The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨格発生プログラムの理解に向けたアプローチ : ゲノム局所から全体像へ・マウスからヒトへ・組織から単一細胞へ
Author(s)	大庭, 伸介
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2023, 67(2), p. 5-10
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/97682
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

阪大歯学誌　67(2)：5 ～ 10，2023

骨格発生プログラムの理解に向けたアプローチ

―ゲノム局所から全体像へ・マウスからヒトへ・組織から単一細胞へ―

大庭　伸介*

（令和５年４月５日受付）

はじめに

骨格系は支持組織として我々の体を支え，運動の根幹をなす。また，カルシウム・リンの貯蔵庫として成体におけるカルシウム・リン代謝に重要な役割を果たすほか，造血に必要な骨髄環境を提供する。脊椎動物の骨は，発生学的に３つの異なる由来（神経堤，沿軸中胚葉，側板中胚葉）を有する[1)]。神経外胚葉に由来する神経堤は，頭蓋顎顔面の多くの骨（顔面骨，前頭骨，側頭骨鱗部，蝶形骨大翼・小翼）と鎖骨及び肩甲骨の一部を生じる[1)]。沿軸中胚葉は体節を経て椎板と皮筋板を生じる。このうち椎板が頭蓋顎顔面の一部の骨（頭頂骨，後頭骨，側頭骨岩様部・錐体部，蝶形骨体）と軸骨格（椎骨，肋骨，肩甲骨の大部分）を生じる[1)]。側板中胚葉は喉頭軟骨，鎖骨の一部，胸骨，寛骨，四肢の長管骨を生じる[1)]。このように異なる由来から生じた骨格原器は，膜内骨化，軟骨内骨化のいずれかによって骨を形成する。膜内骨化では間葉系細胞から骨芽細胞が生じ，骨形成が進行する。膜内骨化によって，頭蓋冠と多くの顔面骨のほか，蝶形骨大翼・小翼，側頭骨鱗部，下顎骨体そして鎖骨の一部が形成される[1,2)]。一方，軟骨内骨化では骨軟骨前駆細胞から軟骨細胞と骨芽細胞が作られ，軟骨形成と骨形成が協調して進む。軟骨内骨化は後頭骨，蝶形骨体，側頭骨岩様部，下顎頭，鎖骨の一部，椎骨，胸骨，肋骨，寛骨，四肢の長管骨でみられる[1,2)]。

軟骨内骨化においては，凝集した間葉に存在する骨軟骨前駆細胞から骨芽細胞系統と軟骨細胞系統へと運命が分かれ，それぞれの系統の分化が進む。骨芽細胞への運命決定後の分化については，骨化様式によらず共通のプロセスをたどると考えられる。骨芽細胞分化においては転写因子 Runx2（runt-related transcription factor 2）と Sp7 が[3-5)]，軟骨細胞分化では転写因子 Sox9（SRY-box containing gene 9）がマスター制御因子とされる[6,7)]。骨格発生におけるこれらの因子の重要性については，主に遺伝子改変マウスの解析から明らかとなっており，その作用機序についても分子生物学的・生化学的アプローチによって多くの知見が得られている[5,7)]。しかしながら，骨芽細胞と軟骨細胞への運命決定に関わる転写因子群の相互作用（遺伝子制御ネットワーク）や，各段階で特異的な転写因子群の作動様式の全体像については未だ不明な点が多い。

1957 年に Conrad H. Waddington は，「エピジェネティックランドスケープ」という概念を提唱し，遺伝子発現制御が個体発生における細胞運命決定の根幹であることを視覚的に説明した[8)]。さらに 1969 年には，Roy J. Britten と Eric H. Davidson が「遺伝子発現を制御するネットワーク」の存在を提唱した[9)]。従来からのゲノム局所での解析に加え，次世代シークエンサー（next-generation sequencer: NGS）を用いた解析によって，これらの概念はゲノムワイドで実証されつつある。NGS の登場により，ゲノムワイドに，かつ異なる階層における遺伝子発現制御機構の解析が可能となった。転写因子の結合領域やその標的遺伝子候補の探索にはクロマチン免疫沈降シークエンス（chromatin immunoprecipitation-sequencing: ChIP-seq）と RNA

