

# iPS細胞を用いてヒト分節時計のメカニズムを再現

## —生体の胚発生を模倣した実験系の確立と解析—

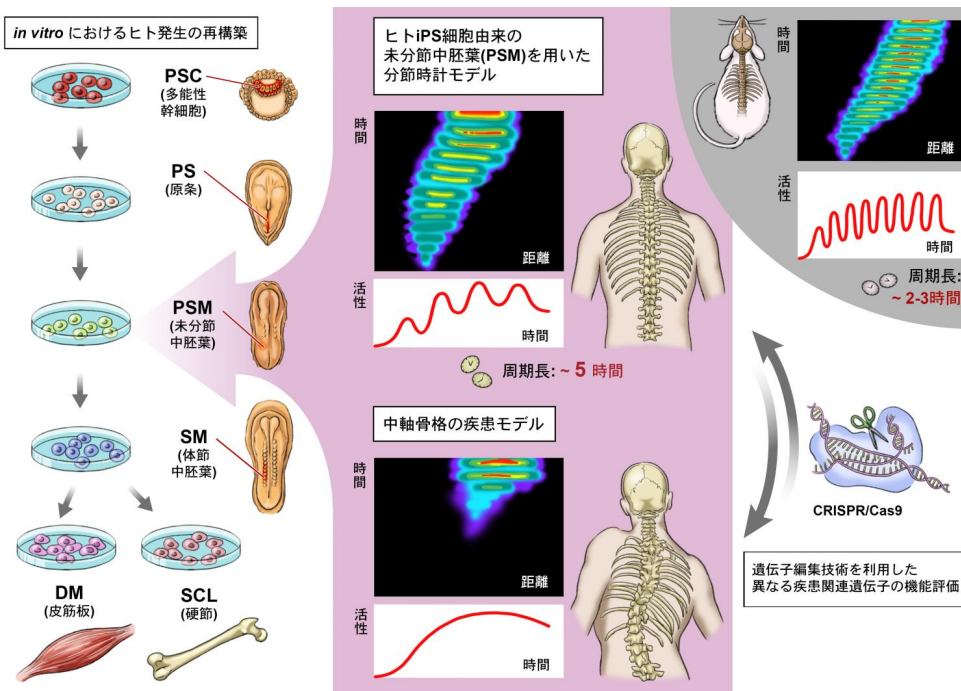
### 概要

京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi) Cantas Alev (アレヴ・ジャンタシュ)准教授 (研究当時は京都大学 iPS 細胞研究所助教) らの研究グループは、理化学研究所 生命機能科学研究センター 戎家美紀 ユニットリーダー (現 EMBL Barcelona グループリーダー) の研究グループ及び、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)、理化学研究所 生命医科学研究センター、名城病院の研究者との共同で、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞を段階的に誘導する手法を開発し、脊椎の発生を試験管内 (*in vitro*) で再現するモデルを確立しました。

研究グループは、このモデルを用いて未分節中胚葉 (PSM) から椎骨・肋骨・骨格筋・皮膚などの元となる体節の形成を段階的に再現することに成功しました。分節時計の主要な遺伝子の発現の視覚化により、ヒトの分節時計が5時間周期で振動することを発見し、マウスの分節時計が、実際の胚と同じく2~3時間周期である事を確認しました。誘導した PSM を用いた RNA シークエンス解析により、分節時計に関係する約 200 個の遺伝子を同定しました。さらに、分節時計の主要な遺伝子に変異を持つ iPS 細胞をゲノム編集により作成し、これを PSM に誘導し、遺伝子変異が分節時計に与える影響を明らかにしました。分節時計の遺伝子変異を有する疾患、脊椎肋骨異骨症の患者より樹立した iPS 細胞でこの遺伝子変異を修正すると、分節時計の異常が回復することが確認できました。

本研究で確立した iPS から PSM を経る段階的誘導法は、*in vitro* での脊椎発生のプロセスの再現と再構成を可能にします。分節時計をはじめとするヒト脊椎形成の機構の解明、様々な脊椎疾患の病態の理解のための有力な武器となるでしょう。

