

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670661

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞由来中胚葉細胞の高効率誘導法の確立と分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Derivation of human PSC-derived mesodermal cells

研究代表者

池谷 真 (Ikeya, Makoto)

京都大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：20442923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系組織は、主として中胚葉由来の細胞で構成される組織であり、上皮組織の支持のみならず、骨格形成、運動機能等の重要な機能を司る組織である。中胚葉とは発生初期に外胚葉と内胚葉の間を埋めるように形成される細胞集団であり、発生初期は原始線条から、発生中期は尾芽から発生することが知られている。間葉系組織は部位によって異なる中胚葉細胞集団に由来するとされており、体幹、脊柱は沿軸中胚葉、四肢は側板中胚葉に由来するとされている。本申請研究では、多能性幹細胞から中胚葉細胞の誘導、単離、および品質評価を目標に研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal cells, including bone, cartilage, muscle, dermis, and blood cells, are mainly derived from mesoderm. Mesoderm is defined as a intermediate formed between ectoderm and endoderm in the developmental process, and is derived from primitive streak in the early stage and from tail bud in the late stage of development. Specific mesenchymal cells are derived from specific mesodermal cells, such as axial bone and cartilage from paraxial mesoderm, limb mesenchyme from lateral plate mesoderm, and notochord from axial mesoderm. In this grant, we performed induction, purification and evaluation of mesodermal cells differentiated from PSCs.

研究分野：発生生物学

キーワード：中胚葉細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系細胞の起源について

間葉系組織は、主として中胚葉由来の細胞で構成される組織であり、上皮組織の支持のみならず、骨格形成、運動機能等の重要な機能を司る組織である。中胚葉とは発生初期に外胚葉と内胚葉の間を埋めるように形成される細胞集団であり、発生初期は原始線条から、発生中期は尾芽から発生することが知られている。間葉系組織は部位によって異なる中胚葉細胞集団に由来するとされており、体幹、脊柱は沿軸中胚葉、四肢は側板中胚葉に由来するとされている。このように間葉系の多くの細胞は中胚葉由来であるとされている。

高等脊椎動物において、中胚葉は、外胚葉や内胚葉とは独立に形成されると考えられてきた。しかし近年になって、中胚葉は内胚葉と同じ起源である中内胚葉から形成されることが示されてきた。さらに最近になって、中胚葉の一部である沿軸中胚葉は、外胚葉である中枢神経細胞と同じ起源細胞である「体軸幹細胞」に由来するという説が提唱された。このように、中胚葉細胞の起源については未だに議論の余地がある。

(2) 中胚葉誘導化合物の発見

申請者は、ヒト多能性幹細胞から外胚葉系の細胞を、無血清培地を用いて誘導する研究を遂行していた。その過程において、外胚葉誘導能を有する特定の化合物を高濃度添加すると、外胚葉と全く異なる中胚葉の分化マーカーを強く発現する細胞集団が出現することを見出した。高濃度の処理により、外胚葉系の細胞から上述の体軸幹細胞のような細胞が選択的に誘導されたのか、あるいは外胚葉誘導と全く異なる作用機序によって中胚葉細胞が誘導されたのかは不明であるが、誘導された細胞の中胚葉系細胞への分化能は極めて良好なものであった。

(3) 本研究の学術的な特色及び意義

再生医療への応用：多能性幹細胞から多分化能をもつ中胚葉細胞を安定して高効率に分化誘導する技術が確立されれば、筋骨格系の再生医療に用いる最終分化細胞を安定して供給できる体制を整備できることになり、極めて意義の高い進歩となる。

間葉系幹細胞の本質の解明：間葉系の複数の細胞に分化出来る細胞として現在、骨髄間質、脂肪組織、滑膜組織等、様々な中胚葉組織より単離されているが、その本態は以前明確でない。本研究課題において中胚葉細胞を経由した幹細胞の誘導及びその分子機構が解明されれば、現在臨床で用いられている間葉系幹細胞の理解にも大きく貢献することが期待できる。