＊　大阪大学大学院歯学研究科　組織・発生生物学講座

シークエンス（RNA sequencing: RNA-seq）が，転写因子の結合を左右するエピゲノム状態の探索にはヒストン修飾に対するChIP-seqやオープンクロマチン領域を同定するAssay for transposase-accessible chromatin sequencing（ATAC-seq）が用いられる。さらに高次の三次元的なゲノム構造についても，染色体コンフォメーション捕捉法（chromosome conformation capture）とNGSを組み合わせてゲノムワイドで解析することが可能である。また，近年のシングルセル解析技術の進歩により，単一細胞レベルでRNA-seqやATAC-seqを行うことが可能となっている。

我々も遺伝子発現制御の観点で骨発生プログラムを理解するべく，NGSを用いた研究を進め，骨発生のマスター制御因子群の作動様式と遺伝子発現制御機構を報告してきた[10-13]。並行して，ヒトの骨発生過程の理解を目指し，ヒト多能性幹細胞（胚性幹細胞・人工多能性幹細胞）を用いた骨発生過程のモデリングにも取り組んできた[14-17]。最近，ヒト多能性幹細胞から骨発生過程を再現するシステムを開発し，単一細胞レベルで遺伝子発現やエピゲノムを解析することでヒトの骨格発生プログラムにアプローチしている[18]。本稿では，一連の研究手法とデータを概説しながら，骨格系の生物学・発生学研究における「ゲノム局所から全体像へ・マウスからヒトへ・組織から単一細胞へ」という観点を紹介する。

軟骨細胞におけるSox9の作動様式

Sox9欠失細胞と野生型細胞が混在するキメラマウスにおいて，Sox9欠失細胞は軟骨内骨化初期の間葉凝集に寄与できない[19]。また，肢芽特異的にSox9を欠失させたマウスでは四肢が消失し，軟骨細胞特異的にSox9を欠失させたマウスでは重篤な軟骨異形成症の表現型を呈する[6]。従来から，Sox9は軟骨細胞のマスター制御因子として，軟骨の基質蛋白をコードする遺伝子の近傍に結合し，それらの転写を正に制御することが示されていた[7]。しかしながら，これはゲノム局所の限られた領域における知見であり，軟骨細胞におけるゲノムワイドなSox9の作動様式は不明であった。また，Sox9が働く際に，遺伝子発現のメインスイッチであるヒストンの修飾（アセチル化やメチル化）や基本転写装置がどのように関与しているかという点についても知見が限られていた。そこで，マウス初代軟骨細胞においてSox9に対するChIP-seqを行い，Sox9の結合領域の同定に取り組んだ。さらに，各種ヒストン修飾と基本転写装置の構成要素に対するChIP-seq，ゲノムワイド遺伝子発現解析のデータと統合的に解析することで，軟骨細胞のゲノム全域におけるSox9による遺伝子発現制御の仕組みを明らかにした[10]。

27,656箇所のSox9の結合領域が検出されたが，約1/4が転写開始点近傍に集積していた。そこで転写開始点近傍においてSox9が結合するゲノム領域をクラスI，転写開始点から離れてSox9が結合するゲノム領域をクラスIIと分類した。基本転写装置の構成要素であるp300やRNAポリメラーゼIIのChIP-seqデータとの統合解析から，クラスIにおけるSox9の結合は基本転写装置の存在と高い相関を示すことが明らかとなった。また，Sox9は二量体を形成してゲノム上のSox二量体結合配列に結合するとされるが，クラスIではSox二量体結合配列の有意な濃縮を認めなかった。クラスI近傍の遺伝子を探索すると，ハウスキーピング遺伝子や細胞の基礎活動に関わる遺伝子の有意な濃縮を示したが，骨発生や軟骨細胞に関わる遺伝子は濃縮していなかった。以上の結果から，クラスIにおいてSox9は細胞の維持や生存に関与する遺伝子の転写に関わっており，基本転写装置を介してこれらの遺伝子の転写開始点近傍で間接的に作用していると考えられた。