本研究成果は、2020年4月2日に国際学術誌「Nature」のオンライン版に掲載されました。



## 1. 背景

体節とは、将来椎骨・肋骨・骨格筋・皮膚などに分化する細胞群です。一定時間ごとに、未分節中胚葉 (PSM) と呼ばれる分化していない細胞がくびれて切れることによって形成されます。この体節形成は胚発生（多細胞生物が受精卵から成体になるまでの過程）における主要な発生プロセスであり、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュ等のモデル生物で研究されてきました。現在では、モデル動物において、遺伝子の発現量が周期的に変化すること（時計遺伝子の振動）によって体節形成（分節）を制御する「分節時計」が存在することが明らかになっています。しかし、ヒトにおいては、体節形成期の胚の使用は制限されていることから、ほとんど何もわかっていませんでした。

本研究グループは、これまでにマウスやニワトリなどのモデル生物における中胚葉の分化とパターン形成について研究してきました。その成果を踏まえ、試験管内 (*in vitro*) でヒトの中胚葉形成を再現できるのではないかと考えました。また、ヒトにおいても分節時計が機能しており、振動する時計遺伝子の可視化と定量が可能であると考えました。

## 2. 研究手法・成果

本研究グループは、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて、胚発生を模した形で段階的にヒト PSM を誘導する *in vitro* の二次元/三次元分化系を確立しました。すでにモデル生物を用いた胚発生研究によって、分節時計におけるシグナル伝達経路の活性変化が明らかになっていました。この実験系では、その活性変化を模した培養系で、PSM およびそこから分化する組織を誘導しました。

その結果、この *in vitro* の iPS 細胞由来 PSM において、発現が大きく振動する遺伝子を複数同定しました。また、PSM において振動する遺伝子の 1 つである、HES7 のレポーター細胞を樹立しました。このレポーター細胞を用いて解析したところ、誘導した PSM において、HES7 遺伝子の発現が約 5 時間周期で振動することが確認できました。その際に、分節時計のメカニズムの重要な特徴である、遺伝子の発現が進行波の様に移動していく様子を観察できました。

また、この実験系でマウスの未分節中胚葉を誘導し、*in vitro* におけるマウスの分節時計が、実際の胚における周期と同じ 2~3 時間である事を示しました。

さらに、確立した誘導法を用いて HES7 を振動発現させたヒト及びマウスの *in vitro* PSM を用いた RNA シーケンシング解析により、約 200 個の新規の同位相/逆位相振動遺伝子を同定し、これまで分節時計との関連が報告されていないシグナル経路を見出すことに成功しました。これにより、分節時計のメカニズムについて新しい知見を提供することができました。

本研究ではまた、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて、椎骨分節異常(SDV)や脊椎肋骨異骨症(SCD)などで報告されている原因遺伝子に、疾患特異的な変異を持つ iPS 細胞を樹立しました。これらの細胞株を、本研究で確立した *in vitro* 誘導系を用いて PSM に誘導したところ、疾患に特異的な遺伝子変異が、分節時計の発現振動、振動の同調、分化へ与える影響を検証することができました。さらに、SDV や SCD の患者さんから樹立した iPS 細胞を用いた PSM 誘導でも、同様の分節時計の異常を検出することができました。CRISPR/Cas9 を用いてこの疾患特異的な遺伝子変異を修正したところ、分節時計の異常な発現振動・周期・分化が一部正常に戻る事が確認できました。

## 3. 波及効果、今後の予定

本研究で確立した分節時計の *in vitro* モデルの確立は、ヒトの体節形成や分節メカニズムの理解について、

一つのターニングポイントとなる成果であると考えています。ヒトの主要な発生過程については、倫理的な制約からこれまで立ち入ることが出来ませんでした。この再現性の高い *in vitro* モデルによって、ヒトの中胚葉形成の研究のみならず、胚発生時期に関する疾患研究へ、多くの可能性が開かれたことを意味しています。

iPS 細胞を活用した本研究グループの“人工発生学”的アプローチは、ヒトだけでなく、その他の哺乳類や爬虫類の発生過程(体節形成など)の研究への可能性をも開くものです。分節時計がなぜ、そしてどのように種特異的であるのかといった課題の解明に貢献することが期待されます。