(4) 本研究のアイデア及びチャレンジ性 Chemically Defined Medium(CDM)を使

用した分化誘導系である

これまでに行われてきた多能性幹細胞からの中胚葉誘導には、多くの場合、血清や異種間質細胞との共培養が行われてきた。すなわち、血清のロットや間質細胞の状態に大きく依存する実験系であり、安定な誘導系とは言えない。また将来の細胞移植治療への応用の点からも好ましくない。申請者は無血清条件下で、CDMを用いて外胚葉細胞の誘導を試み、更に特定の化合物を添加することで中胚葉細胞の誘導に成功した。この成果は分化誘導過程を分子レベルで解析する上で、極めて意義の高いものであり、かつ再生医療への応用に関しても大きなアドバンテージをもつものである。

画期的な中胚葉由来幹細胞の誘導法開発へチャレンジする研究である

間葉系組織の主体が中胚葉由来であることから、多能性幹細胞から多分化能をもつ中胚葉細胞を誘導できれば極めて有用であることは明らかである。それ故、多くの試みが成されてきたが、いまだロバストな誘導法は報告されていない。最近、血清や共培養を用いない中胚葉誘導法も開発されており、その多くは誘導因子としてアクチピンを使用している。一方で、アクチピンは内胚葉誘導の際にも使用されることが多い。このことから、これまで開発されてきた方法は、初期発生過程に出現する「中内胚葉」を誘導してから、その後の中胚葉を誘導する方法であると考えられることができる。ところが、今回、申請者が見出した中胚葉誘導法は、アクチピンを使用せず、逆にその活性を抑える薬剤を添加している。この培地組成は、多能性幹細胞から中枢神経細胞を誘導する際に多く用いられる培地であり、このことから本誘導法は最近になって提唱された体軸幹細胞を経て中胚葉へと分化した細胞集団である可能性を示唆するものであり、萌芽的な研究として相応しいものであると考える。

(5) 本研究から期待される卓越した成果

間葉系組織の再生医療への応用できる細胞源が確保できる

現在進行中のiPS細胞ストック事業の成果として移植治療に使用可能なiPS細胞が使用可能となれば、多くの病態への細胞治療が視野に入ってくる。いずれの領域においても、iPS細胞から最終分化細胞を誘導するためには、多くのステップが必要であり、時間、コストの問題もあることから、その中間に位置する複数の細胞に分化できる細胞の状態で増殖維持する技術の開発が検討されている。近年、栄養外胚葉由来細胞や胚盤膜上層由来幹細胞などの多分化能を有する細胞が多能性幹細胞より樹立でき、かつ維持培養が可能なが報告されているが、iPS細胞から中胚葉へのロバストな分化誘導法及び維持培養法は確立されておらず、本研究により、これらが確立されれば間葉系組織の再生医療

へのインパクトは極めて大きい。

体性幹細胞としての間葉系幹細胞の本態の解明につながる

現在、骨髄間質、脂肪組織、滑膜組織等、様々な組織より間葉系の複数の細胞に分化可能な細胞として間葉系幹細胞が単離され、臨床応用に用いられている。しかしその本態は以前明確ではなく、多くは複数の細胞が混合した集団として用いられている。本研究課題において中胚葉細胞を経由した幹細胞を安定して誘導できる系が確立されれば、誘導された細胞の細胞表面抗原等の特性解析から、少なくとも一種類の間葉系幹細胞を分子レベルで同定することが可能となる。そしてその結果に基づいて、現在遂行されている体性幹細胞としての間葉系幹細胞を用いた再生医療が、どのような細胞を用いたものであるのかを解析し、臨床成果と比較することで、至適な細胞群を用いることが可能となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究課題では以下の3項目を明らかにすることを目的とした。

- (1) 誘導された中胚葉細胞の増殖能や分化能などの特性解析
- (2) 遺伝子発現及びシグナル伝達機構の解析に基づく誘導過程の分子機構の解明
- (3) 1及び2に基づいた、より有効かつ安定した中胚葉細胞誘導及び維持培養技術の確立

