

平成23年 6月 3日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21700367
 研究課題名（和文）
 ES細胞からの大脳皮質組織の分化過程の解析と制御
 研究課題名（英文） Analysis of neural tissue development using ES cells culture system
 研究代表者
 永楽 元次（EIRAKU MOTOTSUGU）
 独立行政法人理化学研究所・立体組織形成・解析ユニット・副ユニットリーダー
 研究者番号： 40415097

研究成果の概要（和文）：

本研究では機能的な神経組織を試験管内で作成すること、およびその経過を詳細に観察できる実験系の構築を目指した。研究成果としては以下のものが挙げられる。1) ES細胞から連続した神経上皮構造の構築に成功した。2) ES細胞から分化した神経上皮から眼形成領域が生じ、この領域が眼杯を形成することを見いだした。またこの形態形成過程を詳細に観察できる二光子励起顕微鏡システムを構築した。3) 試験管内で形成された眼杯を長期培養することで、層構造を持った網膜組織を分化させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we report the dynamic, autonomous formation of the optic cup (retinal primordium) structure from a three-dimensional culture of mouse ES cell aggregates. ES cell-derived retinal epithelium spontaneously formed hemispherical epithelial vesicles that become patterned along its proximal-distal axis. While the rigid proximal portion differentiated into pigment epithelium, the flexible distal portion progressively folded inward to form a shape reminiscent of the embryonic optic cup, exhibited interkinetic nuclear migration and generated stratified neural retinal tissue, just as seen *in vivo*. We demonstrate that optic-cup morphogenesis in this simple cell culture depends on an intrinsic self-organizing program involving stepwise and domain-specific regulations in local epithelial properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ES細胞、形態形成、器官発生、試験管内再構築

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、基礎的な脳発生の研究成果を基に、「複雑な組織構造」の立体形成を研究し、ES 細胞からの SFEBq 法による「試験管内での 3 次元自己組織化技術」を開発した。その成果の一部として、2008 年にマウスやヒトの ES 細胞から層構造を持った大脳皮質組織の立体培養に成功した。これは画期的な成果であったものの、形成した組織は、胎児型での大脳発生の初期の構造を有するところまでで、生後型の大脳に見られる程の複雑な組織構造の形成には至らなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は「機能を持った複雑な神経組織」を試験管内で構築することである。そのために、何が不足しているのかをより詳細なレベルでの観察により明らかにしていくことが必要であると考えられた。

3. 研究の方法

これまでに分散したマウス ES 細胞を小さくぼみ（細胞が底に接着しないタイプの培養ウェル）の底へ集めて培養することで、2～3 時間以内に素早く 3 次元に再凝集（細胞数は約 3,000 個程度）させる方法「SFEBq 法」を開発し、数日～1 週間程度浮遊培養して、中枢神経系の前駆細胞に高い効率で分化させることに成功していた。今回、研究代表者は、神経上皮構造をより安定化させることが知られているラミニンやエンタクチンを含む細胞外マトリクスタンパク質の混合物を培養液に添加することで、眼形成領域を含む神経上皮構造を安定的に分化誘導した。

4. 研究成果

(1)ES 細胞由来の網膜前駆組織から眼杯を立体形成

この改良 SFEBq 法を用いて、7 日間 ES

細胞の細胞塊を浮遊培養し続けると、細胞塊の中に形成した網膜前駆組織の上皮構造に大きな変化が起きることが分った。最初に網膜前駆組織 (Rx 陽性) が細胞塊の外へ向かって、袋状に突出した。その後、さらに 2 日間培養する過程で、袋状の網膜前駆組織のうち細胞塊本体から遠い部分が、今度は袋の内側に向かって自然に陥入するようになった。その結果、網膜前駆組織は、培養開始 10 日目までに内外の 2 層の上皮シートからなるカップ状の構造を形成した。

これは、胚発生過程の網膜の原基である「眼杯」に酷似しており、形だけでなく、局所のマーカー遺伝子の発現パターンも眼杯と同様であった。胚の中と同じく、2 層の上皮シートのうちカップ状の外側の壁は、色素上皮からなり、色素を蓄積することも分かった。一方、陥入して形成した内側の壁は、神経網膜の前駆組織に特異的なマーカー遺伝子を発現していた。眼杯は、マウス胎児では胎生 10～11 日に完成し、直径 300 μ m 程度のサイズです。マウス ES 細胞から形成した眼杯もこれとほぼ同じサイズであった。

