を行い、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) による次元削減と二次元プロットを行った結果、ZsGreen 陽性細胞は 20 のクラスターにクラスタリングされた (図 8)。これらの細胞クラスターは、0,1,2,4,5,6,7,9,10,11,15,16 から構成される細胞集団と、それ以外の分散して分布する 200 個以下の比較的少数の細胞から構成されるクラスター (3,8,12,14,17,18,19) に大別された (図 8A)。これら細胞クラスターの細胞種を決定するためにドットプロットにより *Col11a2*, *Col2a1* および *Col1a1* の発現を比較した (図 8B)。その結果、*Col11a2*, *Col2a1* または *Col1a1* を高発現する前者の細胞集団は軟骨細胞または骨芽細胞などを含む間葉系細胞、また *Col11a2* および *Col1a1* の両方の発現が非常に低い 8,14,17,18,19 は間葉系細胞以外の細胞であると考えられた。そこで、他のクラスターに比較してクラスター 3,8,12,14,17,18,19 で有意に高発現する発現変動遺伝子 (DEG: Differentially Expressed Gene) を抽出し (表 4)、Metascape によるエンリッチメント解析 (14)を行った。その結果、クラスター 8,12,17 には肥満細胞、クラスター 14 にはミクログリア、クラスター 18 には表皮細胞、クラスター 19 には NK 細胞の遺伝子群がそれぞれエンリッチしていることが明らかとなった。また、クラスター 3 は複数のミトコンドリア遺伝子が特異的遺伝子として上位に検出されていた (表 4)。ミトコンドリア遺伝子が比較的多く検出される細胞は状態の悪いダメージ細胞であることが報告されており (51)、解析から除外した。

最終的に、クラスター 0,1,2,4,5,6,7,9,10,11,15,16 の間葉系細胞群のみを抽出し再クラスタリングを行い、ZsGreen 陽性の間葉系細胞群を 11 個の細胞集団にクラスタリングした (図 9)。各クラスターにおける発現変動遺伝子を表 5 に示す。

3. 間葉系細胞クラスターの細胞種同定

(1)成長板軟骨細胞

次に各細胞クラスターの発現変動遺伝子（表 5）と組織学的データ（図 3,4,5,6）を統合し、各クラスターの細胞種同定を行った。まずはじめに、遺伝子発現量を可視化するリッジプロットならびにドットプロットを作製し、各クラスターにおける *Col11a2*, *Col2a1*, *Sox9* および *Col1a1* の発現を比較検討した（図 10）。その結果、*Col1a1* 発現が低く *Sox9* 発現の高い細胞クラスター(*Col1a1*($\pm$)*Sox9*(++) ; 0,1,2,3,5,7,8,9)と、*Col1a1* 発現が高く *Sox9* 発現の低い細胞クラスター(*Col1a1*(+)*Sox9*(+) ; 4,6,10)の 2 つの細胞集団に大別された（図 10, 表 6）。前者は主に成長板軟骨細胞、後者は骨芽細胞系細胞と推察される。

軟骨細胞のマーカー遺伝子である *Col11a2* および *Col2a1* の発現パターンはほぼ同様であったが、クラスター間における遺伝子発現量の差は、*Col2a1* よりも *Col11a2* の方が顕著であった（図 10）。そこで、*Col1a1*($\pm$)*Sox9*(++)の細胞クラスターを *Col11a2* の発現量でさらに分類すると、*Col11a2* の発現量が低い順に *Col1a1*($\pm$)*Sox9*(++)*Col11a2*($\pm$) のクラスター9, *Col1a1*($\pm$)*Sox9*(++)*Col11a2*(++)のクラスター2,7, *Col1a1*($\pm$)*Sox9*(++)*Col11a2*(+++のクラスター0,1,3,5,8 に分類された。

次に、成長板軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現をヒートマップ（図 11）ならびにバイオリンプロット（図 12）により検討した。その結果、表層軟骨細胞のマーカー遺伝子である *Gdf5* と *Pthlh* はクラスター9 に、細胞増殖マーカーの *Mki67* および *Top2a* はクラスター3,8 に、前肥大化/肥大化軟骨細胞のマーカー遺伝子である *Ihh*, *Col10a1*, *Runx2* および *Sp7* はクラスター7 でそれぞれ高発現が認められた（図 11,12）。また、クラスター0,1,3,5,8 は他の細胞クラスターに比較して *Col2a1*, *Col11a2*, *Acan* の発現が僅かに高かった（図 11,12）。以上の結果より、クラスター9 は表層軟骨細胞、クラスター0,1,5 は静止軟骨細胞、クラスター3,8 は増殖軟骨細胞、クラスター7 は前肥大化/肥大化軟骨細胞であることが明らかとなった。

続いて、疑似時間軸を用いた軟骨細胞分化の軌道解析を行った（図 13）。その結果、表層軟骨細胞のクラスター9 を起点として 9→1→0→5→8→3 の軟骨細胞分化経路が推定された（図 13）。成長板軟骨細胞の細胞アノテーションと各クラスターの細胞数を表 6 に示す。

(2)成長板軟骨細胞以外の細胞集団

組織学的解析により、ZsGreen 陽性細胞はインターゾーン細胞、ならびに I 型コラーゲン陽性の軟骨膜や骨芽細胞においても確認された (図 3,4,5,6)。そこで成長板軟骨細胞以外の細胞集団 (クラスター2,4,6,10) の細胞種同定を行った。

初期骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ (*Alpl*:Alkaline Phosphatase)ならびに成熟骨芽細胞のマーカーである骨シアロタンパク質 (*Ibsp*: Integrin Binding Sialoprotein)の発現を検討した。その結果 *Alpl* は クラスター6 と 10 に、*Ibsp* はクラスター10 に集積していた (図 11,12)。さらに骨芽細胞分化に必須の転写因子 *Runx2* および *Sp7* は 6 と 10 の両方に高発現がみられた (図 11,12)。したがって 6,10 は骨芽細胞であること、また 6→10 で骨芽細胞分化が進んでいることが明らかとなった。

残りのクラスター2,4 はインターゾーン細胞と推察され、また、*Col1a1* を高発現するクラスター4 は I 型コラーゲン陽性の軟骨膜細胞も含むと考えられる。また、軌道解析では、前述のクラスター9 から軟骨細胞への経路と独立して、クラスター2 のインターゾーンへと向かう分化軌道が検出されていた (図 13)。これらの結果は、クラスター9 には、成長板軟骨細胞へと分化する表層軟骨細胞だけでなく、将来的に関節を形成するインターゾーン細胞の前駆細胞が存在する可能性を示唆している。

以上の結果をまとめた細胞クラスターの細胞種を表 6 に示す。

4. 前肥大化軟骨細胞の新規マーカー遺伝子の同定

scRNA-seq は少数の細胞集団の検出とその特異的遺伝子の同定が可能である (33)。そこで、本研究では成長板軟骨細胞に含まれる割合の少ないマイナー細胞集団である前肥大化軟骨細胞に焦点を置き、その特異的マーカー遺伝子の同定と役割の解析を行った。まずはじめに、前肥大化軟骨細胞のクラスター7 に特異的に発現する遺伝子の中から、p 値の低い上位 10 個の遺伝子、*Uts2b* (Urotensin 2B), *Ihh*, *Col10a1*, *Panx3* (Pannexin 3), *Baiap2l22* (BAR/IMD Domain Containing Adaptor Protein 2 Like 2), *Mpz* (Myelin Protein Zero), *Serinc5* (Serine Incorporator 5), *Efemp1* (EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1), *Cd200*, *Ttll3* (Tubulin Tyrosine Ligase Like 3) を抽出し、バイオリンプロットにより発現パターンを検討した (図 14)。その結果、*Panx3* および *Cd200* はクラスター7 のみならず、クラスター10 の骨芽細胞でも高い発現が認められたが、その他の遺伝子はクラスター7 に特異的であった (図 14)。そこで、既に前肥大化軟骨細胞での発現が報告されている *Ihh*, ならびにクラスター7 に特異的であ

った *Uts2b*, *Baiap2l*, *Mpz*, *Serinc5*, *Efemp1*, *Ttll3* を特異的に認識する RNA プローブを作製し In Situ ハイブリダイゼーション法を行った (図 15A)。その結果, *Serinc5* が *lhh* の発現部位に一致して前肥大化軟骨細胞に特異的に発現していることを見出した (図 15A)。 *lhh* と *Serinc5* の共局在は FeaturePlot においても認められた (図 15B)。

前肥大化軟骨細胞における *Serinc5* の発現をさらに検討するため, 間葉系細胞凝集からの軟骨細胞分化を *In Vitro* で再現可能なマウス肢芽細胞のマイクロマス培養法を用いて *Serinc5* の発現を検討した。RT-qPCR 法により, *Col2a1*, *Acan* および *Sox9* などの静止/増殖軟骨細胞のマーカー遺伝子発現は Day6 をピークに Day9 で低下すること, *lhh* は Day6 をピークに Day9 までその発現が持続すること, また肥大化軟骨細胞のマーカー遺伝子である *Col10a1* および *Mmp13* は Day9 がピークとなることを確認した (図 16)。興味深いことに, *Serinc5* は *lhh* と同じく Day6 が発現のピークとなり Day9 までその発現が持続することが明らかとなった (図 16)。

マウス肢芽細胞は BMP2 存在下で単層培養すると骨芽細胞分化へと分化することが知られている (52)。そこで単層培養法を用いて骨芽細胞分化における *Serinc5* の発現を検討したところ, *Ibsp* およびオステオカルシン(*Ocn*)などの骨芽細胞分化マーカー遺伝子が顕著に増加する一方で, *Serinc5* の発現は有意に低下していた (図 17)。

以上の結果より, *Serinc5* は前肥大化軟骨細胞に特異的に発現することが明らかとなった。

5. 軟骨細胞分化における *Serinc5* の役割

軟骨細胞分化における *Serinc5* の役割を明らかにするために, 初代培養軟骨細胞に *Serinc5* を過剰発現させ軟骨細胞の増殖ならびに分化に対する効果を検討した。まず, WST-1 法により細胞増殖に対する *Serinc5* の効果を検討した結果, *Serinc5* の過剰発現は軟骨細胞の増殖を抑制すること明らかとなった (図 18A)。次に, 軟骨細胞分化マーカー遺伝子に対する *Serinc5* の効果を検討した。*Serinc5* 単独では *Col2a1*, *Acan* および *Sox9* の遺伝子発現に変化は見られなかったが, BMP2 によって誘導される *Col2a1*, *Acan* の発現増加を阻害し, *Sox9* の発現増加を阻害する傾向を認めた。(図 18B)。一方, *Serinc5* は *lhh*, *Col10a1*, *Runx2* および *Sp7* などの前肥大化ならびに肥大化軟骨細胞遺伝子発現には影響を与えなかった (図 18C)。

Serinc5 の役割をさらに検討するために, 静止軟骨細胞および増殖軟骨細胞の分化と機能において必須的役割を担う転写因子 *Sox9* に対する *Serinc5* の作用を検討した。RT-qPCR の結果に一致して, 初代培養軟骨細胞に *Serinc5* を過剰発現させても *Sox9*

のタンパク質発現に変動は見られなかった（図 19A）。しかし、**Serinc5** は **Sox9** 誘導性の **Col2a1** ならびに **Acan** の発現増加を有意に抑制した（図 19B）。これらの結果は **Serinc5** が **Sox9** の発現ではなく機能を抑制することで軟骨細胞分化を阻害している可能性を示唆する。そこで、**Sox9** が直接結合する **Col2a1** 遺伝子ならびに **Acan** 遺伝子のエンハンサー領域を用いたレポーターアッセイを行い、**Sox9** の転写活性阻害に対する **Serinc5** の効果を検討した。興味深いことに、**Serinc5** は容量依存的に **Sox9** の転写活性を阻害することが明らかとなった（図 19C）。以上の結果より、**Serinc5** は **Sox9** の転写活性を抑制することにより、増殖軟骨細胞の増殖と機能を負に制御していることを強く示唆する。

6. 軟骨細胞における **Serinc5** の発現制御機構の解明

最後に、軟骨細胞における **Serinc5** の発現制御機構の解明を行った。真核生物の遺伝子発現は、エンハンサーと呼ばれるクロマチン構造が緩んだゲノム領域（オープンクロマチン）に転写因子が結合し転写を活性化することによって促進される (53)。そこで、初代培養軟骨細胞および間葉系幹細胞を用いて、ゲノムワイドにオープンクロマチン領域を検出することが可能な **ATAC-seq**、ならびに活性化エンハンサー領域のヒストンマークである **H3K27ac** を指標とした **ChIP-seq** を行い、**Serinc5** の発現制御にかかわるエンハンサーの探索を行った。その結果、**Serinc5** 遺伝子のイントロン1領域に、初代培養軟骨細胞ではオープンになっているが間葉系幹細胞ではクローズしている約 600bp のゲノム領域(chr13:93406733-93407307)を見出した（以下 **Serinc5-Enh**）（図 20）。さらに、この領域は **H3K27ac** の **ChIP-seq** においてもピークが検出された（図 20）。これらの結果は、**Serinc5-Enh** は成熟軟骨細胞で特異的に活性化し **Serinc5** 遺伝子の発現制御を担うエンハンサー領域であることを示唆する。

軟骨細胞における **Serinc5-Enh** のエンハンサー活性を検討するために、**Serinc5-Enh** 領域の全長およびその一部をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込みレポーターアッセイを行った。その結果、**Serinc5-Enh** は軟骨細胞においてエンハンサー活性を示すこと、またエンハンサー活性には 5'側のゲノム領域が重要であることが明らかとなった（図 21A）。

最後に ITS 処理により軟骨細胞分化が誘導される **ATDC5** を用いて、軟骨細胞分化に伴う **Serinc5-Enh** の変化を検討した。その結果、**Serinc5-Enh** は **Serinc5** の遺伝子発現増加に一致して、**H3K27ac** の割合も増加することが明らかとなった（図 21B）。

以上の結果より、軟骨細胞における **Serinc5** の発現は、軟骨細胞特異的なエンハン

サー領域によってエピジェネテックに制御されていることが明らかとなった。

IV 考察

顎顔面を含む骨の形成と成長を担う成長板軟骨細胞は多様な軟骨細胞から構成される生物学的にユニークな組織であり、成長板軟骨細胞の特性や分化メカニズムを解明することは遺伝性骨系統疾患の病態メカニズム理解するうえで非常に重要である。しかし、生物学的特性の異なる多様な軟骨細胞を1つの細胞集団（バルク）として解析してきた既存のアプローチでは、成長板軟骨細胞の多様性や階層性の解析が不可能であった。本研究では、軟骨細胞レポーターマウスを用いて成長板軟骨細胞の **scRNA-seq** を行い、成長板軟骨を7つの細胞クラスターに分類するとともに、それぞれのクラスターに特異的な遺伝子の抽出に成功した。さらに、前肥大化軟骨細胞の新規マーカー遺伝子として **Serinc5** を同定し、**Sox9** の機能を抑制することで軟骨細胞分化を制御していることを見出した（図 22）。成長板軟骨細胞の多様性や階層性を分子レベルで解明した本研究は、軟骨内骨化の分子メカニズムの解明が飛躍的に進展させるとともに、軟骨内骨化やその異常によって生じる遺伝性骨系統疾患の病態メカニズムの理解が深まると期待できる。

組織を1細胞レベルで解析する **scRNAseq** は生体組織の不均一性 (**heterogeneity**) を解析するうえで非常に強力なツールとなる。本研究以外にも骨組織を用いた **scRNA-seq** は複数行われているが、本研究のように軟骨細胞だけを単離して行うのではなく血液細胞や皮膚を含む骨組織を用いて行われている (54-56)。また、**Col11a2-Cre** ではなく **Col2a1-Cre** マウスで標識した細胞を回収して **scRNA-seq** を行った報告もみられるが、いずれも生後のマウスを用いた解析であり、本研究結果 (図 3) と同様に骨組織が数多くラベルされている (57,58)。これらの手法は **scRNA-seq** に用いる総細胞数において軟骨細胞の占める割合が少なくなること示唆しており、解析の解像度 (**resolution**) が低くなるという問題点が考えられる。さらに、**Col2a1-Cre** は分化初期の間葉系凝集時期、すなわち骨芽細胞への分化能も有する骨-軟骨前駆細胞で **Cre** 活性が見られるため、**Col11a2-Cre** に比較して軟骨細胞の特異性が低いことが報告されている (49,50)。実際、ドットプロットによる遺伝子発現解析では、すべての細胞クラスターで **Col2a1** の発現が高いのに対して、**Col11a2** はクラスター間における発現量の差が明確である (図 10B)。したがって、**Col11a2-Cre** で標識した細胞のみを単離し、一次骨化が開始していない胎生 15.5 日齢を用いて行った本研究は、従来の研究アプローチに比較して高い解像度で成長板軟骨細胞の解析を行ったと考えられる。