3. 研究の方法

本研究では以下の4点を研究計画として提示した。

- (1) 誘導された中胚葉細胞の単離技術の開発
- (2) 誘導された中胚葉細胞の特性の評価
- (3) 誘導された中胚葉細胞の系譜の解析
- (4) 誘導された中胚葉細胞の維持培養条件の検討

研究計画

- (1) 誘導された中胚葉細胞の単離：

誘導された中胚葉の増殖能や分化能などの特性を解析するためには、他の系譜の細胞を排除し、中胚葉細胞のみを単離する技術が必要である。しかし、中胚葉細胞に特異的な表面抗原はこれまで報告されていない。そこで、まずは以下の2つの手法により、中胚葉細胞の1細胞レベルでの可視化を行う。

ノックイン細胞の作製：

中胚葉特異的分子マーカーであるBrachyury遺伝子あるいはTbx6遺伝子の遺伝子座にGFP等の蛍光タンパク質をノックインしたiPS細胞を、TALENやCRISPR/Cas9といったゲノム編集技術を用いて作製する。品質評価は抗Brachyury抗体あるいは抗Tbx6抗体による抗体染色と蛍光タンパク質の二重染色で評価する。

SmartFlare RNA 検出プローブを用いた生細胞の標識と分離：

最近になってMERCK MILLIPORE社より、ネイティブRNAを特異的に検出する不活性ナノ粒子であるSmartFlare RNA 検出プローブ技術が開発された。この技術を用いて中胚葉特異的遺伝子であるBrachyuryとTbx6陽性細胞の単離を行う。

- (2) 誘導された中胚葉細胞の特性評価：

上述(1)の手法を用いて単離した中胚葉細胞の特性評価を行う。評価基準としては、得られた中胚葉細胞が、骨・軟骨・脂肪・筋肉・血液細胞といった中胚葉に由来することが分かっている細胞へと分化する能力を有するか検討する。

- (3) 誘導された中胚葉細胞の系譜の解析：

遺伝子発現解析

網羅的遺伝子発現解析により、誘導過程で特異的に発現変動する遺伝子群を同定する。同様に、アクチビンを用いた従来法で変動する遺伝子群と比較し、それぞれの誘導法で特異的な遺伝子群を同定する。

細胞系譜解析：

誘導に使用した培地組成から、本申請の誘導された中胚葉は中枢神経細胞と同一の起源細胞である体軸幹細胞を経由している可能性が考えられる。この可能性を探索するため、体軸中胚葉には特異的なエンハンサー(Sox2 遺伝子のN1エンハンサー)にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを作製後、iPS細胞に一過的に導入し、誘導過程でルシフェラーゼが活性するかを検討する。

シグナル伝達経路の解析

網羅的遺伝子発現解析により推測されたシグナル伝達経路の関与を、阻害剤やsiRNAなどを用いて解析する。

細胞系譜解析：

誘導に使用した培地組成誘導過程でN1エンハンサーの活性化が見られた場合は、N1エンハンサーに蛍光タンパク質遺伝子をつないだトランスジェニックiPS細胞を作製する。このトランスジェニック細胞を用いてセルソーターによる体軸幹細胞の分離を行い、多能性幹細胞から体軸幹細胞を経て中胚葉細胞へと分化するという経路を細胞レベルで示す。

通常、トランスジェニック細胞は、遺伝子の挿入箇所の影響を受けるためにクローンによるばらつきがあることが知られている。そこでTLENやCRISPR/Cas9などのゲノム編集技術を用い、サイレンシングを受けにくく、発現が安定しており、かつ外来遺伝子の挿入による悪影響が認められないことが報告されているAAVS1領域特異的にレポーター遺伝子の導入を行う。

- (4) 誘導された中胚葉細胞の維持培養条件

の検討

多能性幹細胞から誘導した中胚葉細胞を、細胞の特性を保ったまま維持培養できる培養条件を探索する。発生過程において中胚葉は原始線状あるいは尾芽領域で未分化な細胞として維持されていると考えられている。そこでそのような環境を整えることで、シャーレ上でも中胚葉細胞を維持培養できるという仮説を立て、まずは原始線状と尾芽で強く機能していることが分かっている FGF シグナルあるいは Wnt シグナルを申請者の開発した培養条件下に付加することにより、維持培養が可能かどうか検討する。