一方，クラスIIは活性型エンハンサーや組織特異的エンハンサーの指標（H3K4me2，H3K27ac，p300）を伴い，軟骨関連遺伝子周辺に有意に存在していた。また，クラスIIの一部はスーパーエンハンサー（細胞の性質に関わる重要な遺伝子周辺で認めるとされるエンハンサークラスター）を形成していた。スーパーエンハンサーを形成するクラスII近傍の遺伝子の発現量は，スーパーエンハンサーを形成しないクラスII近傍のものよりも有意に高かった。ゼブラフィッシュを用いたトランスジェニックレポーターアッセイにより，クラスIIの軟骨特異的なエンハンサー活性が確認された。興味深いことに，クラスIIではSox二量体結合配列が有意に存在するものの，その配列はバリエーションに富んでいた。生化学的な検討から，軟骨細胞ゲノムで実際にSox9が使用するSox二量体結合配列は，理想的な結合配列よりもSox9への親和性が低いことが判明した。スーパーエンハンサーに関する知見を考慮すると，クラスIIにおいてSox9は準最適化Sox結合配列を介した弱い結合でゲノムDNAに作用するものの，複数のエンハンサー領域を使用することで，軟骨分化に関わる標的遺伝子の高い転写量を維持していると考えら

れた。以上から，軟骨細胞ゲノムにおいては，Sox9 が 2 つの異なる作動様式を有することが明らかとなった。

Sox9 クラス II 領域には，Sox 結合配列のみならず転写因子 AP-1（activator protein 1）の結合配列も有意に存在していたことから，Sox9 が AP-1 と協調して転写を制御する可能性が示唆された。そこで，マウス初代軟骨細胞において，AP-1 ファミリーメンバーである Jun に対する ChIP-seq を行い，Jun の結合領域を Sox9 クラス II 領域と比較した[12]。すると Sox9 クラス II 領域の大部分（81%）が Jun の結合領域と重複することが明らかとなった。これらの重複領域では，Sox9 と AP-1 の両方が直接ゲノム DNA に結合する領域と，一方のみがゲノム DNA に結合し，もう一方は蛋白質間相互作用によりゲノム DNA 上に存在する領域に分けられた。2 つの異なる相互作用様式は，標的遺伝子の転写に対して異なる作用を有すると示唆された。また，Sox9 と AP-1 による協調作用は特に軟骨細胞の肥大分化のステップで働くことが示された。

骨芽細胞における Sp7 の作動様式

Sp7 を欠失させたマウスでは全身から骨芽細胞が消失し，膜内骨化，軟骨内骨化いずれにおいても骨が形成されないことから，Sp7 は正常な骨芽細胞分化に必須であると考えられている[4]。従来から Sp7 が骨基質蛋白質や骨形成性シグナル因子の遺伝子の転写に関わることが示されてきたが[5,20]，骨芽細胞のゲノム全域にわたる Sp7 の作動様式の理解は十分でなかった。そこで，Sp7 による転写制御機構をゲノムワイドで明らかにすることを目的に研究を行った[11]。まず，FLAG-Biotin タグが付加された Sp7 を発現するノックインマウスを作出し，その頭蓋骨から単離した初代骨芽細胞において FLAG-Biotin タグを用いた ChIP-seq を行った結果，Sp7 が作用するゲノム領域として 2,112 箇所を検出した。Sp7 作用領域のうち，転写開始点近傍（転写開始点から 5 kb 以内の領域）にあるものは 7%に満たなかった。また，Sp7 作用領域近傍の遺伝子は骨発生に関連するものが有意に存在した。マウス頭蓋骨の初代細胞における RNA-seq 解析から，Sp7 陽性骨芽細胞において高発現する遺伝子群を同定し，その周囲に Sp7 作用領域が存在するものとしないものの間で発現量を比較した。すると，Sp7 作用領域が存在する遺伝子群の発現レベルが有意に高いことが明らかとなった。一連のデータは，Sp7 がプロモーターとエンハンサーとの long-range interaction を介して，骨発生に関わる遺伝子群の転写を正に制御することを支持すると考えられた。