一方、本研究では胎生 15.5 日齢のみのマウスを用いたため、成熟軟骨細胞を高い割合で解析に用いることができたが、UMAP で検出できた分化初期の骨格系幹細胞や肥大化軟骨細胞の細胞数が少なかった（図 3）。そのため、擬似時間軸の設定による細胞系譜解析では、増殖軟骨細胞から肥大化軟骨細胞への細胞遷移を検出することが不可能であった（図 13）。また、細胞数が不十分である場合、統計学的計算による DEG 解析の精度が低下する恐れもある。今後は、骨格系幹細胞が多く含まれる胎生 11 日齢や肥大化軟骨細胞、骨芽細胞の細胞数が多い生後 0 日齢マウスで scRNA-seq を行い、すべてのデータを統合することで、クラスター特異的な遺伝子クローニングの精度を上げる必要がある。そのための解析手法として、複数の scRNA-seq データを統合する方法はすでに確立されており、その際に問題となる異なる時期の試料調整に伴うデータのばらつき（バッチ効果）を補正するバッチ補正法も開発されている (59,60)。

本研究により前肥大化軟骨細胞の新規マーカー遺伝子として *Serinc5* を同定することに成功した。*Serinc5* は *Serinc1* から *Serinc5* まで存在する *Serinc*(Serine incorporator)ファミリーに属する膜タンパク質で、細胞膜セリンを取り込むことでフォスファチジルセリンおよびスフィンゴ脂質の合成を促進することが報告されている (61)。*Serinc5* は HIV ウィルスに取り込まれることで HIV 感染を阻害することが報告されていたが (62)、骨格形成における *Serinc5* の役割について報告はなされていなかった。そして、本研究では *Serinc5* が *Sox9* の転写活性を抑制することで軟骨細胞分化遺伝子の発現を制御していることを明らかにしたが（図 19）、その分子メカニズムについては解明できていない。推測される分子メカニズムの一つは、*Serinc5* によって活性化される NF- κ B を介した経路である (63)。軟骨細胞において NF- κ B は *Sox9* の転写活性を抑制することが報告されていることから (64)、*Serinc5* は NF- κ B シグナルの活性化を介して *Sox9* の機能を阻害していると推察される。他のメカニズムとして推測されるのは、スフィンゴリン脂質代謝を介した間接的な経路である。細胞膜に取り込まれたセリンは、セリンパルミトイル転移酵素によって触媒されるパルミトイル CoA との縮合反応を経てセラミドに変換される (65)。そして、セラミドを前駆体として合成されるスフィンゴシンやスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は細胞の分化や増殖を制御する重要な脂質メディエーターとして機能することから (66)、*Serinc5* はセラミドや S1P を介して間接的に *Sox9* の機能を抑制している可能性が推察される。また、スフィンゴリン脂質の代謝産物は骨格系細胞において様々な機能を発揮することも報告されており (67)、例えば、セラミドは軟骨細胞の増殖を抑制する一方でアポトーシスを促進するこ

とが報告されている (68)。増殖軟骨細胞が前肥大化軟骨細胞へと分化が進むと細胞増殖が停止すること、また軟骨細胞の肥大化はアポトーシスを誘導することを考慮すると、前肥大化軟骨細胞はセラミド合成の原料となるセリンを取り込むために **Serinc5** を高発現する必要があるとも推察される。今後は **Serinc5** によって活性化される細胞内シグナル経路やスフィンゴリン脂質代謝についても検討を行うことで、軟骨細胞における **Serinc5** の役割の解明を進めていきたいと考えている。

エンハンサーには、特定の転写因子によって認識される塩基配列が複数存在し、転写因子がその認識配列に結合することで遺伝子発現が促進される。したがって、本研究で明らかにした **Serinc5** 遺伝子のエンハンサー領域 (図 20) に結合し **Serinc5** 遺伝子の発現を促進する転写因子を同定することが重要となるが、本研究では未解決のままである。近年、特定のゲノム領域に結合するタンパク質を同定する方法開発されている。例えば、ゲノム編集法を応用して特定ゲノム領域に結合するタンパク質を同定する **enChIP** 法 (69)、また DNA オリゴを用いた DNA プルダウンアッセイと液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry:LC/MS) を組み合わせた方法などが報告されている (70)。今後はこれらの実験手法や転写因子結合配列予測ツールなどとも連携させながら、**Serinc5** の遺伝子発現を制御する転写因子の同定にも取り組んでいきたいと考えている。

前述のとおり、本研究では軟骨特異性に関する過去の報告 (49,50)を参考にして **Col11a2-Cre** を用いたが、**ZsGreen** 陽性細胞にはインターゾーン細胞、軟骨膜細胞および一部の骨芽細胞にも含まれていた (図 4,5)。先行研究における **Col11a2-Cre** マウスの軟骨組織特異性は **LacZ** を指標に検討されているが (50), 本研究で利用した **ZsGreen** は 4 量体を形成する緑色蛍光タンパク質であり蛍光強度と光安定性が強いため (71), **Col11a2** の発現が弱い成長板軟骨細胞以外の細胞でも **ZsGreen** が検出されたと推測される。興味深いことに、Hyde らは **Col2a1-Cre** マウスを用いて関節形成過程における **Col2a1** 発現細胞の系譜解析を行った結果、胎生 12.5 日齢では大腿骨と脛骨はインターゾーンで分断されずに **Col2a1** 陽性細胞で繋がっているのに対して、胎生 13.5 日齢では **Col2a1** 発現が消失したインターゾーン細胞で分断されていることを報告している (72)。これらの報告は、将来的に関節となるインターゾーン細胞は初期の軟骨原基において **Col2a1** または **Col11a2** 陽性であった可能性を示唆しており、**Col11a2-ZsGreen** マウスのインターゾーン細胞において **ZsGreen** が検出されたのも合理的であると考えられる。さらに、インターゾーン細胞のクラスターである #2,4 の特異的遺伝子として検出

された遺伝子の中には、関節形成への関与が報告されている遺伝子も含まれている。例えば、クラスター2の *Hoxd13* の遺伝子欠損マウスは関節形成障害を示すこと (73)、またクラスター4に高発現する *Scx* は十字靱帯の形成に重要であることが報告されている (74)。したがって、クラスター2,4の特異的遺伝子についての解析は、インターゾーン細胞を制御するシグナルネットワークと関節形成の分子メカニズム解明に貢献すると期待できる。

一方、クラスター9にも関節形成において必須的役割を担う *Gdf5* が高発現していた (図 11,12,表 6)。*Gdf5* は胎生 11.5 日頃から軟骨前駆領域に弱い発現を認め、胎生 14.5 日にかけてインターゾーンに限局して強く発現するようになり、その後の成長とともに関節における発現が減少することから (75), *Gdf5* 陽性細胞は関節発生の初期において関節組織の前駆細胞として機能する細胞集団であると推測される。実際、Monocle3 による軌道解析では、クラスター9からクラスター2のインターゾーンへの分化経路が示唆されている (図 13)。また *Gdf5-CreER* マウスを用いた *Gdf5* 陽性細胞の細胞系譜解析により、関節はインターゾーンの *Gdf5* 陽性細胞や、関節形成初期に周囲から流入してくる細胞が新たに *Gdf5* 陽性細胞となり関節軟骨、半月板、靱帯、滑膜などの形成に関与することが明らかとなっている (24)。さらに、*Gdf5* 遺伝子の自然発生変異マウスである *Gdf5bp-3J* マウスでは、指関節が融合し関節が形成されないことが示されている (76)。これらの結果は *Gdf5* と同じ細胞クラスター9に特異的な遺伝子が、*Gdf5* と同様に関節形成に重要である可能性を示唆している。実際、クラスター9の特異的遺伝子の上位に位置する複数の遺伝子が関節形成に関与することが報告されている。*Barx2* (77), *Osr1* (78), *Sfrp2* (79), *Creb5* (80)ならびに *Irx1* (81,82)は *Gdf5* と同じく関節に特異的に発現しており、*Creb5* 遺伝子欠損マウスは関節癒合を示すことが報告されている (80)。クラスター9の上位に位置する、*Atp1a2*, *Tfap2b*, *Btc*, *Col26a1* といった遺伝子の関節形成における役割も興味もたれる。

本研究で行った scRNA-seq は 2013 年度の Nature Methods 誌において Method of the year に選出され (83)、現在ではシングルセル解析は生命科学研究の新しい潮流となって様々な研究分野で応用されている。しかし、scRNA-seq においても技術的な問題点がいくつか明らかとなっている。その一つが酵素処理による細胞分散やセルソーティング処理のストレスによって生じる解析結果のバイアスである。例えば、細胞分散のための酵素処理によって特定の遺伝子発現を誘導すること (84)、また細胞分散によるアポトーシスやダメージの発生率が細胞種によって異なることが報告されている (85)。

Van den Brink らは筋肉組織の scRNA-seq を行う際にコラゲナーゼ処理を 1 時間のグループと 2 時間のグループを作製し解析した結果、2 時間処理のグループで Heat Shock Protein(HSP)の遺伝子を高発現するクラスターが出現したことを報告している (84)。本研究結果においても、クラスター2 において *Hsp1a* および *Hsp1b* が高発現していた (表 5)。細胞の単離にコラゲナーゼ処理は必要不可欠であり、細胞分散処理によるストレス応答をゼロにすることは不可能であるが、解析に注意が必要である。

もう一点の問題点として、scRNA-seq は組織を分解し細胞を分散させるため、遺伝子発現の位置情報が失われることである。本研究では、scRNA-seq 解析によって得られた遺伝子群を、*In Situ* ハイブリダイゼーション法によって組織学的な再検討を行っているが、*In Situ* ハイブリダイゼーション法や免疫染色法では解析できる遺伝子数に限界がある。この問題点を解決するために、空間トランスクリプトームと総称される解析技術が開発された (86)。空間的トランスクリプトームは組織サンプルにおける全ての遺伝子活動を測定し、それがどの部位で行われているかを検出することで、「遺伝子発現プロファイルを組織学的情報に紐づける遺伝子発現マップ」の作製が可能となっている。しかし、現段階では RNA を回収するスポットの直径は 55 μ m、中心間の距離は 100 μ m であることから得られるデータは 1 細胞単位ではないが、scRNA-seq データと統合することで成長板軟骨の遺伝子発現解析が飛躍的に進展すると考えられる。

空間的トランスクリプトーム解析に加えて、近年では 1 細胞レベルでエピゲノム情報を解析するシングルセル ATAC-seq(scATAC-seq)も開発されている (87)。ゲノムワイドなオープンクロマチン領域を解析する scATAC-seq は、遺伝子発現の ON/OFF を制御するエピゲノム情報を 1 細胞レベルで明らかにすることが可能である。したがって、遺伝子発現は類似していてもエピジェネティックなクロマチン動態が異なるなど、さらに詳細な軟骨細胞の分類や解析が可能になると予測される。今後はこれら最新の解析技術を取り入れ、本研究で得られた scRNA-seq の遺伝子発現情報を、エピゲノム情報 (scATAC-seq) ならびに遺伝子発現マップ (空間的トランスクリプトーム) と有機的に連携させることで補完し、軟骨細胞における遺伝子発現ネットワークを「エピゲノム-RNA 発現-組織学的な局在」と多元的に解明することに挑戦していきたい。

V. 総括

1. シングルセル解析に用いるための軟骨細胞レポーターマウス(*Col11a2-ZsGreen* マウス)を作製した。免疫組織学的検討により、成長板軟骨、将来的に関節を形成するインターゾーン、軟骨膜および骨芽細胞に **ZsGreen** が発現していることを確認した。
2. 胎生 15.5 日齢マウス四肢からセルソーティングにより **ZsGreen** 陽性細胞を単離し **scRNA-seq** を行った結果、分化段階の異なる成長板軟骨細胞を 7 個の細胞集団に分類し、各クラスターにおける特異的発現遺伝子(**DEG**)を同定することに成功した。さらに、インターゾーン領域と推測される細胞集団の特定とその特異的遺伝子も明らかにした。
3. 前肥大化軟骨細胞としてアノテーションされたクラスター7 の遺伝子に着目し、**In Situ** ハイブリダイゼーション法により成長板軟骨における発現部位を検討した結果、**Serinc5** が前肥大化軟骨細胞に特異的に発現していることを見出した。
4. **Serinc5** は初代培養軟骨細胞の細胞増殖を抑制した。
5. **Serinc5** は軟骨細胞分化の初期に重要な転写因子 **Sox9** の機能を阻害することで、静止軟骨および増殖軟骨細胞の分化マーカー遺伝子である **Col2a1** ならびに **Acan** の発現を抑制することが明らかとなった。
6. 軟骨細胞における **Serinc5** の発現制御にはイントロン 1 に存在するエンハンサー領域が重要であること、またそのエンハンサー活性は軟骨細胞分化に伴って促進された。

VI. 結語

scRNAseq による Dry 解析と、初代培養軟骨細胞を用いた Wet 実験を組み合わせた研究アプローチにより、成長板軟骨細胞の多様性と階層性が遺伝子レベルで明らかとなった。

VII. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、始終御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科生化学教室 西村理行 教授, ならび顎顔面口腔矯正学教室 山城隆教授に深甚なる謝意を表します。そして、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科生化学教室 波多賢二 准教授に心より感謝申し上げます。さらに本研究を行うに際し、多大な御援助、御協力を頂きました生化学教室ならびに顎顔面口腔矯正学教室の先生方、また生化学教室秘書の加藤千華さんに厚くお礼申し上げます。

VIII 参考文献

1. Ulrich-Vinther, M., Maloney, M. D., Schwarz, E. M., Rosier, R., and O'Keefe, R. J. (2003) Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* **11**, 421-430
2. Kronenberg, H. M. (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336
3. Long, F., and Ornitz, D. M. (2013) Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a008334
4. Wei, X., Hu, M., Mishina, Y., and Liu, F. (2016) Developmental Regulation of the Growth Plate and Cranial Synchondrosis. *J Dent Res* **95**, 1221-1229
5. Thilander, B., and Ingervall, B. (1973) The human spheno-occipital synchondrosis. II. A histological and microradiographic study of its growth. *Acta Odontol Scand* **31**, 323-334
6. Mori, H., Matsumoto, K., Kawai, N., Izawa, T., Horiuchi, S., and Tanaka, E. (2017) Long-term follow-up of a patient with achondroplasia treated with an orthodontic approach. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **151**, 793-803
7. Ornitz, D. M., and Legeai-Mallet, L. (2017) Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **246**, 291-309
8. Olsen, B. R., Reginato, A. M., and Wang, W. (2000) Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 191-220
9. Bianco, P., and Robey, P. G. (2015) Skeletal stem cells. *Development* **142**, 1023-1027
10. Chan, C. K., Seo, E. Y., Chen, J. Y., Lo, D., McArdle, A., Sinha, R., Tevlin, R., Seita, J., Vincent-Tompkins, J., Wearda, T., Lu, W. J., Senarath-Yapa, K., Chung, M. T., Marecic, O., Tran, M., Yan, K. S., Upton, R., Walmsley, G. G., Lee, A. S., Sahoo, D., Kuo, C. J., Weissman, I. L., and Longaker, M. T. (2015) Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell* **160**, 285-298
11. Ono, N., Balani, D. H., and Kronenberg, H. M. (2019) Stem and progenitor cells in skeletal development. *Current topics in developmental biology* **133**, 1-24
12. Ono, N., Ono, W., Nagasawa, T., and Kronenberg, H. M. (2014) A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. *Nat Cell Biol* **16**, 1157-1167
13. Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., and de Crombrughe, B. (2014) Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in

- mice. *PLoS genetics* **10**, e1004820
14. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S. K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature communications* **10**, 1523
 15. Lefebvre, V., Zhou, G., Mukhopadhyay, K., Smith, C. N., Zhang, Z., Eberspaecher, H., Zhou, X., Sinha, S., Maity, S. N., and de Crombrughe, B. (1996) An 18-base-pair sequence in the mouse proalpha1(II) collagen gene is sufficient for expression in cartilage and binds nuclear proteins that are selectively expressed in chondrocytes. *Mol Cell Biol* **16**, 4512-4523
 16. Tsumaki, N., Kimura, T., Tanaka, K., Kimura, J. H., Ochi, T., and Yamada, Y. (1998) Modular arrangement of cartilage- and neural tissue-specific cis-elements in the mouse alpha2(XI) collagen promoter. *The Journal of biological chemistry* **273**, 22861-22864
 17. Lauing, K. L., Cortes, M., Domowicz, M. S., Henry, J. G., Baria, A. T., and Schwartz, N. B. (2014) Aggrecan is required for growth plate cytoarchitecture and differentiation. *Dev Biol* **396**, 224-236
 18. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., and Tabin, C. J. (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science (New York, N.Y.)* **273**, 613-622
 19. Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Segre, G. V., and Kronenberg, H. M. (1996) PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science (New York, N.Y.)* **273**, 663-666
 20. Knuth, C. A., Andres Sastre, E., Fahy, N. B., Witte-Bouma, J., Ridwan, Y., Strabbing, E. M., Koudstaal, M. J., van de Peppel, J., Wolvius, E. B., Narcisi, R., and Farrell, E. (2019) Collagen type X is essential for successful mesenchymal stem cell-mediated cartilage formation and subsequent endochondral ossification. *Eur Cell Mater* **38**, 106-122
 21. Inada, M., Wang, Y., Byrne, M. H., Rahman, M. U., Miyaura, C., López-Otín, C., and Krane, S. M. (2004) Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17192-17197
 22. Chijimatsu, R., and Saito, T. (2019) Mechanisms of synovial joint and articular cartilage development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **76**, 3939-