また、このモデルは、発生時間がどのようにして実際の発生プロセスを制御しているか、また、疾患や進化において、発生時間の制御メカニズムにおける異常や変化がどのように分節過程に影響を与えるか、といった問題を解決する一助となると考えられます。

さらに、本研究はヒトの通常の胚発生のみならず、先天性疾患のような異常な胚発生に関して知見を加えるものだといえます。

本研究は、iPS 細胞を用いることによって、基礎的な生物学の問題を解明できるだけでなく、複雑な先天性疾患の病因に対して新たな知見を与えることのできる好例です。本研究と今後の研究が、基礎的なヒト生物学の理解をさらに深めることを切に願います。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、内藤記念科学奨励金・研究助成、日本学術振興会(JSPS)科学研究費助成事業(課題番号: 16K15664、17H05777)、武田科学振興財団、再生医療実現拠点ネットワークプログラム「iPS 細胞研究中核拠点」及び「疾患特異的 iPS 細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム」(AMED)、再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点(京都大学ウイルス・再生医科学研究所)の助成を受けて行われました。

##### <研究グループの主な構成員>

Cantas Alev (京都大学 iPS 細胞研究所・助教、現：京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi)・准教授) (共同責任著者)

山中 良裕 (京都大学 iPS 細胞研究所・博士課程学生、現：京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi)・教務補佐員) (共同第一著者)

戎家 美紀 (理化学研究所 生命機能科学研究センター・ユニットリーダー、現：EMBL Barcelona グループリーダー) (共同責任著者)

松田 充弘 (理化学研究所 生命機能科学研究センター・研究員、現：EMBL Barcelona・研究員) (共同第一著者)

戸口田 淳也 (京都大学 iPS 細胞研究所・教授)

Knut Woltjen (京都大学 iPS 細胞研究所・准教授)

山本 拓也 (京都大学 iPS 細胞研究所・准教授、京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi) 准教授)

齋藤 潤 (京都大学 iPS 細胞研究所・准教授)

池川 志郎 (理化学研究所 生命医科学研究センター・チームリーダー)

川上 紀明 (名城病院・脊椎脊髄センター長)

### <用語解説>

**中胚葉**：発生の初期（原腸陥入後）に現れる3つの細胞群（外胚葉、中胚葉、内胚葉）の1つ。筋肉や骨格を作る。

**未分節中胚葉**：体節を形成する前の未分化な中胚葉細胞。

**二次元/三次元分化系**：胚発生の分化過程を模して、*in vitro*(試験管内)で二次元あるいは三次元的に細胞の分化を誘導する実験系。

**分節時計**：体節形成を制御していると考えられている、未分節中胚葉で分子的振動子に基づく周期的な遺伝子発現。

**レポーター細胞**：細胞内にある遺伝子の発現を可視化するための蛍光タンパク質や化学発光を触媒する酵素の遺伝子が追跡したい遺伝子（ここでは HES7）の発現に伴って発現する細胞。

**同位相/逆位相振動遺伝子**：HES7 レポーターの発現振動パターンと同じタイミング(同位相)、あるいは半周期ずれたタイミング(逆位相)で振動する遺伝子群。

### <研究者のコメント>

我々は、どのようにして複雑な器官と組織が非常に単純な初期構造から形成されるのかという事に興味があります。このような発生の基本原則を解明する1つの方法は、*in vitro*でのこれらのプロセスの再現と再構成をする事です。今後の目標は *in vitro* で胚発生の多くの側面を再現して分析することです。これにより、ヒトやその他の生物の発生に関する理解が高まり、*in vitro* の組織誘導と器官形成のための新規のアプローチと技術が確立できます。