Sp7 は Sp ファミリー転写因子群で高度に保存された C2H2-type zinc finger domain を有する[4]。そのため，他の Sp 転写因子と同様に Sp7 も zinc finger domain を介してゲノム DNA 上の GC ボックス配列[21-23]に結合すると考えられた（標準的作動様式）。しかしながら，我々の ChIP-seq で同定した Sp7 作用領域では GC ボックスの有意な濃縮を認めなかった。一方，興味深いことにホメオボックス転写因子の結合配列を含む AT-rich な配列（AT 配列）が有意に存在した。生化学的解析では，Sp7 の AT 配列への直接的な結合を検出できなかった。そのため，Sp7 はホメオボックス転写因子を介して，間接的にゲノム DNA の AT 配列上に存在する可能性が示唆された。RNA-seq 解析において，Dlx3，Dlx5，Dlx6 が骨芽細胞で強く発現していたことから，これらを Sp7 のパートナーの候補として解析を進めた。骨芽細胞において Sp7 と Dlx5 の ChIP-seq データを比較すると，Sp7 作用領域のうち約 80%が Dlx5 結合領域とオーバーラップしていた。また，Sp7 蛋白質と Dlx 蛋白質が細胞内で相互作用することが明らかとなった。さらに，骨芽細胞において Dlx をノックダウンすると，ゲノム DNA への Sp7 の作用が減少することを確認した。以上の結果から，従来から提唱されていた「標準的作動様式」とは異なり，Sp7 は Dlx を介して間接的にゲノム DNA に作用し，骨芽細胞の分化や骨発生に関わる遺伝子の発現を正に制御するという「非標準的作動様式」を新たに提唱した。

Sp7 では zinc finger domain のアミノ酸配列の一部が他の Sp 転写因子群とは異なっており，このアミノ酸の違いが GC ボックスへの親和性の喪失の原因であることも明らかとなった。そこで，この構造的特徴に由来する Sp7 の機能的特徴を進化学的に検証した。脊索動物において Sp7 と同様の zinc finger domain 変異体をもつ遺伝子の存在を調べると，骨を形成する脊椎動物のみで存在していた。このことは，脊椎動物の進化においては，Sp7 が骨形成性細胞（＝骨芽細胞）の出現に伴って獲得されたことを示唆している。

軟骨細胞と骨芽細胞における Runx2 の作動様式

Runx2 を欠失させたマウスでは全身から骨芽細胞が消失し，骨組織が全く形成されないことから[3]，Runx2 は Sp7 とともに骨形成のマスター制御因子とされてき

た。Runx2欠失マウスではSp7発現が消失するが，Sp7欠失マウスではRunx2発現を認めることから，遺伝学的にRunx2はSp7の上流にあるとされる[4]。また，Runx2は軟骨細胞の正常な成熟（肥大分化）にも必須であることが示されている[24]。Runx2が骨・軟骨の基質蛋白や発生に関わるシグナル分子をコードする遺伝子の転写に関与することは明らかにされてきたものの，骨芽細胞と軟骨細胞のゲノム上でどのように働いているかについては不明な点が多かった。そこで，骨芽細胞と軟骨細胞のエンハンサー領域の全貌とゲノムワイドなRunx2の作動様式を理解することを目的に研究を行った[13]。

Sp7の際と同様に，FLAG-Biotinタグが付加されたRunx2を発現するノックインマウスを作出し，そこから単離した初代骨芽細胞および初代軟骨細胞においてFLAGタグを用いたChIP-seqを行い，Runx2結合領域を探索した。さらに，エンハンサー候補領域を同定するため，マウス初代骨芽細胞および初代軟骨細胞においてATAC-seqを行った。各細胞集団におけるRunx2 ChIP-seqとATAC-seqデータを統合的に解析した結果，Runx2は骨芽細胞と軟骨細胞それぞれに特異的なオープンクロマチン領域に結合していることが明らかとなった。さらに，これらの領域に存在する転写因子結合配列の解析から，Runx2は，骨芽細胞では前述のDlx-Sp7複合体と，軟骨細胞ではForkhead（Fox）転写因子群と協調して働くことが示唆された。また，AP-1は骨芽細胞と軟骨細胞に共通したRunx2の協働因子であると考えられた。