3952

23. Storm, E. E., and Kingsley, D. M. (1996) Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* **122**, 3969-3979
24. Shwartz, Y., Viukov, S., Krief, S., and Zelzer, E. (2016) Joint Development Involves a Continuous Influx of Gdf5-Positive Cells. *Cell reports* **15**, 2577-2587
25. Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., and de Crombrughe, B. (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **17**, 2336-2346
26. Liu, Y., Li, H., Tanaka, K., Tsumaki, N., and Yamada, Y. (2000) Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *The Journal of biological chemistry* **275**, 12712-12718
27. Mead, T. J., Wang, Q., Bhattaram, P., Dy, P., Afelik, S., Jensen, J., and Lefebvre, V. (2013) A far-upstream (-70 kb) enhancer mediates Sox9 auto-regulation in somatic tissues during development and adult regeneration. *Nucleic Acids Res* **41**, 4459-4469
28. Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., and Komori, T. (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & development* **18**, 952-963
29. Higashikawa, A., Saito, T., Ikeda, T., Kamekura, S., Kawamura, N., Kan, A., Oshima, Y., Ohba, S., Ogata, N., Takeshita, K., Nakamura, K., Chung, U. I., and Kawaguchi, H. (2009) Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum* **60**, 166-178
30. Nishimura, R., Wakabayashi, M., Hata, K., Matsubara, T., Honma, S., Wakisaka, S., Kiyonari, H., Shioi, G., Yamaguchi, A., Tsumaki, N., Akiyama, H., and Yoneda, T. (2012) Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *The Journal of biological chemistry* **287**, 33179-33190
31. Kulkarni, A., Anderson, A. G., Merullo, D. P., and Konopka, G. (2019) Beyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications. *Curr Opin Biotechnol* **58**, 129-136
32. Wu, A. R., Wang, J., Streets, A. M., and Huang, Y. (2017) Single-Cell

- Transcriptional Analysis. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **10**, 439-462
33. Stuart, T., and Satija, R. (2019) Integrative single-cell analysis. *Nature reviews. Genetics* **20**, 257-272
 34. Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N. J., Livak, K. J., Mikkelsen, T. S., and Rinn, J. L. (2014) The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nature Biotechnology* **32**, 381-386
 35. La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., Petukhov, V., Lidschreiber, K., Kastrioti, M. E., Lönnerberg, P., Furlan, A., Fan, J., Borm, L. E., Liu, Z., van Bruggen, D., Guo, J., He, X., Barker, R., Sundström, E., Castelo-Branco, G., Cramer, P., Adameyko, I., Linnarsson, S., and Kharchenko, P. V. (2018) RNA velocity of single cells. *Nature* **560**, 494-498
 36. Iwai, T., Murai, J., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N. (2008) Smad7 Inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 MAPK pathways. *The Journal of biological chemistry* **283**, 27154-27164
 37. Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., and Zeng, H. (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133-140
 38. Satija, R., Farrell, J. A., Gennert, D., Schier, A. F., and Regev, A. (2015) Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotechnology* **33**, 495-502
 39. Carlberg, A. L., Pucci, B., Rallapalli, R., Tuan, R. S., and Hall, D. J. (2001) Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* **67**, 128-138
 40. Thirion, S., and Berenbaum, F. (2004) Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture. *Methods Mol Med* **100**, 1-14
 41. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., and Greenleaf, W. J. (2013) Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature Methods* **10**, 1213-1218
 42. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., and Gu, J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884-i890
 43. Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**, 357-359

44. Feng, J., Liu, T., Qin, B., Zhang, Y., and Liu, X. S. (2012) Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nature protocols* **7**, 1728-1740
45. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079
46. Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., and Mesirov, J. P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* **29**, 24-26
47. Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Ohno, T., Amano, K., Ooishi, R., Sugahara, T., Shiojiri, S., Tashiro, K., Suzuki, Y., Nishimura, R., Kuhara, S., Sugano, S., Yoneda, T., and Matsuda, A. (2007) Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 32158-32167
48. Han, Y., and Lefebvre, V. (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* **28**, 4999-5013
49. Couasnay, G., Madel, M. B., Lim, J., Lee, B., and Elefteriou, F. (2021) Sites of Cre-recombinase activity in mouse lines targeting skeletal cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **36**, 1661-1679
50. Fujimaki, R., Hayashi, K., Watanabe, N., Yamada, T., Toyama, Y., Tezuka, K., and Hozumi, N. (2005) Expression of Cre recombinase in the mouse developing chondrocytes driven by the mouse alpha2(XI) collagen promoter. *Journal of bone and mineral metabolism* **23**, 270-273
51. Illicic, T., Kim, J. K., Kolodziejczyk, A. A., Bagger, F. O., McCarthy, D. J., Marioni, J. C., and Teichmann, S. A. (2016) Classification of low quality cells from single-cell RNA-seq data. *Genome Biology* **17**, 29
52. Rosen, V., Nove, J., Song, J. J., Thies, R. S., Cox, K., and Wozney, J. M. (1994) Responsiveness of clonal limb bud cell lines to bone morphogenetic protein 2 reveals a sequential relationship between cartilage and bone cell phenotypes. *Journal of Bone and Mineral Research* **9**, 1759-1768
53. Li, L., and Wunderlich, Z. (2017) An Enhancer's Length and Composition Are Shaped by Its Regulatory Task. *Front Genet* **8**, 63-63
54. Sunkara, V., Heinz, G. A., Heinrich, F. F., Durek, P., Mobasher, A., Mashregi, M. F., and Lang, A. (2021) Combining segmental bulk- and single-cell RNA-sequencing to define the chondrocyte gene expression signature in the murine

- knee joint. *Osteoarthritis and cartilage* **29**, 905-914
55. Kelly, N. H., Huynh, N. P. T., and Guilak, F. (2020) Single cell RNA-sequencing reveals cellular heterogeneity and trajectories of lineage specification during murine embryonic limb development. *Matrix Biol* **89**, 1-10
 56. Haseeb, A., Kc, R., Angelozzi, M., de Charleroy, C., Rux, D., Tower, R. J., Yao, L., Pellegrino da Silva, R., Pacifici, M., Qin, L., and Lefebvre, V. (2021) SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**
 57. Mizuhashi, K., Nagata, M., Matsushita, Y., Ono, W., and Ono, N. (2019) Growth Plate Borderline Chondrocytes Behave as Transient Mesenchymal Precursor Cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **34**, 1387-1392
 58. Zhong, L., Yao, L., Tower, R. J., Wei, Y., Miao, Z., Park, J., Shrestha, R., Wang, L., Yu, W., Holdreith, N., Huang, X., Zhang, Y., Tong, W., Gong, Y., Ahn, J., Susztak, K., Dymont, N., Li, M., Long, F., Chen, C., Seale, P., and Qin, L. (2020) Single cell transcriptomics identifies a unique adipose lineage cell population that regulates bone marrow environment. *eLife* **9**, e54695
 59. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., and Satija, R. (2018) Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* **36**, 411-420
 60. Haghverdi, L., Lun, A. T. L., Morgan, M. D., and Marioni, J. C. (2018) Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors. *Nat Biotechnol* **36**, 421-427
 61. Inuzuka, M., Hayakawa, M., and Ingi, T. (2005) Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35776-35783
 62. Usami, Y., Wu, Y., and Göttinger, H. G. (2015) SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* **526**, 218-223
 63. Zeng, C., Waheed, A. A., Li, T., Yu, J., Zheng, Y. M., Yount, J. S., Wen, H., Freed, E. O., and Liu, S. L. (2021) SERINC proteins potentiate antiviral type I IFN production and proinflammatory signaling pathways. *Sci Signal* **14**, eabc7611
 64. Murakami, S., Lefebvre, V., and de Crombrughe, B. (2000) Potent Inhibition of the Master Chondrogenic Factor Sox9 Gene by Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α *. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 3687-3692
 65. Hanada, K. (2003) Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid

- metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1632**, 16-30
66. Ogretmen, B. (2018) Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer* **18**, 33-50
 67. Khavandgar, Z., and Murshed, M. (2015) Sphingolipid metabolism and its role in the skeletal tissues. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**, 959-969
 68. MacRae, V. E., Burdon, T., Ahmed, S. F., and Farquharson, C. (2006) Ceramide inhibition of chondrocyte proliferation and bone growth is IGF-I independent. *J Endocrinol* **191**, 369-377
 69. Fujita, T., and Fujii, H. (2013) Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun* **439**, 132-136
 70. Hubner, N. C., Nguyen, L. N., Hornig, N. C., and Stunnenberg, H. G. (2015) A quantitative proteomics tool to identify DNA-protein interactions in primary cells or blood. *J Proteome Res* **14**, 1315-1329
 71. Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraksky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnology* **17**, 969-973
 72. Hyde, G., Boot-Handford, R. P., and Wallis, G. A. (2008) Col2a1 lineage tracing reveals that the meniscus of the knee joint has a complex cellular origin. *J Anat* **213**, 531-538
 73. Villavicencio-Lorini, P., Kuss, P., Friedrich, J., Haupt, J., Farooq, M., Türkmen, S., Duboule, D., Hecht, J., and Mundlos, S. (2010) Homeobox genes d11–d13 and a13 control mouse autopod cortical bone and joint formation. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1994-2004
 74. Yoshimoto, Y., Takimoto, A., Watanabe, H., Hiraki, Y., Kondoh, G., and Shukunami, C. (2017) Scleraxis is required for maturation of tissue domains for proper integration of the musculoskeletal system. *Sci Rep* **7**, 45010
 75. Rafipay, A., Berg, A. L. R., Erskine, L., and Vargesson, N. (2018) Expression analysis of limb element markers during mouse embryonic development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **247**, 1217-1226
 76. Storm, E. E., and Kingsley, D. M. (1999) GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol* **209**, 11-27
 77. Meech, R., Edelman, D. B., Jones, F. S., and Makarenkova, H. P. (2005) The homeobox transcription factor Barx2 regulates chondrogenesis during limb

- development. *Development* **132**, 2135-2146
78. Gao, Y., Lan, Y., Liu, H., and Jiang, R. (2011) The zinc finger transcription factors Osr1 and Osr2 control synovial joint formation. *Dev Biol* **352**, 83-91
 79. Morello, R., Bertin, T. K., Schlaubitz, S., Shaw, C. A., Kakuru, S., Munivez, E., Hermanns, P., Chen, Y., Zabel, B., and Lee, B. (2008) Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. *Journal of cellular physiology* **217**, 127-137
 80. Zhang, C.-H., Gao, Y., Hung, H.-H., Zhuo, Z., Grodzinsky, A. J., and Lassar, A. B. (2022) Creb5 coordinates synovial joint formation with the genesis of articular cartilage. *Nature communications* **13**, 7295
 81. Askary, A., Mork, L., Paul, S., He, X., Izuhara, A. K., Gopalakrishnan, S., Ichida, J. K., McMahon, A. P., Dabizljevic, S., Dale, R., Mariani, F. V., and Crump, J. G. (2015) Iroquois Proteins Promote Skeletal Joint Formation by Maintaining Chondrocytes in an Immature State. *Dev Cell* **35**, 358-365
 82. Zülch, A., Becker, M. B., and Gruss, P. (2001) Expression pattern of *Irxa* and *Irxb* during mouse digit development. *Mechanisms of development* **106**, 159-162
 83. (2014) Method of the Year 2013. *Nature Methods* **11**, 1-1
 84. van den Brink, S. C., Sage, F., Vértessy, Á., Spanjaard, B., Peterson-Maduro, J., Baron, C. S., Robin, C., and van Oudenaarden, A. (2017) Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat Methods* **14**, 935-936
 85. Haber, A. L., Biton, M., Rogel, N., Herbst, R. H., Shekhar, K., Smillie, C., Burgin, G., Delorey, T. M., Howitt, M. R., Katz, Y., Tirosh, I., Beyaz, S., Dionne, D., Zhang, M., Raychowdhury, R., Garrett, W. S., Rozenblatt-Rosen, O., Shi, H. N., Yilmaz, O., Xavier, R. J., and Regev, A. (2017) A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* **551**, 333-339
 86. (2021) Method of the Year 2020: spatially resolved transcriptomics. *Nature Methods* **18**, 1-1
 87. Buenrostro, J. D., Wu, B., Litzenburger, U. M., Ruff, D., Gonzales, M. L., Snyder, M. P., Chang, H. Y., and Greenleaf, W. J. (2015) Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* **523**, 486-490

表 1 マウスジェノタイピングに用いた **PCR** プライマー

<i>Col11a2-enh-Cre</i>	Fwd	5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA-3'
	Rev	5'-GTGGCAGATGGCGCGGCAACACCATT-3'
<i>ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen</i>	Fwd	5'-GGCATTAAAGCGCGTATCC -3'
	Rev	5'-AACCAGAAGTGGCACCTGAC -3'

表 2 In Situ ハイブリダイゼーション法に用いたクラスター7 の RNA プローブ

遺伝子名	標的配列(mRNA)	サイズ(bp)	RNA ポリメラーゼ
<i>Uts2b</i>	165-721	556	Sp6
<i>Ihh</i>	427-1006	679	T7
<i>Baiap2l2</i>	576-1141	565	T7
<i>Mpz</i>	156-722	566	T7
<i>Serinc5</i>	578-1250	672	Sp6
<i>Efemp1</i>	427-855	442	Sp6
<i>Ttll3</i>	1963-2621	634	T7

表 3 Real time PCR に用いたプライマーおよび Taqman プローブ

<i>Serinc5</i>	sense primer:	5'-CTCAGGAGCGTTCTTCATTCC-3'
	anti-sense primer:	5'-GCAGTCCAGTTCTTGTTCCAC-3'
	probe:	5'-CTCCCACATAGCGCCAGACTTTCAGAAA-3'
<i>Col2a1</i>	sense primer:	5'-TGGAGCCCTGGATGAGCAAG-3'
	anti-sense primer:	5'-TGAGGTTGCCAGCCGCTTCGTCCA-3'
	probe:	5'-TGAGGTTGCCAGCCGCTTCGTCCA-3'
<i>Aggrecan</i>	sense primer:	5'-TCACTGTTACCGCCACTTTCC-3'
	anti-sense primer:	5'-TGCTGCTCAGATGTGACTGC-3'
	probe:	5'-ACCGTCTCTCCGCATCCACCCAGG-3'
<i>Sox9</i>	sense primer:	5'-CCTTCAACCTTCCTCACTACAGC-3'
	anti-sense primer:	5'-GGTGGAGTAGAGCCCTGAGC-3'
	probe:	5'-CCGCCCATCACCCGCTCGCAATAC-3'
<i>Ihh</i>	sense primer:	5'-GACTCATTGCCTCCAGAACTG-3'
	anti-sense primer:	5'-CCAGGTAGTAGGGTCACATTGC-3'
	probe:	5'-CCACAGCCAGCCTGGACATCCCGA-3'
<i>Col10a1</i>	sense primer:	5'-GCCAAGCAGTCATGCCTGAT-3'
	anti-sense primer:	5'-GACACGGGCATACCTGTTACC-3'
	probe:	5'-AGCACTGACAAGCGGCATCCCAGA-3'
<i>Mmp13</i>	sense primer:	5'-GGTTATGACATTCTGGAAGGTTATCC-3'
	anti-sense primer:	5'-CGTGGTTCTCAGAGAAGAAGAGG-3'
	probe:	5'-CCCGTGTTCTCAAAGTGAACCGCAGCG-3'
<i>Runx2</i>	sense primer:	5'-CTCCTTCCAGGATGGTCCCA-3'
	anti-sense primer:	5'-CTTCCGTCAGCGTCAACACC-3'
	probe:	5'-CACCACCTCGAATGGCAGCACGCT-3'
<i>Sp7</i>	sense primer:	5'-AGCGACCACTTGAGCAAACAT-3'
	anti-sense primer:	5'-GCGGCTGATTGGCTTCTTCT-3'
	probe:	5'-CCCGACGCTGCGACCCTCCC-3'
<i>Ibsp</i>	sense primer:	5'-AAGCAGCACCGTTGAGTATGG-3'
	anti-sense primer:	5'-CCTTGTAGTAGCTGTATTCGTCCTC-3'
	probe:	5'-CGGTAAGTGTCGCCACGAGGCTCCC-3'
<i>Ocn</i>	sense primer:	5'-GCAATAAGGTAGTGAACAGACTCC-3'
	anti-sense primer:	5'-GTTTGTAGGCGGTCTTCAAGC-3'
	probe:	5'-TGGGAGTTCCAGTCCCCAGCCCA-3'
<i>Actb</i>	sense primer:	5'-TTAATTTCTGAATGGCCCAGGTCT-3'
	anti-sense primer:	5'-ATTGGTCTCAAGTCAGTGACAGG-3'
	probe:	5'-CCTGGCTGCCTCAACACCTCAACCC-3'