(2)ES 細胞から眼杯組織の立体形成は自己組織化による

このように複雑な眼杯の形成は、ES 細胞を単に均一に凝集させた細胞塊から生じ、しかも均一な培養液の中で浮遊培養しただけで実現した。

この眼杯構造の自己組織化の機序を解明するために、特別に組み上げた長期立体培養用顕微鏡による 3 次元多光子励起蛍光イメージングを数日間かけて行い、細胞凝集塊からの眼杯形成過程を詳細に検討した。解析の結果、ES 細胞由来の網膜前駆組織は、まず色素上皮と神経網膜の領域に自発的に分かれ、神経網膜の組織は外からの力などで変形するのではなく、自らの力で内側にくぼんで行くことが分かった。すなわち、網膜前駆組織

には元々「眼杯の形」を作るプログラムが内在されていて、それが発揮できる環境で培養すると、自然と眼杯を形成する自己組織化が誘発されることが判明した。

精密な構造決定が必要な眼組織の形成に、こうした内在的な「自己組織化プログラム」が働いていることは大変興味深く、これまで全く未知のメカニズムであった。

(3) 眼杯組織の「かたち」を決める力学的原理の解明

次に、眼杯形成における内在的な「自己組織化プログラム」について、詳細な解析を行った。研究グループは、先端的な力学計測法や独自に開発した組織内圧の解析法を駆使して、網膜前駆組織の1層の細胞シートである上皮構造の中での力学特性の動態を調べた。その結果、次のたった3つの「組織構造の局所ルール」を順序だてて発揮することで、この複雑な眼杯の形が決定していくことを明らかにした。

培養7日までに形成した網膜前駆組織は、ES細胞塊の本体から丸く飛び出した上皮の袋状の構造を示している。

次の2日間の間に

- ①飛び出した眼杯様の袋の中で、ES細胞塊本体から遠い部分が神経網膜の前駆組織に運命付けされ、その部分が他の部分より構造的に「変形しやすい柔軟な組織」になる。これは、神経網膜組織では、細胞の中のバネに当たるミオシンが不活性の状態（柔らかいバネの状態）になるためと考えられる。
- ②次に、色素上皮と神経網膜の境目の細胞が特別な「くさび形」に変わり、色素上皮と神経網膜の「折り返し部分」で鋭角なカーブを形成する。
- ③最後に、神経網膜組織が盛んな細胞分裂により急速に面積が大きくなり、それに

より横方向の圧力が生じて、自らを眼杯の内部へ変形させ、陥入して行く。

(4) 生体組織に酷似した多層の神経網膜組織の3次元形成

さらに研究グループは、試験管内でES細胞から3次元再構築した眼杯組織（胎児型網膜組織）から、生後の眼で見られるような多層の神経網膜組織（生後型網膜組織）の形成に挑戦した。分化培養10日後に、形成したES細胞由来の眼杯組織を細いピンセットで単離し、さらに14日間立体浮遊培養を行なった（合計24日間の培養）。すると、培養24日後には、神経網膜を形成する6種類の主要細胞（視細胞、水平細胞、双極細胞、アマクリン細胞、神経節細胞、ミュラー細胞）のすべてを含み、しかも、それらが生後の眼組織に見られるように順序正しい層状構造を形成した。分化培養10日後には直径300 μ m程度のカップ状であった神経網膜は、24日間の培養後には2mmの直径に達する大きな上皮構造になっていた。

このように、今回の研究では、多能性幹細胞にも内在する自己組織化プログラムを誘発することにより、世界で初めて胎児型の網膜組織（眼杯）の立体形成に成功しただけではなく、生後型の網膜組織全層の立体再構築も実現した。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture.

Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y. *Nature*, 472:51-6, 2011 (査読有り)

②Subregional specification of embryonic stem cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatory treatment with extrinsic signals.

Danjo T, Eiraku M, Muguruma K, Watanabe K, Kawada M, Yanagawa Y, Rubenstein JL, Sasai Y **J Neurosci.**, 31:1919-33, 2011 (査読有り)

③Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells.

Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y. **Cell Stem Cell**, 7:225-39, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

①第32回日本神経科学大会シンポジウム
神経前駆細胞の細胞周期進行が脳形成に持つ意義の解明に向けて。

2009年9月17日、名古屋国際会議場
演題「ES細胞からの大脳皮質神経組織分化について」

永楽 元次、笹井 芳樹

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/cdb/fdta/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永楽 元次 (EIRAKU MOTOTSUGU)
独立行政法人理化学研究所・立体組織形成・解析
ユニット・副ユニットリーダー
40415097

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者