一般にクロマチンは凝縮してヘテロクロマチンをとっており，転写抵抗性を示す。遺伝子の転写を開始するためにはこの凝縮を解除し，転写因子等がアクセスできる状態に（＝アクセシビリティを付与）しなければならない。この過程において，ヘテロクロマチンに単独で結合できる「パイオニアファクター」の存在が提唱されている。パイオニアファクターはヘテロクロマチンに結合することで，①アクセシビリティを付与するためのクロマチンリモデリングを誘導して，②他の転写因子群の結合を可能にし，③アクセシビリティやエピジェネティックな安定性を維持するとされている[25,26]。そこで，Runx2が骨芽細胞分化のパイオニアファクターとして働く可能性について検証した。Runx2を培養線維芽細胞に異所性に発現させ，Runx2に対するChIP-seqとATAC-seqを行ったところ，Runx2が結合した領域のアクセシビリティが経時的に増加することが明らかとなった。このRunx2反応性にアクセシビリティを獲得する領域は，骨芽細胞に関連する遺伝子の周囲に有意に存在した。一方，Sp7陽性の骨芽細胞においてRunx2遺伝子を欠損させてATAC-seqを行うと，Runx2が本来結合していたエンハンサー領域の多くでアクセシビリティが失われた。これらの領域も骨芽細胞に関連する遺伝子の周囲に有意に存在した。一連の結果は，Runx2が骨芽細胞におけるパイオニアファクターとして働くことを支持すると考えられた。

幹細胞を用いた骨発生モデリングとシングルセル解析による遺伝子制御ネットワークの理解

ここまで示したように，マウス等のモデル生物を用いた研究は骨発生に重要な転写因子やその作動様式を明らかにしてきた。しかしながら，それぞれの細胞種で特異的に働く転写因子間の相互作用やヒトの骨発生における検証は十分でなかった。特に，モデル生物で得られた知見をヒトへ応用する際はその再現性が問題となる上，ヒトを対象とした研究では倫理的な配慮が必要となる。そこで我々は，胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES細胞）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPS細胞）といったヒト多能性幹細胞を用いて骨発生過程を再現し，シングルセル解析と組み合わせることで，その背景にある遺伝子制御ネットワークを理解することを目指して研究を行った[18]。

まず初めに，沿軸中胚葉からの骨発生過程に着目し，ヒト多能性幹細胞からこの過程を再現する誘導系の開発を行った。その結果，Wnt，Hedgehog（Hh），transforming growth factor（TGF）-β, bone morphogenetic protein（BMP）の各種シグナルを調節する5種類の低分子化合物（CHIR, A83-01, LDN-193189, C59, SAG）を段階的に2次元培養系で用いることで，原始線条，沿軸中胚葉（未分節中胚葉），体節を経て椎板細胞を誘導するプロトコールを確立した。誘導した椎板細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植すると約1-2カ月で軟骨組織が優位な構造体が誘導された。移植後3-4か月では，軟骨内骨化の進行過程にある長管骨に組織学的に類似した構造体が誘導された。ヒト抗核抗体を用いた免疫染色により，構造体の中で骨格系細胞のみがヒト細胞であることが示された。