4. 研究成果

研究成果については下記の通りである。

(1) 誘導された中胚葉細胞の単離：

当初の計画では、中胚葉特異的分子マーカーである Brachyury 遺伝子あるいは Tbx6 遺伝子の遺伝子座に GFP 等の蛍光タンパク質をノックインした iPS 細胞の作製、あるいは SmartFlare RNA 検出プローブを用いた生細胞の標識と分離を計画していた。しかし、特に前者の遺伝子改変した細胞は、将来的な再生医療に応用が難しく、中胚葉特異的な表面抗原の同定が必須であると考えた。そこで方針を変更し、中胚葉を特異的に分離することが可能な表面抗原の、小規模スクリーニングを行った。その結果、これまでまったく使用されてこなかった中胚葉特異的な表面抗原を得ることに成功した。

(2) 多能性幹細胞から誘導された中胚葉細胞の特性評価：

上述(1)の手法を用いて単離した中胚葉細胞から、骨・軟骨・脂肪・筋肉といった中胚葉に由来する細胞への分化能を検討した。予備的な結果ではあるが、単離された中胚葉細胞は、これらの細胞に分化する能力を有していることがわかった。

(3) 誘導された中胚葉細胞の系譜の解析：

上述(1)の分化誘導過程で、どのような細胞系譜が誘導されているかを、細胞系譜特異的なマーカー遺伝子発現解析により検討したところ、今回の誘導条件は中胚葉細胞の前駆細胞である原始線状の細胞が初期に誘導されていること、さらには、培養を続けた細胞は沿軸中胚葉の遺伝子発現パターンを有していることがわかった。引き続き、網羅的遺伝子解析によるシグナル伝達経路の解析を行う予定であったが、その前にこの細胞が本当に中胚葉細胞としての特徴を持つかどうかをさらに検討するため、真皮節および靭帯節への分化誘導を試みた。結果として、真皮節および靭帯節のマーカーを qPCR により検出することができる誘導条件を見いだすことに成功した。このことにより、得られた細胞は確かに中胚葉細胞としての特徴を持っていることがわかった。しかし同時に、

抗体染色による誘導効率検討の結果、得られた細胞の各細胞系譜陽性率は低く、さらなる条件検討が必要と考えられた。

(4) 誘導された中胚葉細胞の維持培養条件の検討：

多能性幹細胞から誘導した中胚葉細胞を、細胞の特性を保ったまま維持培養できる培養条件を探索した。培養条件としては *in vivo* の尾芽におけるシグナル分子の発現パターンを参考とし、培地に FGF シグナルおよび WNT シグナル関連分子を添加したが、残念ながらどの培養条件でも均質な細胞集団にはならず、複数種類の細胞が混じったものとなった。この結果を踏まえ、候補分子による小規模スクリーニングから中～大規模スクリーニングへと進む計画を別資金の研究として申請した。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 2 件)

中島大輝、Cantas Alev、柴田光章、高山了、福田誠、櫻井英俊、戸口田淳也、池谷真ヒト iPS 細胞から誘導した未分節体節細胞の分化能の評価

口頭

第 15 回日本再生医療学会

2016/3/18

大阪国際会議場、大阪府大阪市

Taiki Nakajima, Mitsuaki Shibata, Satoru Takayama, Makoto Fukuta, Hidetoshi Sakurai, Junya Toguchida, Makoto Ikeya
Efficient induction of presomitic mesodermal cells from human iPSCs

口頭

第 48 回日本発生物学会、

2015/6/3

つくば国際会議場(茨城県つくば市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

池谷 真 (IKEYA, Makoto)
京都大学・iPS細胞研究所・准教授
研究者番号：20442923

(2)研究分担者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA, Junya)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502

(3)連携研究者

櫻井 英俊 (SAKURAI, Hidetoshi)
京都大学・iPS細胞研究所・准教授
研究者番号：80528745

(4)連携研究者

金 永輝 (KIN, Eiki)
京都大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：90620344