

論文内容要旨

機械学習によるシングルセルレベルでの
マウス骨芽細胞の多様性

(The diversity of mouse osteoblasts at the single
cell level, using machine learning)

主指導教員: 香西 克之 教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

副指導教員: 吉子 裕二 教授

(医系科学研究科 硬組織代謝生物学)

副指導教員: 光畑 智恵子 准教授

(医系科学研究科 小児歯科学)

中野 将志

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞系譜への分化はマスター転写因子 **RUNX2** をはじめとする複数の転写因子によって制御される。分化した骨芽細胞は骨基質タンパク質を産生し、基質石灰化に寄与するが、その役割を終えると半数以上はアポトーシスにより死に至り、残りの細胞は骨基質に取り込まれ骨細胞となるか、ライニング細胞となり骨表面を覆う。さらに我々を含めた複数のグループは、特定の条件において骨芽細胞が脂肪細胞へ分化転換することを報告している。このように骨芽細胞のその後の運命決定機構は不明な点が多い。

ゲノム解析技術などの進歩により単一細胞レベルでの解析が可能となり、従来の細胞集団の解析では捉えることができなかった細胞の多様性が明らかにされつつある。我々は骨芽細胞の多様性と運命決定の分子基盤を明らかにするために、骨芽細胞に蛍光タンパク **Venus** を発現するレポーターマウスを作製し、同マウスより単離した 90 細胞の **Venus** 陽性 (+) 骨芽細胞のシングルセル **RNA-Seq** を行い、骨芽細胞の不均一性について報告した。本研究は、この不均一性の詳細を明らかとすることを目的とし、解析スケールを拡大して (285 細胞) **RNA-Seq** 解析を行い、機械学習を用いてクラスタ解析、疑似系列解析、**GO** 解析を行った。リファレンスデータには **mm10** (genecode Release M23; GRCm38.p6) を使用し、**Salmon** (Genome alignment free quantification tool) により遺伝子発現量を定量化した。解析は **Seurat** (R toolkit for single cell genomics; ver.3.1.0) を使用した。発現変動の大きい上位 3,000 遺伝子を抽出し、**PCA** 解析を行い、1~25 の主成分について解析を行った。**UMAP** により細胞が持つ遺伝子情報の次元を圧縮したところ、285 細胞は 5 つのクラスターに分類された。これらを **Feature plot** および **Violin plot**, **Heatmap**, **Dot plot** により可視化し、既存の骨芽細胞マーカーの発現を確認したところ、すべての細胞に骨芽細胞マーカーの発現を認めた。しかしながら、発現レベルはクラスタ間で差があり、クラスター1 は成熟骨芽細胞マーカーの発現量が低値であった。**Slingshot** による疑似系列解析を行ったところ、疑似系列軸上でクラスター2, 3, 4 あるいはクラスター2, 5 の 2 方向性が推定された。クラスター1 とクラスター2 の間では、108 遺伝子の発現が有意に上昇しており、57 の **GO** タームに有意差を認めた。これらの多くは細胞増殖や骨芽細胞分化、骨化と関連するものであった。一方、187 の遺伝子発現は有意に低下し、421 の **GO** タームに有意差を認め、細胞外基質の構造や細胞接着との関係が示唆された。

興味深いことに、クラスター1 には造血幹細胞マーカー **Cd34** の発現が顕著であった。**CD34** はマウス骨芽細胞前駆細胞にも発現することが報告されていることから、同細胞の **Venus** レポーターマウス骨組織における局在を確認した。7日齢および28日齢の頭頂骨および大腿骨を4%パラフォルムアルデヒド/PBS で灌流固定、4 °C で 2~3 時間浸漬固定した。その後、10% **EDTA/PBS** にて 4 °C 下 1~3 時間脱灰し、凍結切片を作製した。抗 **GFP** 抗体および抗 **CD34** 抗

体を使用し免疫染色を行ったところ、7 日齢および 28 日齢ともに頭頂骨において骨表面の Venus⁺ 骨芽細胞の一部に CD34 に共染される細胞を認めた。大腿骨遠位端の海綿骨および皮質骨には Venus⁺/CD34⁺ 骨芽細胞はほとんど検出されなかった。CD34⁺ 細胞は血管周囲、骨髄細胞の一部、Venus⁺ 骨芽細胞の周囲の細胞にも確認された。

以上より、Venus⁺ 骨芽細胞のシングルセル RNA-Seq を 285 細胞に拡大し、機械学習により遺伝子発現プロファイルの異なる 5 集団が確認された。これらの集団は擬似系列解析、GO 解析から、異なる運命をたどると推測される細胞、あるいは CD34 の共発現に代表されるユニークな細胞など、異なる細胞集団で構成されることが推察された。これらの所見は骨芽細胞の多様性の一端を示すものと思われる。