続いて，上記の軟骨内骨化誘導系において，腎被膜下移植後の軟骨内骨化初期（7週）と腎被膜下移植後

の軟骨内骨化後期（19 週）で single-cell RNA-seq（scRNA-seq）を行った。取得したデータの統合的解析により，誘導された軟骨内骨化構造体が，①未分化な前駆細胞様集団，②各分化段階の軟骨細胞系列，③各分化段階の骨芽細胞系列，④血球・血管系細胞集団から構成されることが明らかとなった。scRNA-seq で取得した発現遺伝子の配列データをマウス及びヒトのゲノムにマッピングした結果，①～③の骨格系細胞はヒト細胞であり，④の血球・血管系の細胞はマウス細胞であると考えられた。このことは，異種由来の細胞群が協調して骨・骨髄環境を構築していることを示唆している。また，移植後 7 週の組織では前駆細胞様集団および軟骨細胞が優位であり，19 週の組織では骨芽細胞の増加と血球・血管系細胞を認めたことから，我々の軟骨内骨化誘導系が生理的な過程（軟骨形成に続く骨への置換と骨髄形成）を反映していると考えられた。さらにヒト胎児長管骨の公共データとの統合的解析から，本法がヒト胎児の骨発生過程を部分的に再現していることも確認された。

続いて，ヒト軟骨内骨化過程における遺伝子制御ネットワークを理解するために，上記の軟骨内骨化構造体において，単一細胞で scRNA-seq と scATAC-seq を同時に行う single-cell multiome 解析を行った。遺伝子発現プロファイルとオープンクロマチンプロファイルの統合的解析に基づいて，構造体に存在する細胞が 10 種の集団にクラスタリングされた。各細胞集団においてオープンクロマチン領域と遺伝子発現の相関関係を解析した結果，細胞種に特異的なオープンクロマチンとその近傍に存在する遺伝子の発現の相関が示された。このことは，細胞種特異的な遺伝子発現プロファイルの根底には細胞種特異的なクロマチン状態が存在することを示唆している。さらに，オープンクロマチン領域における各種転写因子結合領域の集積状態と遺伝子発現を統合的に解析し，各細胞集団において活性化している転写因子を推定した。その結果，細胞種ごとに異なる転写因子群が活性化している状態（＝遺伝子制御ネットワーク）が明らかとなり，異なる転写因子の組み合わせが軟骨内骨化過程における細胞運命決定や各細胞の形質維持に働くことが示唆された。

おわりに

NGS の登場により，組織の発生や維持に関わるマスター制御因子群の作動様式に関する理解がゲノム局所からゲノム全域へと広がった。また，ヒトの多能性幹細胞を用いた発生過程の再現系を応用することで，モデル生物のみならずヒトの発生過程の分子メカニズムに迫ることが可能となった。さらに，単一細胞レベルで遺伝子発現やエピゲノム状態を明らかにするシングルセル解析技術の進展は，組織中の個々の細胞の性質や挙動を理解することを可能にしている。位置情報が失われた状態で各細胞のデータが取得されるというシングルセル解析技術の欠点は，空間トランスクリプトーム技術の発展により解決されつつある。2005 年の NGS の登場に端を発した急速な技術革新の波は，従来の技術的限界を簡単に乗り越え，不可能であった解析を次々と可能にしていく。しかしながら，現在のところ，欠点のない完璧な解析手法というものは存在しない。最新の解析手法の欠点や限界を正確に理解し，従来型の解析手法の利点も生かしながら，両者を適材適所で使い分けることが生命現象の正しい理解につながると考えられる。

文　献

1）Galea, G. L., Zein, M. R., Allen, S., and Francis-West, P.（2021）: Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Dev Dyn*, **250**, 414-449.

2）Percival, C. J., and Richtsmeier, J. T.（2013）: Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn*, **242**, 909-922.

3）Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T.（1997）: Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, **89**, 755-764.

4）Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrugghe, B.（2002）: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, **108**, 17-29.

5）Hojo, H., and Ohba, S.（2020）: Gene regulatory landscape in osteoblast differentiation. *Bone*, **137**, 115458.

6）Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., and de Crombrugghe, B.（2002）: The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, **16**, 2813-2828.

7）Hojo, H., and Ohba, S.（2019）: Insights into Gene Regulatory Networks in Chondrocytes. *Int J Mol Sci*,

20, 6324.

8) Waddington, C. H. (2015): *The strategy of the genes–Routledge library editions: 20th century science*, Ed. 1, Routledge, Oxfordshire.