表 4. クラスター3,8,12,14,17,18,19 において特異的に発現する遺伝子(DEG)のリスト。p_val_adj は補正した有意確率を示す。

	Cluster #3		Cluster #8		Cluster #12		Cluster #14		Cluster #17		Cluster #18		Cluster #19	
	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj
1	Gm42418	6.68E-172	Tpsb2	0	Cpa3	1.32E-122	Cxcl2	0	Skap1	0	Krt14	0	Trbc2	0
2	mt-Co1	7.34E-96	Cpa3	0	Hdc	1.22E-105	Lyz2	0	Smpx	6.24E-268	Krt15	0	Cd7	0
3	mt-Co2	2.67E-95	Hdc	0	Cma1	9.48E-77	Cd74	0	Slc22a3	1.88E-265	Krt5	0	Ltb	0
4	mt-Cytb	6.32E-95	Srgn	0	Tpsb2	4.16E-76	Il1b	0	Cst7	1.10E-254	Tacstd2	0	Il2rb	0
5	mt-Nd2	7.51E-92	Fcer1g	0	Actb	2.48E-58	C1qb	0	Ptpcap	3.10E-246	Ifi202b	0	Cxcr6	0
6	mt-Atp6	7.99E-92	Cyp11a1	0	Ftl1	5.86E-49	Pf4	0	Rgs18	5.58E-241	S100a14	0	Trbc1	0
7	mt-Co3	1.95E-91	Tph1	0	Srgn	7.79E-33	Ccl3	0	Phldb3	1.29E-240	Cldn4	0	Pdcd1	0
8	mt-Nd4	2.43E-91	Csf2rb	0	Apoe	6.22E-28	C1qa	0	Il1rl1	2.58E-231	Ripk4	0	Klrb1b	0
9	mt-Nd1	4.61E-86	Tyrobp	0	Fth1	2.68E-25	Slfn2	0	Tespa1	5.80E-221	Trim29	0	Acpp	0
10	Xrn2	6.46E-69	Arhgdib	0	Gm42418	4.42E-25	Cxcl3	0	Gnaz	2.46E-218	Trp63	0	Ptpn22	0
11	Ddx501	1.03E-66	Tnfrsf9	0	Ube2n	5.72E-25	Tyrobp	0	Maob	6.57E-213	Esrp1	0	Asb2	0
12	Ggnbp2	7.40E-65	Prss34	0	Tmsb4x	1.98E-23	Cd52	0	Prkcb	1.83E-211	Irf6	5.01E-302	Ikzf3	0
13	Rlim	8.51E-64	Serpinb1a	0	Txn2	9.09E-23	Cd14	0	Gpr65	9.37E-211	Ovol1	1.18E-293	Prr29	0
14	Gpatch8	6.77E-63	Calca	0	Tyrobp	2.96E-22	Ccl4	0	Tpsg1	4.15E-203	Krtdap	7.20E-292	Klrd1	0
15	Zfp644	7.16E-63	Rab27b	0	Tmem14c	9.09E-22	C1qc	0	Il4	1.21E-198	Serpinb5	3.38E-290	Cd200r2	0
16	Nrd1	8.11E-63	Rac2	0	Cycs	9.98E-22	Bcl2a1b	0	Tph1	2.69E-198	Gjb6	2.94E-285	Cd160	0
17	Thoc2	1.12E-62	Ifitm1	0	Eif3m	1.92E-21	Ctss	0	Adora3	1.94E-197	Fgfbp1	5.38E-270	Cxcr3	0
18	Ccar1	2.11E-62	Samsn1	0	Ube2j2	9.55E-21	Selenop	0	Prkcq	2.60E-191	Cdh1	1.01E-255	Cd4	0
19	Smchd1	9.16E-62	Hs3st1	0	Fcer1g	1.11E-20	Alox5ap	0	Ap1s3	3.56E-190	Cdcp1	1.54E-227	Sh2d2a	0
20	Sbno1	3.32E-60	Csf2rb2	0	Ninj1	1.91E-20	Clec4e	0	Cd200r3	6.68E-189	Dsc3	4.08E-226	AC163354.1	0

表 5-1. 間葉系細胞クラスターにおいて特異的に発現する遺伝子（クラスター #0~#5）のリスト。p_val_adj は補正した有意確率を示す。

	Cluster #0		Cluster #1		Cluster #2		Cluster #3		Cluster #4		Cluster #5	
	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj
1	Col2a1	2.06E-236	Tnfrsf12a	6.84E-275	Hspa1b	1.34E-202	Top2a	0	Egfl6	0	3110079O15Rik	1.45E-160
2	Col9a3	7.37E-235	Emp1	5.71E-269	Hspa1a	5.06E-188	Stmn1	0	Abi3bp	7.56E-222	Ccng1	2.44E-136
3	Matn1	3.89E-217	Rcan1	9.01E-259	Id3	5.12E-184	Ube2c	0	Gas2	4.32E-202	Anxa8	8.12E-134
4	Col9a2	4.64E-214	Kif21a	2.00E-232	Hspa8	1.38E-171	Hmgb2	0	Aqp1	3.40E-191	Rps27l	2.89E-133
5	Epyc	2.12E-213	Lmna	1.21E-229	Hsp90ab1	6.90E-148	Hist1h2ae	0	Postn	1.69E-182	Lcp1	7.27E-120
6	Col9a1	3.77E-204	Hmga2	1.78E-228	Matn4	4.43E-142	Mki67	0	Gas1	3.06E-179	Ak1	1.10E-107
7	Dlk1	6.14E-195	Srxn1	3.09E-219	Hoxd13	4.43E-117	Birc5	0	Ssc5d	6.47E-177	Cdkn1a	2.69E-106
8	Cnmd	4.69E-184	Fosl1	9.86E-210	Dnaja1	6.54E-107	Pclaf	0	Col3a1	3.45E-171	Fabp7	5.67E-98
9	C1qtnf3	1.82E-175	Camk2d	1.48E-197	Hsp90aa1	1.63E-103	Hist1h1b	0	Lgals1	1.54E-166	Dcxr	7.89E-98
10	Scrg1	3.49E-174	Gprc5a	1.50E-180	Hsph1	7.03E-103	Cenpf	0	Col1a1	3.20E-163	Anxa11	1.47E-93
11	Susd5	9.71E-171	Plaur	9.97E-180	Id1	3.65E-93	Cdca8	0	Col5a2	1.10E-142	Hapln1	2.36E-92
12	Col11a2	1.81E-165	Errfi1	5.59E-168	Tcf4	1.33E-92	Cks2	0	Htra1	1.32E-141	Pcolce2	4.26E-90
13	Slc2a1	3.72E-165	Fam180a	6.94E-163	Ccnd1	5.84E-92	Prc1	0	Scx	2.08E-139	C1qtnf3	2.03E-86
14	Peg3	9.46E-165	Ii11	1.59E-161	Hspe1	1.03E-88	Tpx2	0	Fbn2	5.87E-132	Batf3	4.93E-85
15	Fam162a	2.42E-163	Timp1	2.30E-160	Cpe	6.89E-87	Cenpa	0	Tmsb4x	2.56E-129	Ctsz	1.35E-79
16	Acan	2.04E-161	Ank	5.67E-160	Cthrc1	4.43E-84	Smc4	0	Rbms3	1.17E-128	Scn1b	9.06E-75
17	Nrk	9.35E-153	Sgms2	1.18E-157	Gadd45g	1.68E-81	Smc2	0	Dkk3	5.82E-126	Epyc	2.10E-70
18	Fzd9	1.47E-149	Hmga1	1.39E-156	Bcl2	2.69E-79	Cenpe	0	Col6a2	4.11E-124	Nid2	8.29E-69
19	Plod2	5.16E-148	Atp2b1	1.22E-154	Adgrl3	5.41E-74	Nusap1	0	Sfrp2	8.66E-123	1810058I24Rik	2.55E-65
20	Bnip3	6.88E-146	Rtn4	9.73E-151	Sox4	2.21E-72	Cdca3	0	Col5a1	1.16E-112	Melft	3.24E-65

表 5-2. 間葉系細胞クラスターにおいて特異的に発現する遺伝子（クラスター #6~#10）のリスト。p_val_adj は補正した有意確率を示す。

	Cluster #6		Cluster #7		Cluster #8		Cluster #9		Cluster #10	
	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj	遺伝子名	p_val_adj
1	Aspn	1.38E-298	Uts2b	0	Mcm5	1.32E-153	Barx2	0	Ifitm5	0
2	Alpl	1.85E-256	lhh	1.05E-271	Pclaf	1.11E-150	Atp1a2	0	Alpl	0
3	Mmp9	2.09E-196	Col10a1	6.92E-231	Hells	6.22E-150	Osr1	1.13E-222	Slc13a5	0
4	Podnl1	4.11E-185	Panx3	9.51E-223	Lig1	1.04E-148	Tfap2b	7.74E-198	Car3	0
5	Crabp1	1.62E-170	Baiap2l2	1.85E-187	Clspn	2.01E-141	Btc	4.39E-181	Cfh	0
6	Thbs2	6.68E-154	Mpz	2.14E-162	Cdc6	2.27E-140	Col26a1	1.29E-178	Col22a1	0
7	Col8a2	8.54E-151	Serinc5	3.53E-155	Tcf19	1.23E-132	Sfrp2	5.38E-169	Satb2	0
8	Slc40a1	4.57E-145	Efemp1	8.83E-155	Ccne1	4.41E-132	Pamr1	3.53E-155	Hrc	0
9	Ptprd	1.02E-134	Cd200	8.49E-145	Dhfr	2.69E-128	Creb5	1.18E-151	Col13a1	0
10	Kctd12	2.85E-132	Ttll3	1.24E-134	Chaf1b	1.22E-124	Pdlim3	1.97E-149	Tcf7	0
11	Maf	9.96E-131	Pcsk6	4.08E-134	Mcm3	8.62E-121	Gdf5	3.22E-136	Slc36a2	0
12	Nrp2	2.69E-129	Dach1	9.08E-123	Gins2	9.99E-119	Tenm4	1.88E-135	Dkk1	0
13	Hck	5.46E-125	Sp7	2.38E-118	Tk1	1.62E-109	Hs3st3b1	5.38E-130	Ramp1	0
14	Olfml3	1.27E-120	Pltp	4.70E-111	Mms22l	8.36E-108	Sulf1	5.16E-119	Insc	0
15	Loxl1	4.62E-119	Smim5	1.44E-109	Chaf1a	9.08E-106	Hs3st3a1	3.02E-118	Mlip	0
16	Tbx2	1.51E-114	Nim1k	8.70E-109	Gmnn	1.56E-102	Ssc5d	6.50E-118	Entpd3	0
17	Col1a1	2.30E-114	Agtr1a	4.26E-108	Cenph	2.84E-102	Irx1	1.80E-116	Chst13	0
18	Mafb	1.00E-112	Cpa6	4.28E-105	Tyms	9.27E-99	Nbl1	1.21E-114	Dapk2	0
19	Ppfibp2	3.39E-111	Pth1r	6.01E-104	Uhrf1	2.36E-98	Kcnj15	1.14E-106	Enpp6	0
20	Marcks	9.61E-111	Mef2c	3.96E-103	E2f1	2.88E-97	Tgfbi	2.68E-105	Adamts18	0

表 6 間葉系細胞のクラスタリングと細胞アノテーション

Col1a1	Sox9	Col11a2	クラスター	細胞種	細胞数
Col1a1 (±)	Sox9 (++)	Col11a2(±)	9	表層軟骨細胞	182
		Col11a2 (+++)	1	静止軟骨細胞 1	943
			0	静止軟骨細胞 2	1342
			5	静止軟骨細胞 3	362
			8	増殖軟骨細胞 1	222
			3	増殖軟骨細胞 2	574
		Col11a2 (++)	2	インターゾーン細胞	927
			7	前肥大化/肥大化 軟骨細胞	225
Col1a1 (+)	Sox9 (+)	Col11a2 (±)	4	軟骨膜細胞、 インターゾーン細胞	492
			6	未熟骨芽細胞	274
		Col11a2 (++)	10	骨芽細胞	54
		合計			5597

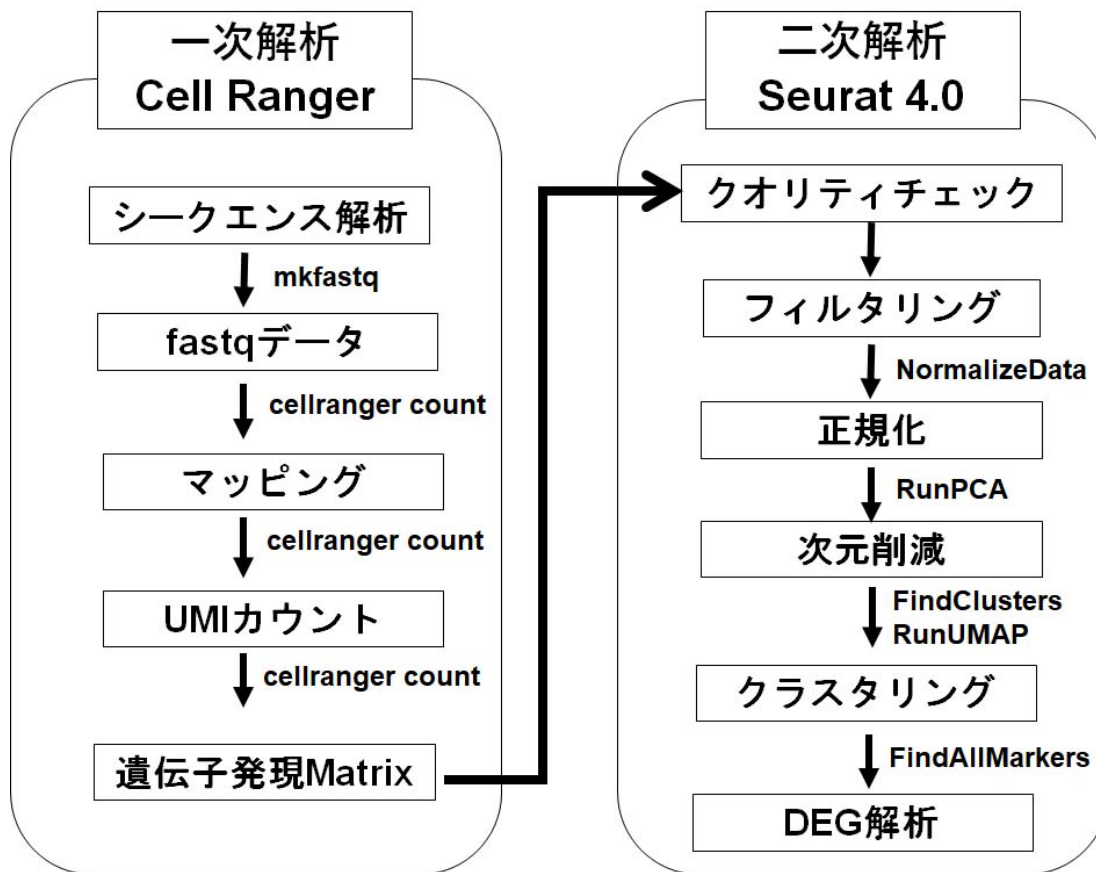


図 1. scRNA-seq 解析のワークフロー

次世代シーケンサーによって得られたシーケンスデータは、Cell Ranger による一次解析と Serurat 4.0 による二次解析を行い、細胞クラスタリングと細胞クラスター特異的発現変動遺伝子の抽出を行った。DEG : Differentially Expressed Gene