### <論文タイトルと著者>

タイトル：**Recapitulating the Human Segmentation Clock with Pluripotent Stem Cells**

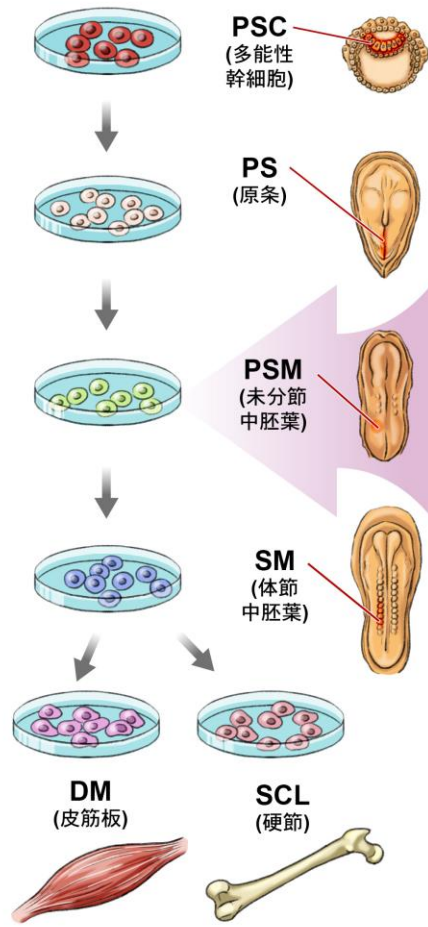
(多能性幹細胞を用いたヒト分節時計の再現)

著者：Mitsuhiro Matsuda, Yoshihiro Yamanaka, Maya Uemura, Mitsujiro Osawa, Megumu K. Saito, Ayako Nagahashi, Megumi Nishio, Long Guo, Shiro Ikegawa, Satoko Sakurai, Shunsuke Kihara, Thomas L. Maurissen, Michiko Nakamura, Tomoko Matsumoto, Hiroyuki Yoshitomi, Makoto Ikeya, Noriaki Kawakami, Takuya Yamamoto, Knut Woltjen, Miki Ebisuya, Junya Toguchida, Cantas Alev

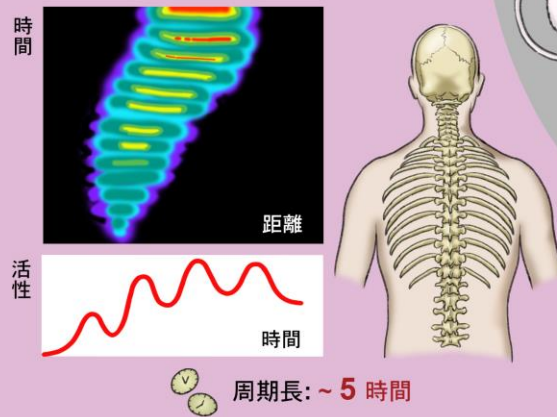
掲載誌：Nature DOI：未定

< 参考図表 >

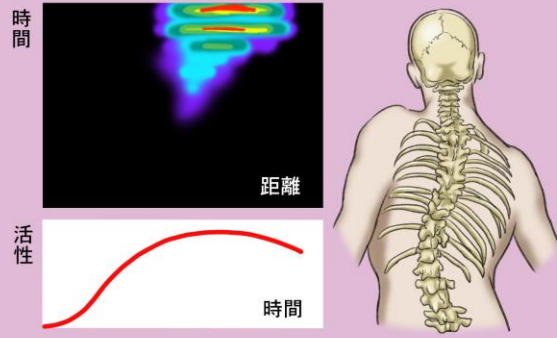
*in vitro* におけるヒト発生の再構築



ヒトiPS細胞由来の未分節中胚葉(PSM)を用いた分節時計モデル



中軸骨格の疾患モデル



遺伝子編集技術を利用した異なる疾患関連遺伝子の機能評価