9) Britten, R. J., and Davidson, E. H. (1969): Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, **165**, 349–357.

10) Ohba, S., He, X., Hojo, H., and McMahon, A. P. (2015): Distinct Transcriptional Programs Underlie Sox9 Regulation of the Mammalian Chondrocyte. *Cell Rep*, **12**, 229–243.

11) Hojo, H., Ohba, S., He, X., Lai, L. P., and McMahon, A. P. (2016): Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. *Dev Cell*, **37**, 238–253.

12) He, X., Ohba, S., Hojo, H., and McMahon, A. P. (2016): AP-1 family members act with Sox9 to promote chondrocyte hypertrophy. *Development*, **143**, 3012–3023.

13) Hojo, H., Saito, T., He, X., Guo, Q., Onodera, S., Azuma, T., Koebis, M., Nakao, K., Aiba, A., Seki, M., Suzuki, Y., Okada, H., Tanaka, S., Chung, U. I., McMahon, A. P., and Ohba, S. (2022): Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. *Cell Rep*, **40**, 111315.

14) Kanke, K., Masaki, H., Saito, T., Komiyama, Y., Hojo, H., Nakauchi, H., Lichtler, A. C., Takato, T., Chung, U. I., and Ohba, S. (2014): Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Reports*, **2**, 751–760.

15) Zujur, D., Kanke, K., Lichtler, A. C., Hojo, H., Chung, U. I., and Ohba, S. (2017): Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions. *Sci Adv*, **3**, e1602875.

16) Zujur, D., Kanke, K., Onodera, S., Tani, S., Lai, J., Azuma, T., Xin, X., Lichtler, A. C., Rowe, D. W., Saito, T., Tanaka, S., Masaki, H., Nakauchi, H., Chung, U. I., Hojo, H., and Ohba, S. (2020): Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers. *Regen Ther*, **14**, 19–31.

17) Onodera, S., Saito, A., Hojo, H., Nakamura, T., Zujur, D., Watanabe, K., Morita, N., Hasegawa, D., Masaki, H., Nakauchi, H., Nomura, T., Shibahara, T., Yamaguchi, A., Chung, U. I., Azuma, T., and Ohba, S. (2020): Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis. *Stem Cell Reports*, **15**, 125–139.

18) Tani, S., Okada, H., Onodera, S., Chijimatsu, R., Seki, M., Suzuki, Y., Xin, X., Rowe, D. W., Saito, T., Tanaka, S., Chung, U. I., Ohba, S., and Hojo, H. (2023): Stem cell-based modeling and single-cell multiomics reveal gene-regulatory mechanisms underlying human skeletal development. *Cell Rep*, 112276.

19) Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., and de Crombrugghe, B. (1999): Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*, **22**, 85–89.

20) Hojo, H., and Ohba, S. (2022): Sp7 Action in the Skeleton: Its Mode of Action, Functions, and Relevance to Skeletal Diseases. *Int J Mol Sci*, **23**, 5647.

21) Wang, J., Zhuang, J., Iyer, S., Lin, X., Whitfield, T. W., Greven, M. C., Pierce, B. G., Dong, X., Kundaje, A., Cheng, Y., Rando, O. J., Birney, E., Myers, R. M., Noble, W. S., Snyder, M., and Weng, Z. (2012): Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome Res*, **22**, 1798–1812.

22) Hume, M. A., Barrera, L. A., Gisselbrecht, S. S., and Bulyk, M. L. (2015): UniPROBE, update 2015: new tools and content for the online database of protein-binding microarray data on protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, **43**, D117–122.

23) Wingender, E., Schoeps, T., and Donitz, J. (2013): TFClass: an expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic Acids Res*, **41**, D165–170.

24) 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 Dev*, **18**, 952–963.

25) Zaret, K. S., and Mango, S. E. (2016): Pioneer transcription factors, chromatin dynamics, and cell fate control. *Curr Opin Genet Dev*, **37**, 76–81.

26) Mayran, A., and Drouin, J. (2018): Pioneer transcription factors shape the epigenetic landscape. *J Biol Chem*, **293**, 13795–13804.