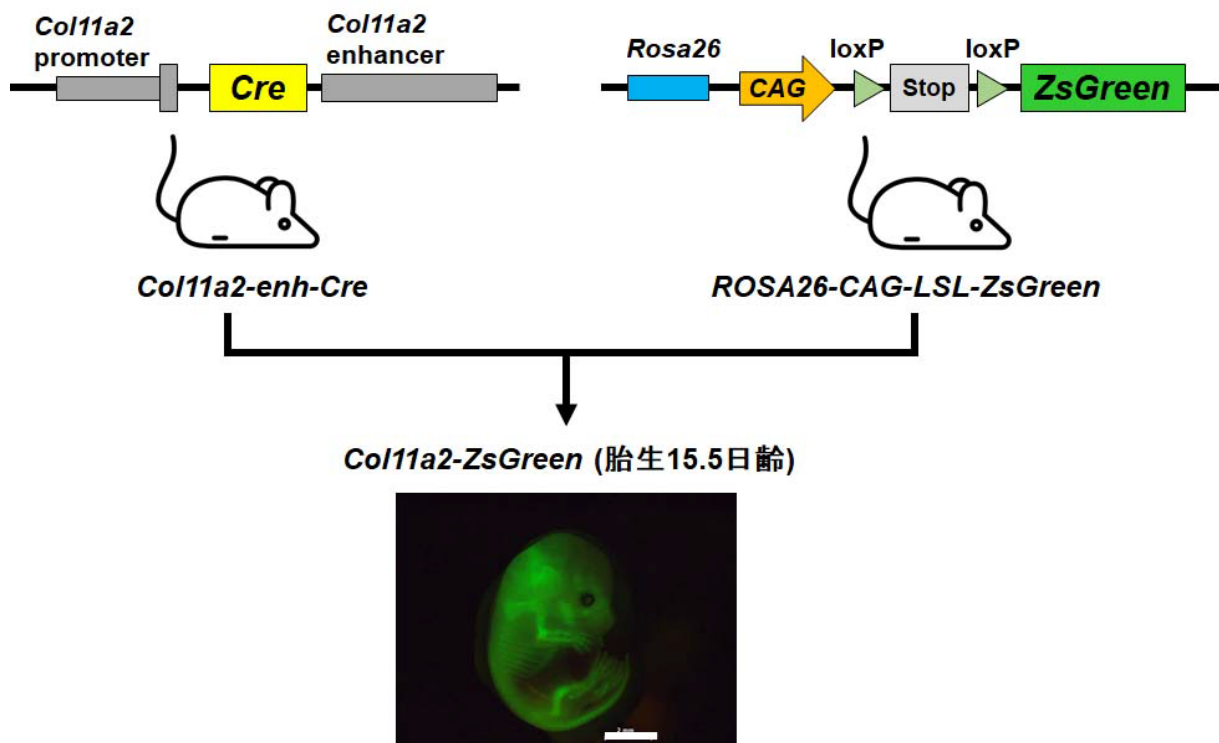
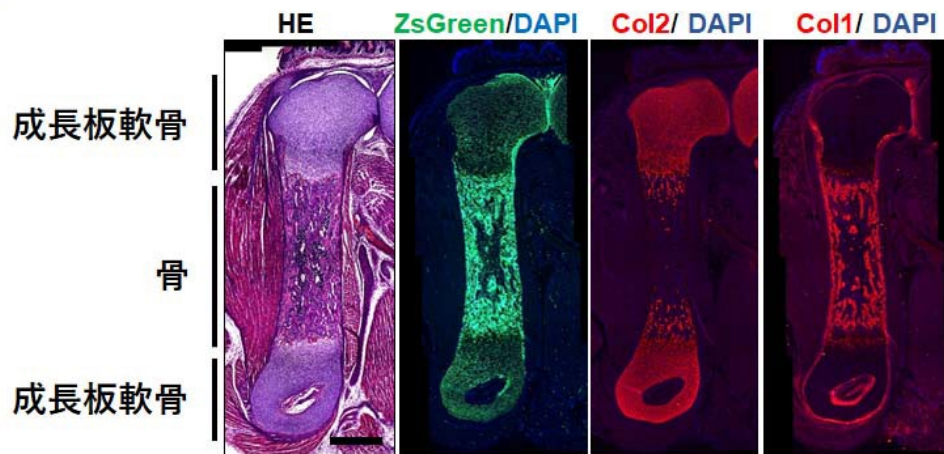


図 2.軟骨細胞レポーターマウスの作製

Col11a2-enh-Cre マウスと *ROSA26-CAG-LSL-ZsGreen* を交配させて *Col11-ZsGreen* マウスを作出した。図は胎生 15.5 日齢の蛍光実体顕微鏡像を示す。スケールバー:1mm

A



B

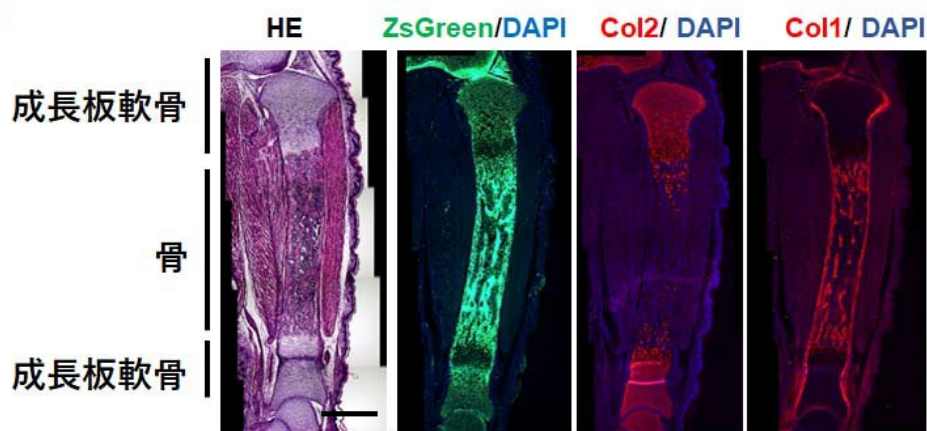


図 3. 生後 0 日齢マウスの大腿骨(A)および脛骨(B)における ZsGreen の発現と免疫組織化学的検討
 生後 0 日齢マウスから大腿骨(A)ならびに脛骨(B)を採取し HE 染色、ZsGreen の発現検討、抗 II 型
 コラーゲン(Col2)抗体および抗 I 型コラーゲン(Col1)抗体を用いた免疫染色を行った。スケールバ
 ー : 500 μ m

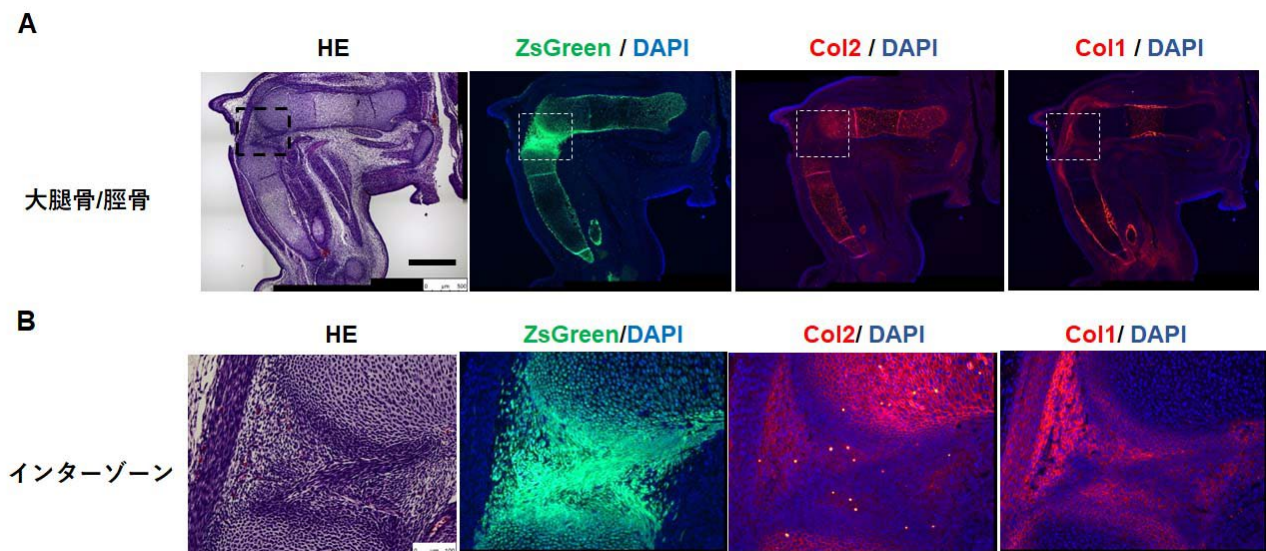


図 4. 胎生 15.5 日齢マウスの下肢ならびに膝関節のインターゾーン領域における ZsGreen の発現と免疫組織化学的検討

(A、B)胎生 15.5 日齢マウスから下肢を採取し、HE 染色、ZsGreen の発現、抗 II 型コラーゲン(Col2)抗体および抗 I 型コラーゲン(Col1)抗体を用いた免疫染色を行った。スケールバー：500 μ m (B)は(A)の点線で囲まれたインターゾーン領域の強拡大像を示す。スケールバー：100 μ m

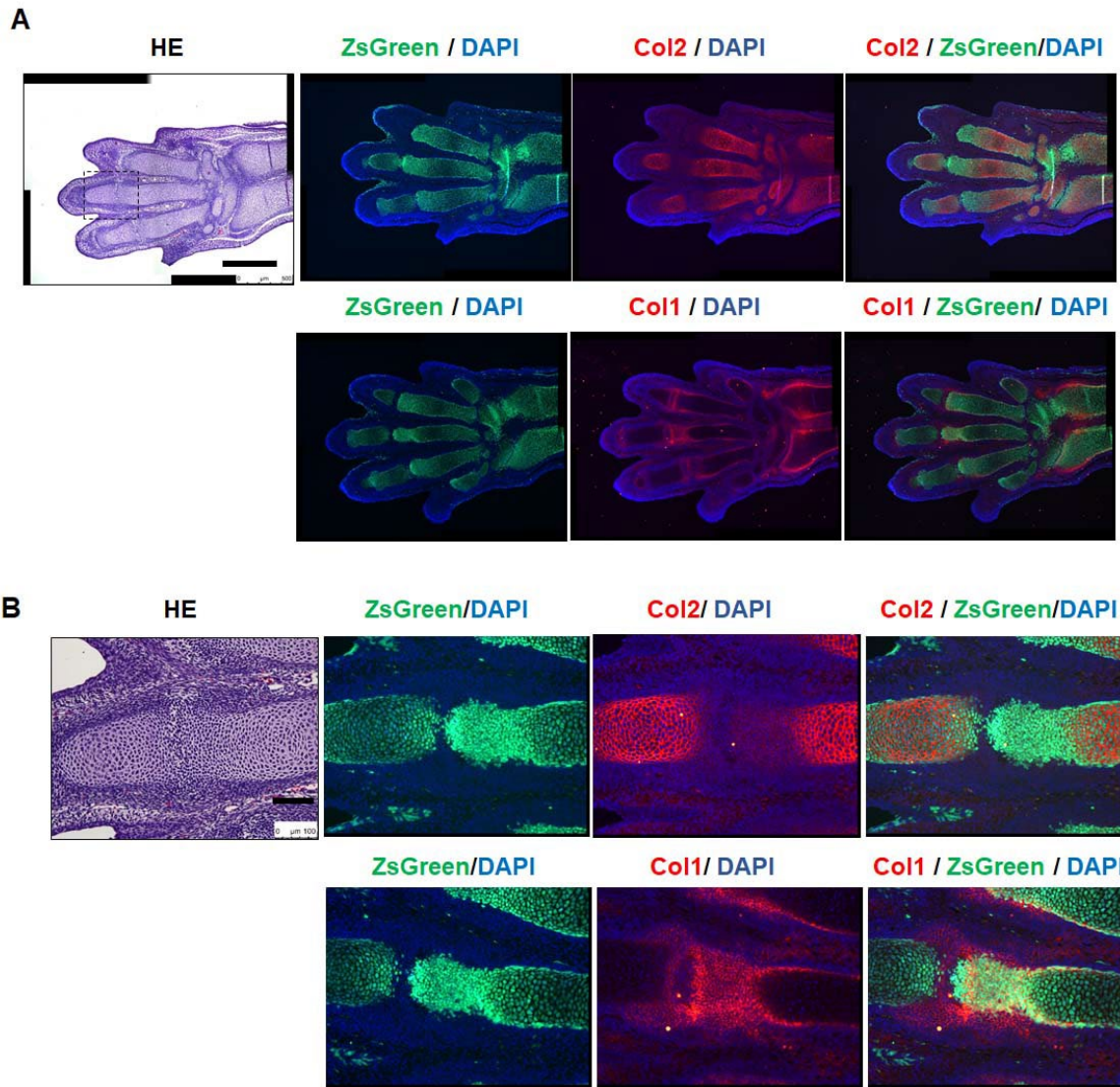


図 5. 胎生 15.5 日齢マウスの手ならびに指関節のインターゾーン領域における ZsGreen の発現と免疫組織化学的検討

(A、B)胎生 15.5 日齢マウスから手を採取し、HE 染色、ZsGreen の発現、抗Ⅱ型コラーゲン(Col2)抗体および抗Ⅰ型コラーゲン(Col1)抗体を用いた免疫染色を行った。(B)は(A)の点線で囲まれた指関節のインターゾーン領域の強拡大像を示す。スケールバー：(A) 500μm, (B) 100μm

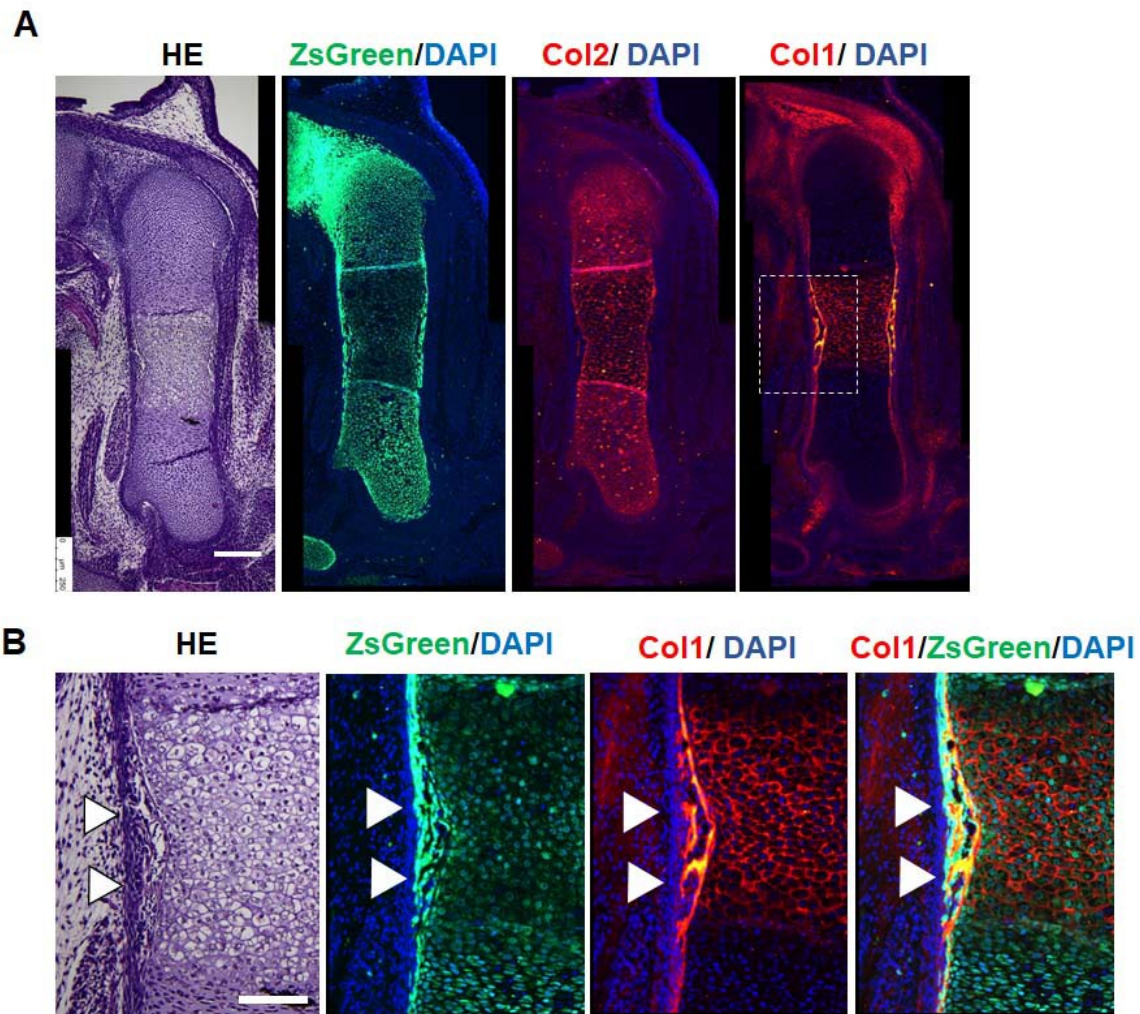


図 6. 胎生 15.5 日齢マウス大腿骨の骨芽細胞における ZsGreen の発現と免疫組織化学的検討

(A、B)胎生 15.5 日齢マウスから大腿骨を採取し、HE 染色、ZsGreen の発現、抗 II 型コラーゲン (Col2)抗体および抗 I 型コラーゲン(Col1)抗体を用いた免疫染色を行った。(B)は(A)の点線で囲まれた軟骨膜の強拡大像を示す。矢頭は Col1 陽性の骨芽細胞を示す。スケールバー：250μm

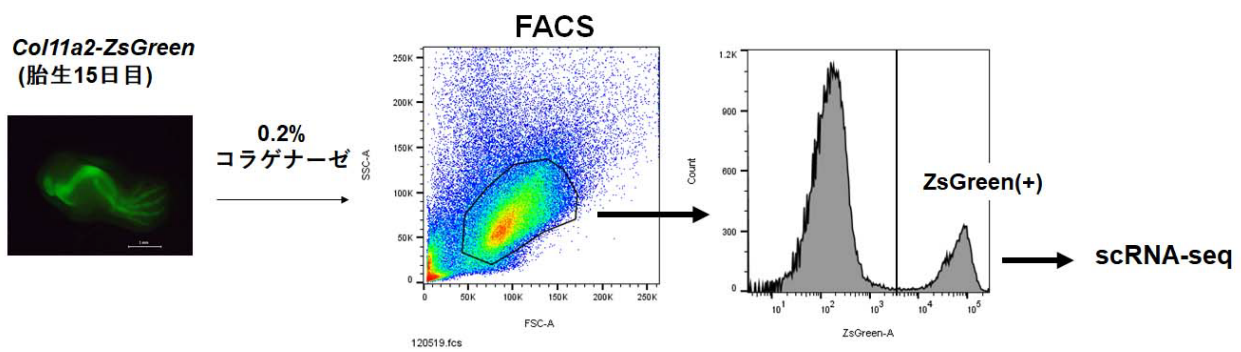


図 7. ZsGreen 陽性細胞の単離

胎生 15.5 日齢の *Col11a2-ZsGreen* マウスより上肢および下肢を回収し 0.2%コラゲナーゼを用いて細胞分散を行った後、FACS Aria を用いて ZsGreen 陽性細胞のセルソーティングを行った。

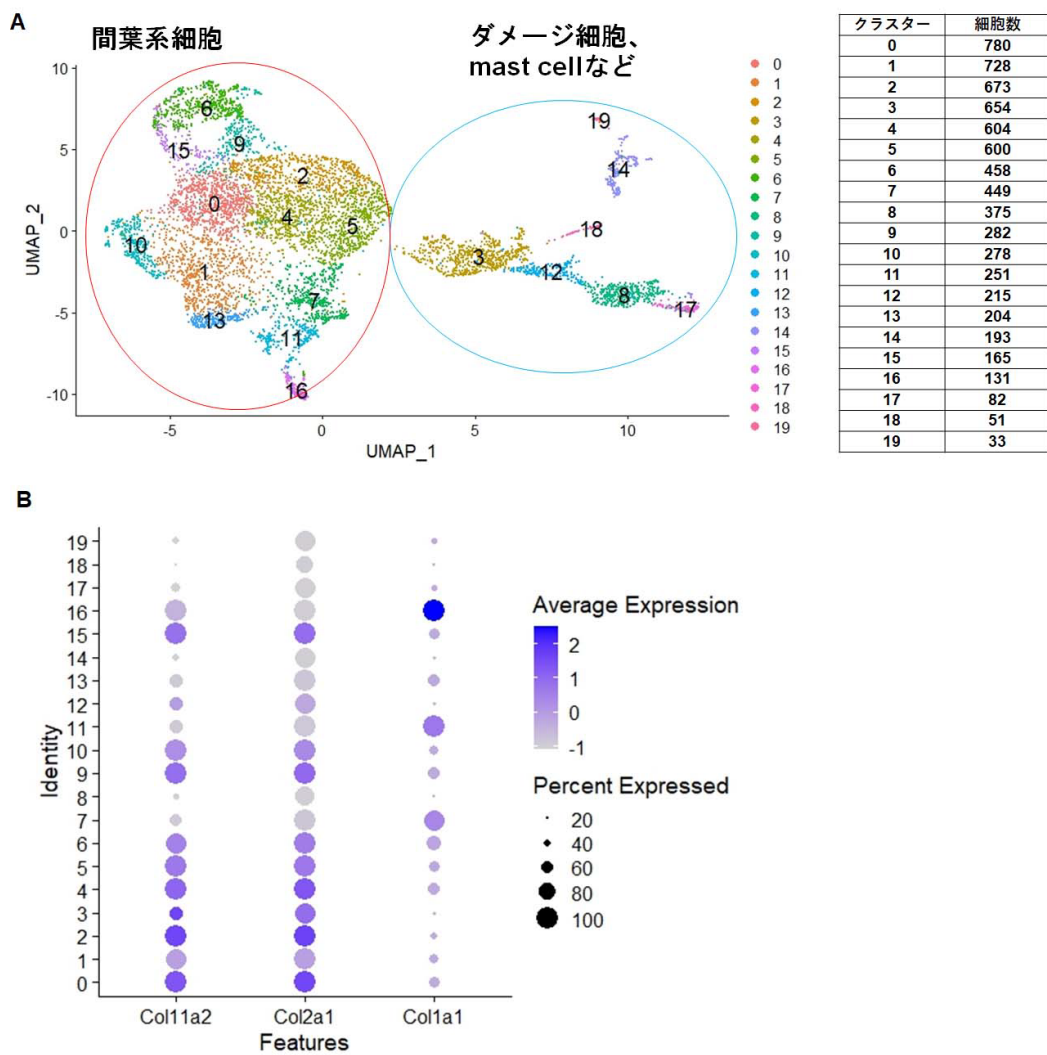


図 8. 全ての ZsGreen 陽性細胞のクラスタリングと遺伝子発現

(A) ZsGreen 陽性細胞を 10x Chromium システムを用いて scRNA-seq 解析を行った後、UMAP による二次元プロットを行った。表は各クラスターに含まれる細胞数を示す。(B) *Col11a2*, *Col2a1* および *Col1a1* のドットプロット。ドットプロットの大きさは各遺伝子を発現する細胞の割合を、青色の濃さは遺伝子発現量の平均を示す。

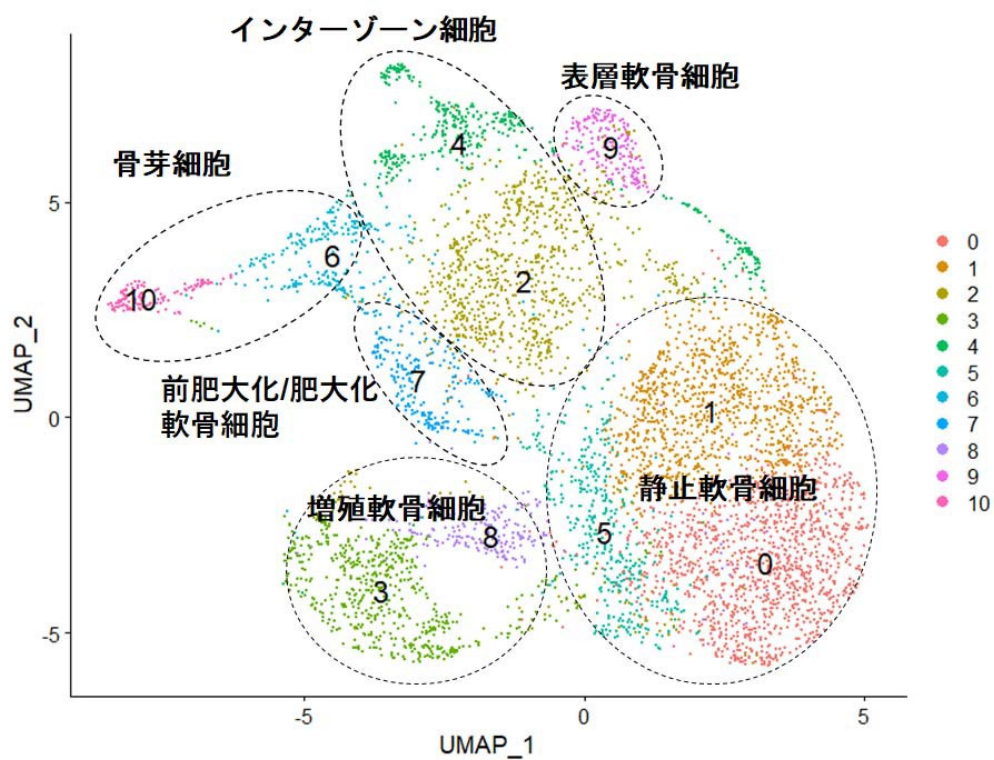


図 9. ZsGreen 陽性間葉系細胞のクラスタリング

ZsGreen 陽性の間葉系細胞を抽出し再クラスタリングを行い、UMAP による二次元プロットを行った。

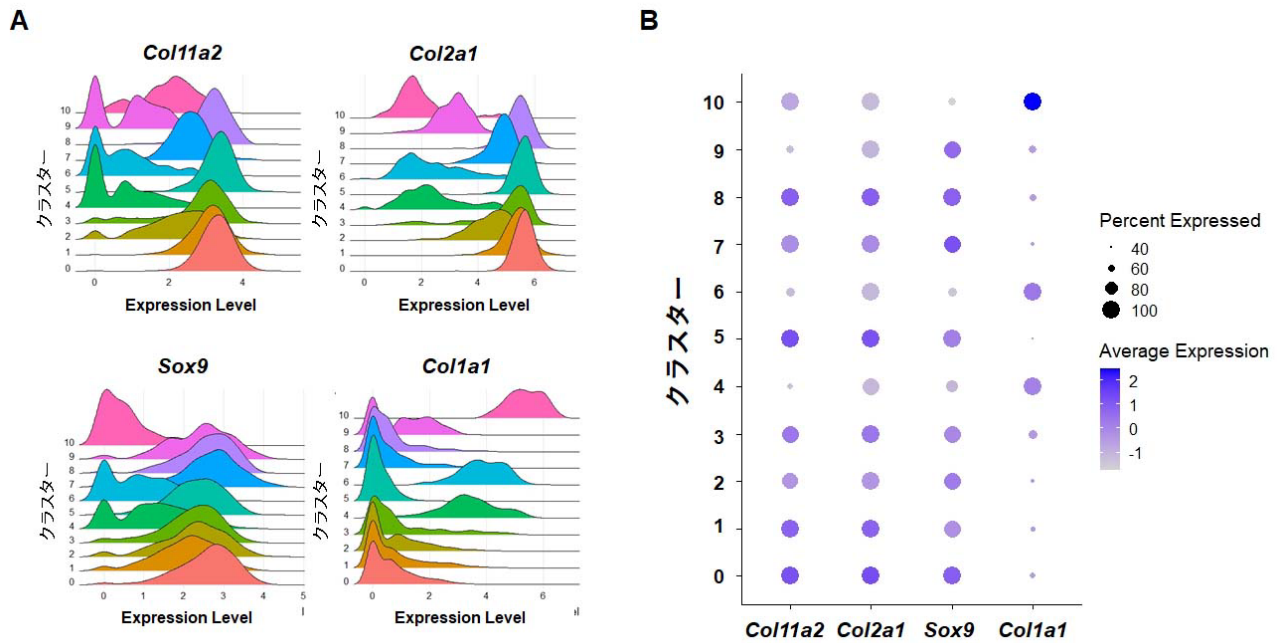


図 10. 細胞クラスターにおける *Col11a2*, *Col2a1*, *Col1a1* および *Sox9* 遺伝子発現量の比較

各細胞クラスターにおける *Col11a2*, *Col2a1*, *Col1a1* および *Sox9* 遺伝子の発現をリッジプロット (A) ならびにドットプロット(B)で視覚化した。(A)リッジプロットの横軸は遺伝子発現量を、プロットの高さは細胞数を示す。(B)ドットプロットの大きさは各遺伝子を発現する細胞の割合を、青色の濃さは遺伝子発現量の平均を示す。

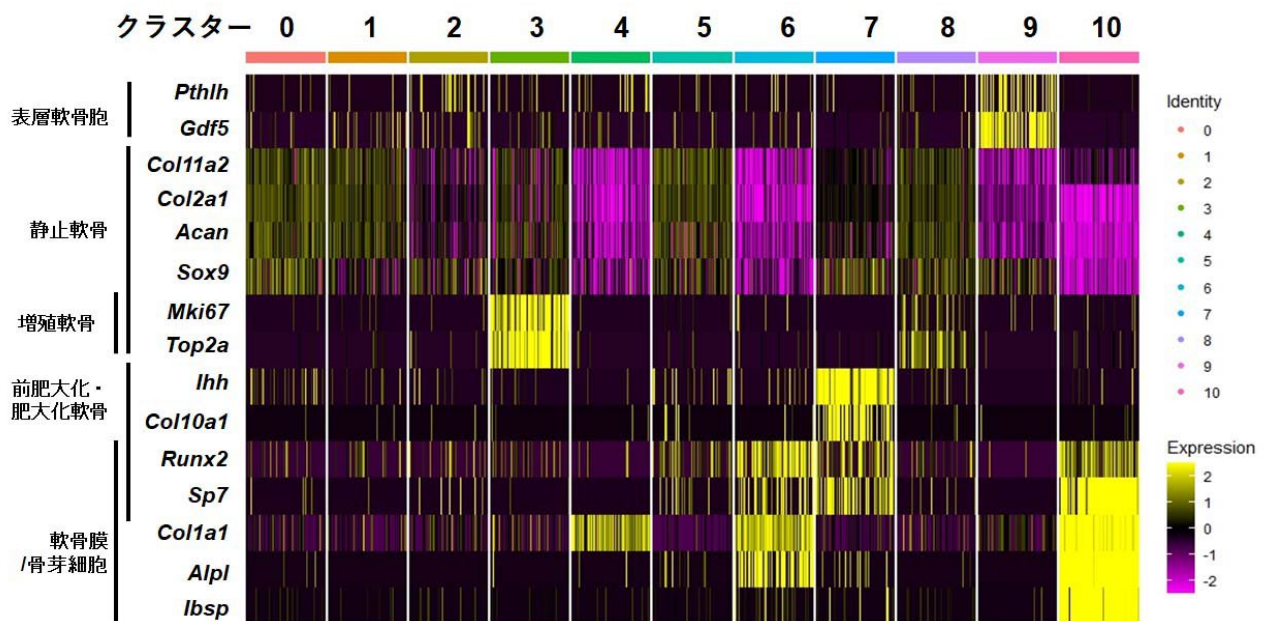


図 11. 細胞クラスターにおける軟骨細胞および骨芽細胞マーカー遺伝子のヒートマップ

それぞれの細胞クラスターにおける軟骨細胞および骨芽細胞マーカー遺伝子発現をヒートマップで可視化した。

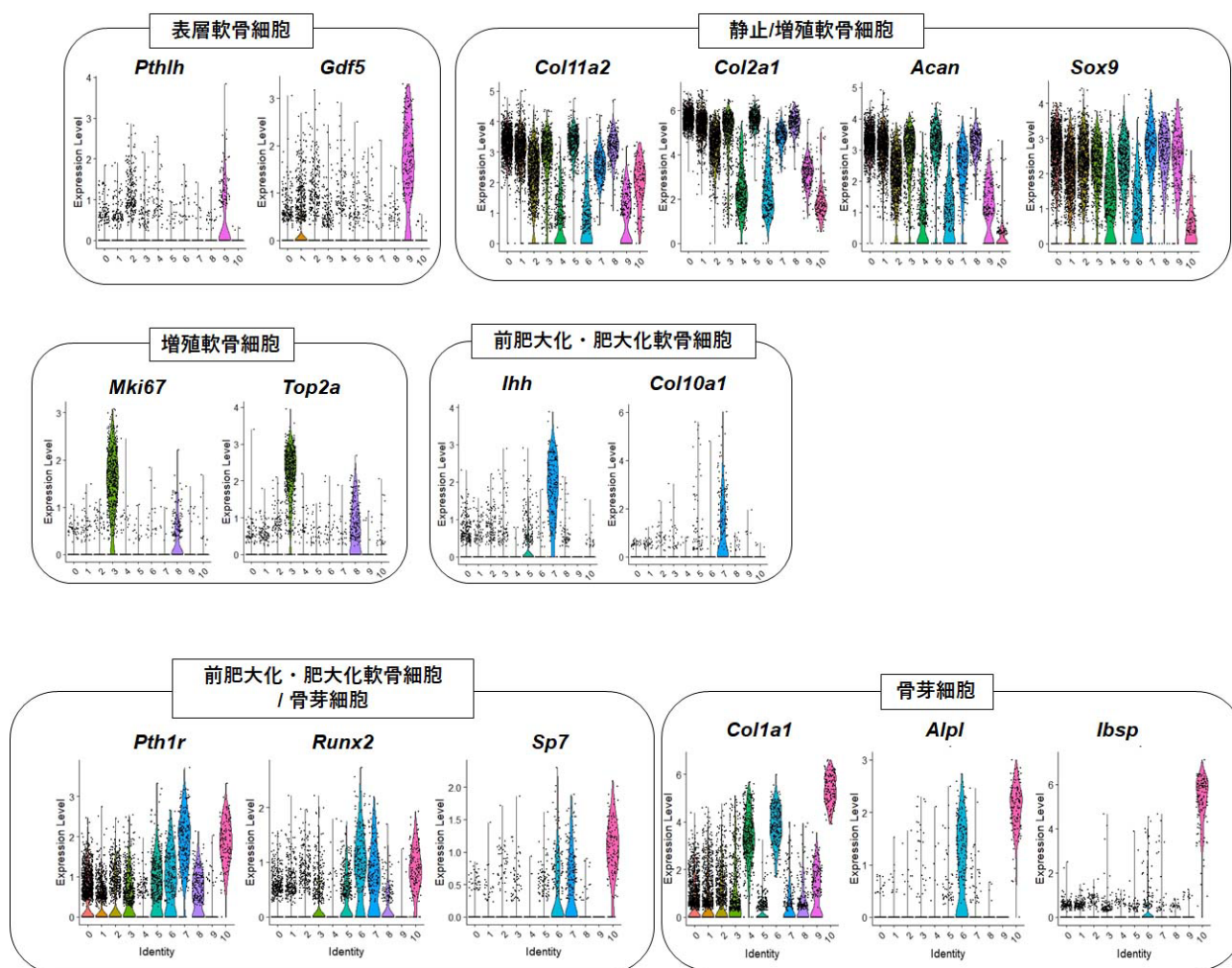


図 12. 各細胞クラスターにおける軟骨細胞および骨芽細胞マーカー遺伝子のバイオリンプロット
バイオリンプロットの縦軸は遺伝子発現量(Expression Level)、横軸は細胞クラスター番号を示す。
図中にプロットされた個々のプロットは細胞を示し、バイオリンの型で表されるグラフの横幅はプロットされた細胞密度を示す。

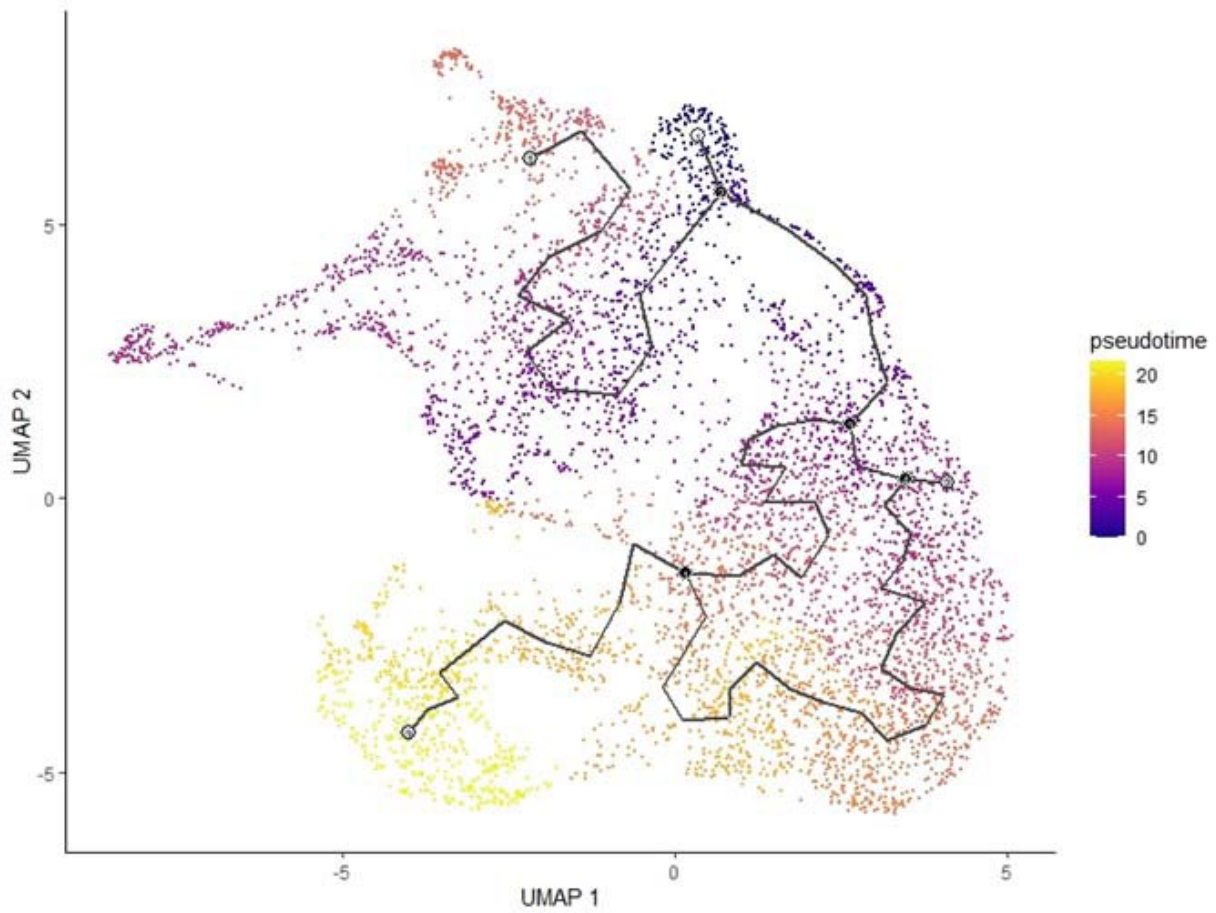


図 13 擬似時間軸の設定と軟骨細胞分化の軌道解析

Monocle3 のアルゴリズムを用いて次元削減された二次平面上で擬似時間軸を設定し、軟骨細胞分化の軌道解析を行った。

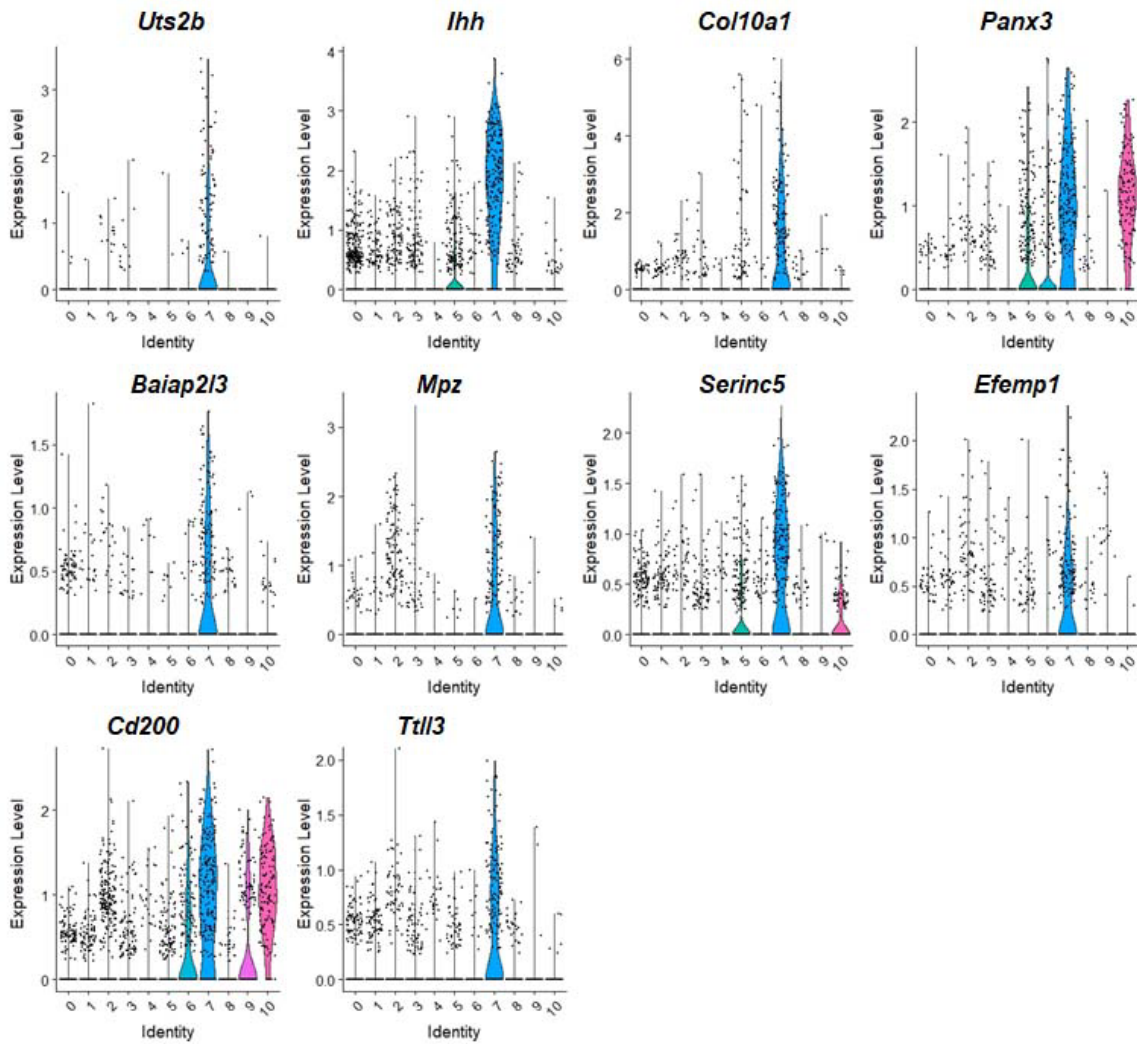


図 14. クラスター7 に特異的な遺伝子のバイオリンプロット

バイオリンプロットの縦軸は遺伝子発現量(Expression Level)、横軸は細胞クラスター番号を示す。図中にプロットされた個々のプロットは細胞を示し、バイオリンの型で表されるグラフの横幅はプロットされた細胞密度を示す。

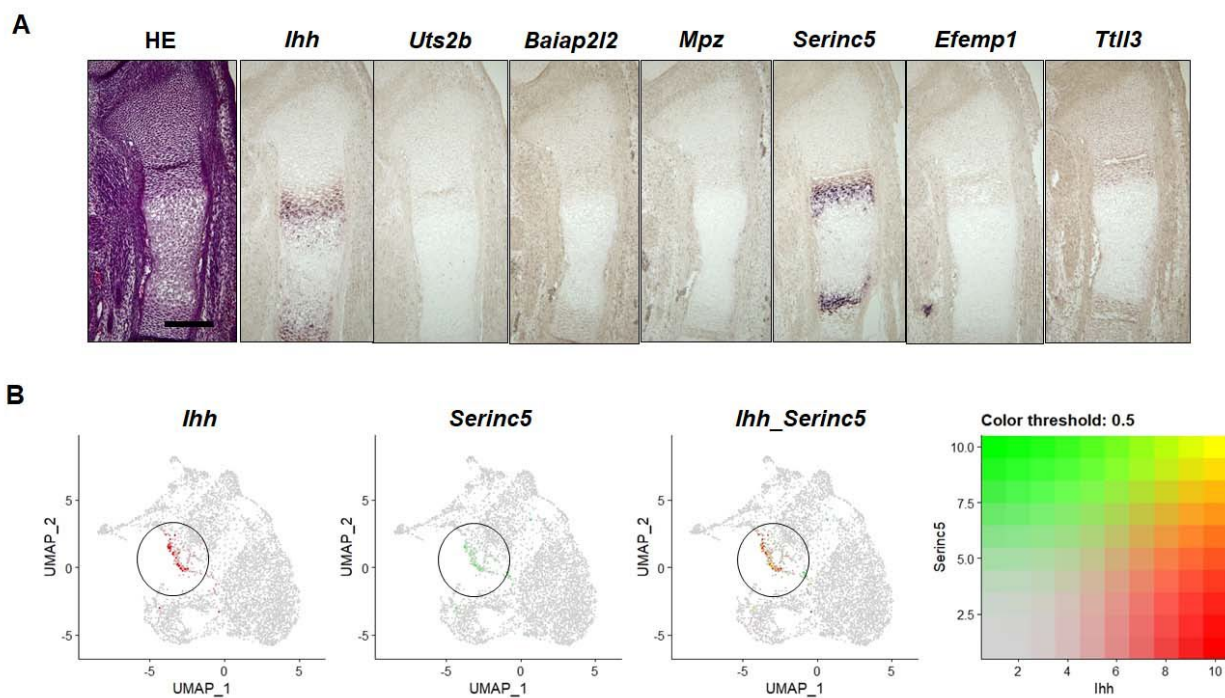


図 15. 前肥大化軟骨細胞における *Serinc5* の発現

(A) In situ ハイブリダイゼーション法により、胎生 15.5 日齢のマウス脛骨成長板軟骨における *Ihh* ならびにクラスター7 に特異的な遺伝子群の mRNA の発現を検討した。左パネルは H&E 染色像を示す。スケールバー： 200mm (B)フィーチャープロットにより *Ihh* および *Serinc5* の発現分布を可視化した。丸で囲った細胞群において *Ihh* と *Serinc5* のオーバーラップが認められる。

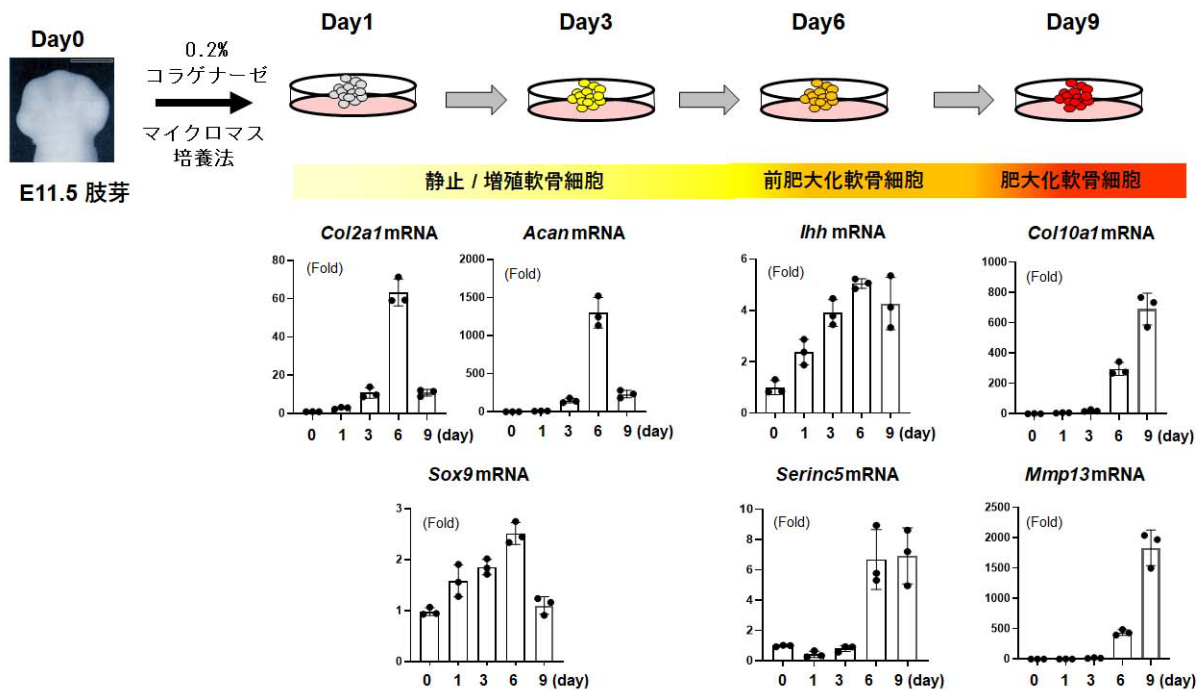


図 16. マイクロマス培養における軟骨細胞分化マーカー遺伝子ならびに **Serinc5** の発現変動

マウス胎児肢芽細胞を用いたマイクロマス培養を行い、0 日目、1 日目、3 日目、6 日目、9 日目に RNA を精製し逆転写反応で cDNA を作製後、図に示す各遺伝子特異的 Taqman probe を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子発現量は β アクチンの発現量で補正し、0 日目の発現量の倍数で示した。データは平均値及び標準偏差を示す。(n=3)

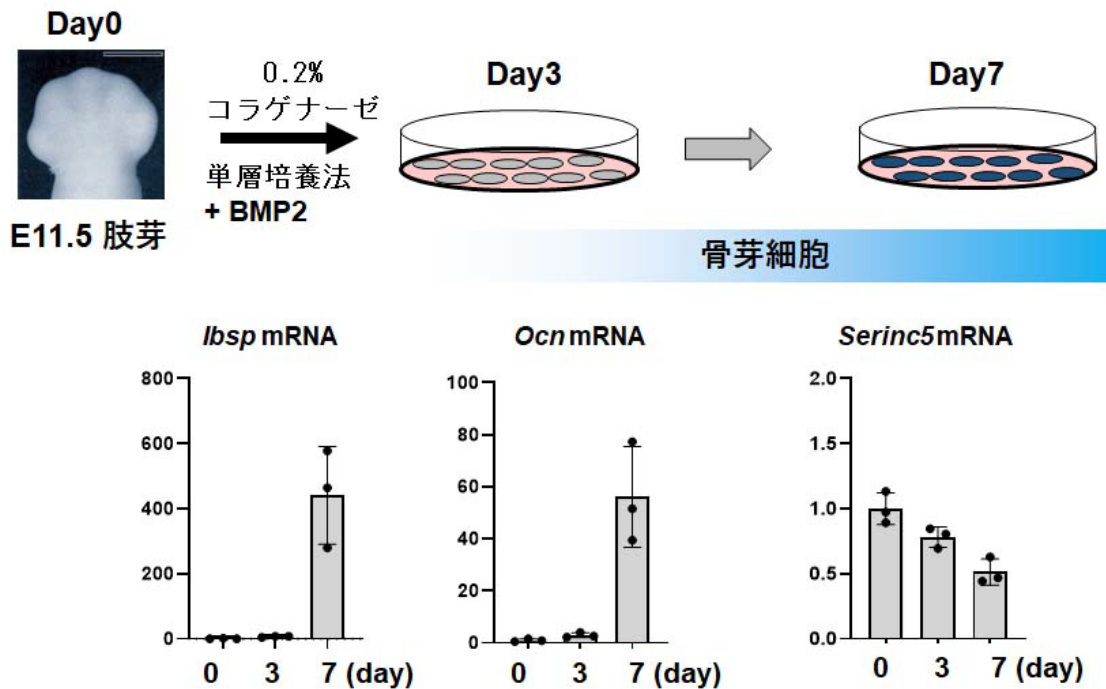


図 17. 単層培養における骨芽細胞分化マーカー遺伝子ならびに *Serinc5* の発現変動

マウス胎児肢芽細胞を用いた単層培養を BMP2 存在下で行い、0 日目、3 日目、7 日目に RNA を精製し逆転写反応で cDNA を作製後、図に示す各遺伝子特異的 Taqman probe を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子発現量は β アクチンの発現量で補正し、0 日目の発現量の倍数で示した。データは平均値及び標準偏差を示す。(n=3)

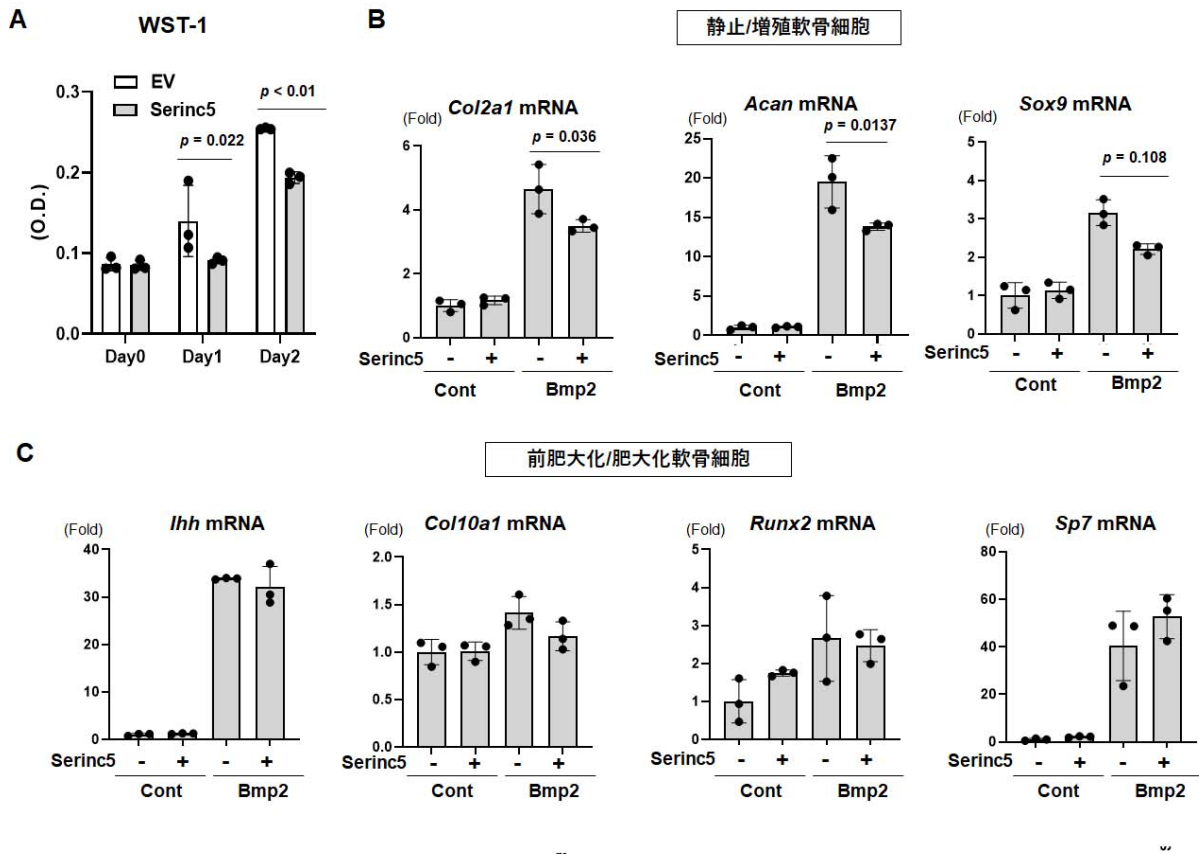


図 18. 軟骨細胞の増殖ならびに遺伝子発現に対する Serinc5 の効果

(A)初代培養軟骨細胞にレンチウィルスを用いて Serinc5 を遺伝子導入し、48 時間培養した。その後、5000 個/ウェルで 96 ウェルプレートに播種した後、24, 48 時間培養し WST-1 を用いて増殖能を評価した。値は吸光度の平均値および標準偏差を示す (B、C) 初代培養軟骨細胞に Serinc5 発現ベクターまたはコントロールとして空ベクター(EV)を用いて作製したレンチウィルスに感染させ 48 時間培養した。その後リコンビナント BMP2 を添加して 48 時間培養した後に RNA を精製し逆転写反応で cDNA を作製後、図に示す静止/増殖軟骨細胞のマーカー遺伝子 (B) ならびに前肥大化/肥大化軟骨細胞のマーカー遺伝子 (C) に特異的 Taqman probe を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子発現量は β アクチンの発現量で補正し、EV を感染させた無処理の初代培養軟骨細胞の発現量の倍数で示した。データは平均値及び標準偏差を示す。(n=3)

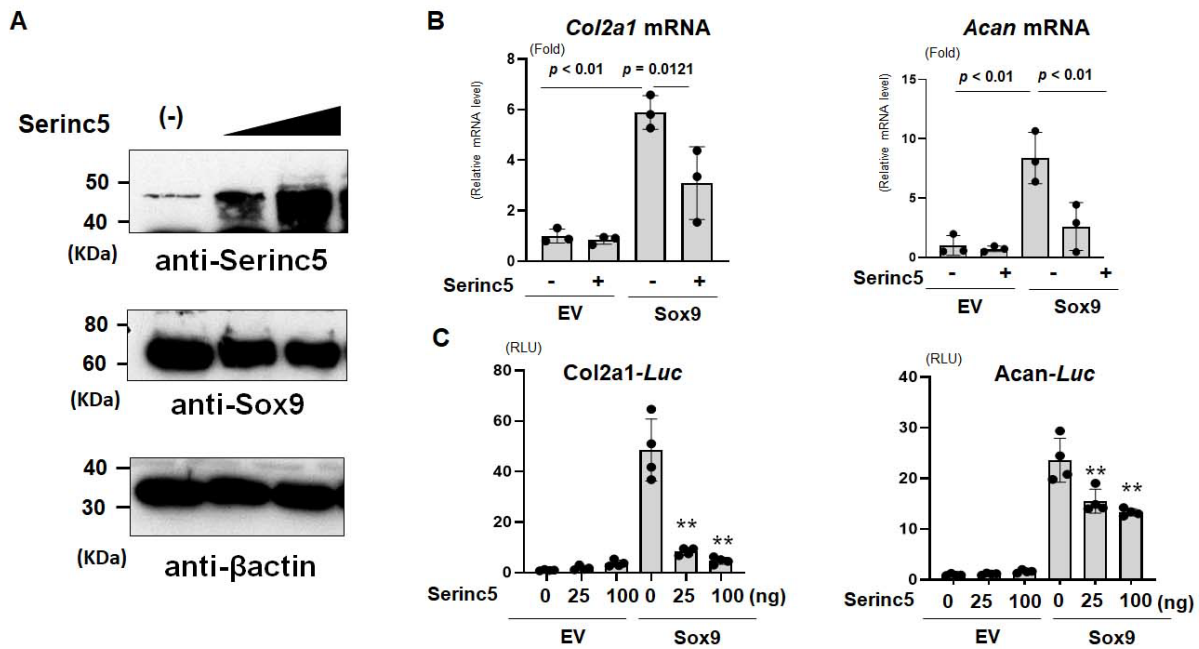


図 19. Sox9 の発現および転写活性に対する Serinc5 の効果

(A) 初代培養軟骨細胞にレンチウィルスを用いて Serinc5 を遺伝子導入し、48 時間後に全細胞タンパク溶解液を回収し、抗 Serinc5 抗体(パネル上段)、抗 Sox9 抗体(パネル中段)および抗 β -アクチン抗体(パネル下段)を用いたウェスタンブロッティングを行った。(B) 初代培養軟骨細胞に Serinc5 発現ベクター、コントロールとして空ベクター(EV)を用いて作製したレンチウィルスに感染させ 48 時間培養した。その後コントロールアデノウィルスまたは Sox9 アデノウィルスに感染させ 48 時間培養した後に RNA を精製し逆転写反応で cDNA を作成後、図に示す各遺伝子特異的 Taqman probe を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子発現量は β アクチンの発現量で補正し、無処理の初代培養軟骨細胞の発現量の倍数で示した。アデノウィルスの感染は M.O.I. 20 にて行った。データは平均値及び標準偏差を示す。(n=3) (C) C3H10T1/2 細胞に Col2a1 遺伝子のエンハンサー領域または Acan 遺伝子のエンハンサー領域を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子、および図に示す容量の Serinc5 遺伝子ベクターを遺伝子導入し、48 時間培養しルシフェラーゼアッセイを行った。データは平均値及び標準偏差を示す。(n=4) **:p<0.01 (vs Sox9 - Serinc5 0ng)

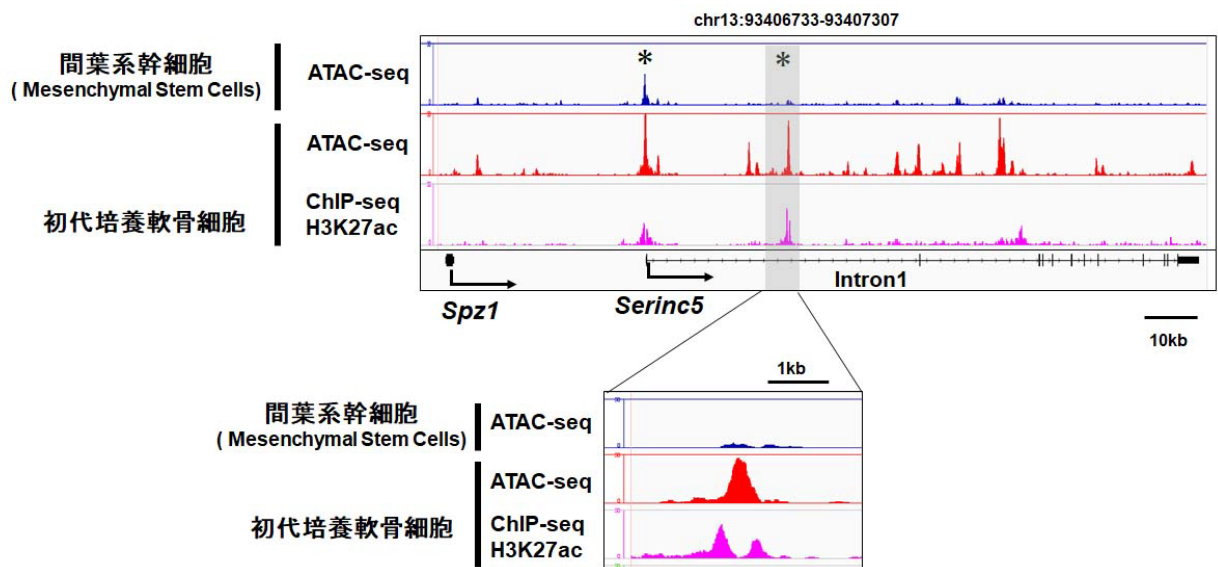


図 20. *Serinc5* 遺伝子およびその近傍のゲノム領域における ATAC-seq および ChIP-seq プロファイル

間葉系幹細胞ならびに初代培養軟骨細胞における、*Serinc5* 遺伝子およびその近傍のゲノム領域における ATAC-seq と ChIP-seq プロファイルを示す。アスタリスクは初代培養軟骨細胞で強いピークが検出された ATAC-seq 領域を示す。上段のグレーで示されたゲノム領域を拡大したプロファイルを下段に示す。

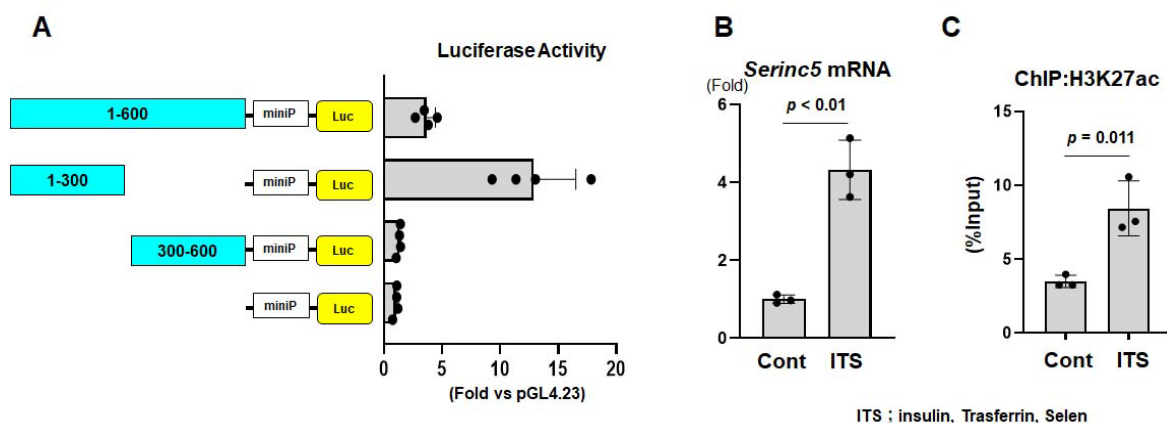


図 21. イントロン 1 に存在する *Serinc5* 遺伝子エンハンサー(*Serinc5-Enh*)の解析

(A) *Serinc5* 遺伝子のイントロン 1 に局在するエンハンサー活性に重要な領域の解析。図に示す *Serinc5-Enh* を分割して組み込んだレポーター遺伝子を作製し初代培養軟骨細胞に遺伝子導入した。48 時間後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーターにてレポーター活性を測定した。データは平均値および標準偏差を示す (n=4)。(B) 無添加の ATDC5 細胞 (Control) あるいは ITS を添加し 2 週間培養した ATDC5 細胞(ITS) から RNA を回収し、逆転写反応で cDNA を作製後、*Serinc5* 遺伝子に特異的 Taqman probe を用いて real time PCR を行った。遺伝子発現量は β アクチンの発現量で補正し、無添加の ATDC5 細胞の発現量の倍数で示した。データは平均値および標準偏差を示す(n=3)。(C) ATDC5 細胞を無添加 (Control) あるいは ITS にて 2 週間培養した後、抗 H3K27ac 抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP)を行った。ChIP サンプルを、*Serinc5-Enh* を特異的に認識するプライマーを用いて real time PCR を行った。データは Input 量にて補正したパーセントの平均値および標準偏差を示す(n=3)。ITS ; insulin, trasferrin, selen

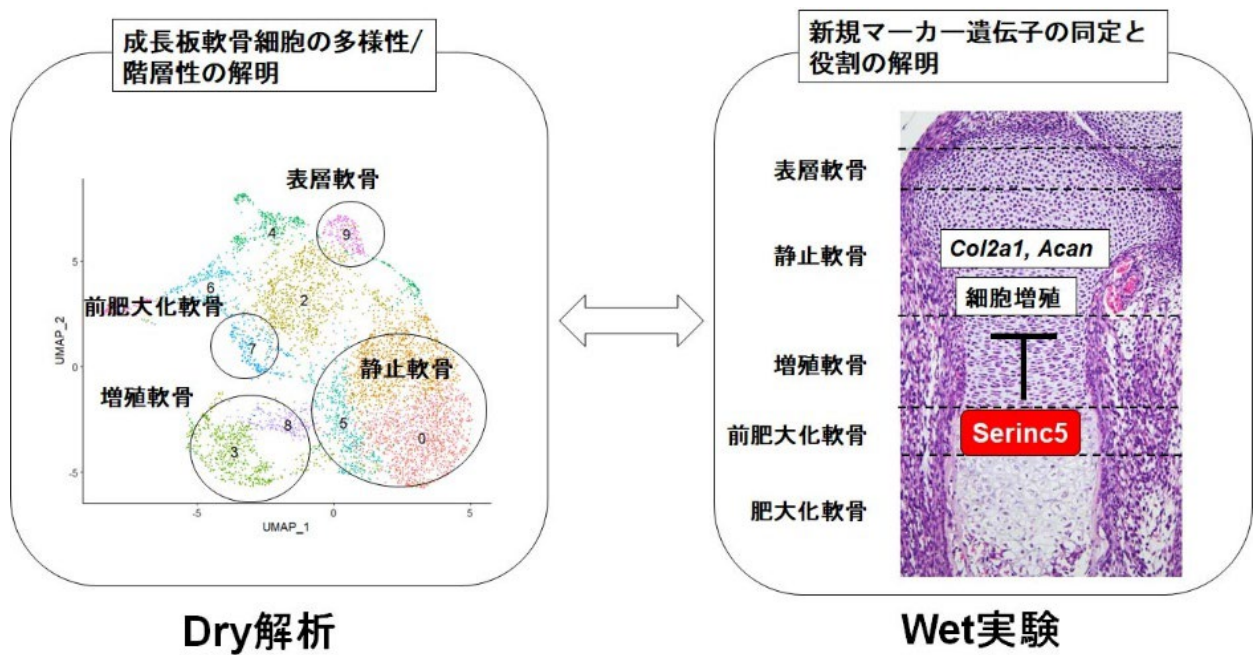


図 22. 本研究で明らかとなった成長板軟骨細胞の多様性と **Serinc5** の役割

scRNA-seq による Dry 解析により、成長板軟骨細胞を7つのクラスターに分類し、それぞれのクラスターにおける特異的遺伝子ならびに分化の階層性を明らかにした。さらに、前肥大化軟骨細胞の新規マーカー遺伝子として **Serinc5** を同定し、**Serinc5** は軟骨細胞の増殖と **Sox9** の転写活性を阻害することで増殖軟骨細胞の機能を抑制し、成長板軟骨細胞を制御していることが明らかとなった。