

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06485

研究課題名（和文）種特異的発生時間スケールを規定する分子基盤の解析と制御

研究課題名（英文）Understanding the molecular basis that defines species-specific developmental timing

研究代表者

永樂 元次（Eiraku, Mototsugu）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40415097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 88,100,000円

研究成果の概要（和文）：多能性幹細胞からの組織誘導系を用いて種特異的発生様式を規定する分子機構を明らかにしようとした。マウスおよびヒトの脳および網膜オルガノイド系を確立し、継時的なRNA-seqおよび1細胞RNA-seqを行い発生過程の細胞分化動態を比較解析した。その結果、マウス網膜形成過程特異的に寄与する新規の細胞とその形態形成における役割を明らかにした。また、ヒト網膜組織の形成過程に特異的に存在する神経前駆細胞種を新規に同定した。さらに、多能性幹細胞から肢芽組織を誘導する方法を世界で初めて開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界で初めてマウス多能性幹細胞から自己組織化により試験管内で肢芽組織を誘導する技術を開発した。ヒトを含む霊長類由来多能性幹細胞からも同様の肢芽様組織が可能となっており、失った手指の再生応用だけでなく肢芽組織の種特異性の研究への貢献が期待される。また、将来の四肢欠損の再生医療の基盤技術という点でも社会的意義は大きい。さらに、新たにマウス及びヒト網膜発生において種特異的に存在する細胞種及び遺伝子マーカーを複数同定し、これらの機能解析により種特異的な神経組織形成機構の一端が明らかになった。これらの発見をもとに、発生時間の種特異性についての分子基盤の理解が深まることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to elucidate the molecular mechanisms that define species-specificity in development using tissue induction systems from pluripotent stem cells. We established mouse and human cerebral and retinal organoid systems and performed sequential single-cell RNA-seq to compare the dynamics of cell differentiation during development. As a result, we identified novel cells that specifically contribute to the mouse retinal formation process and their roles in morphogenesis. In addition, we identified a novel neural progenitor cell type that specifically exists in the process of human retinal tissue formation. In addition, we developed the means to induce limb bud tissue from pluripotent stem cells.

研究分野：発生生物学、幹細胞生物学

キーワード：形態形成 多能性幹細胞 種特異的発生様式

1. 研究開始当初の背景

発生の時間スケールは種によって異なる。例えば、マウスの妊娠期間は20日前後であるが、ヒトでは280日程度である。妊娠期間と個体サイズの間には相関があることが知られているが、種特異的な発生時間スケールを生む分子基盤はほとんど明らかにされていない。研究代表者らはこれまでに、マウスおよびヒトES細胞から大脳組織や網膜組織を自己組織化的に誘導できる分化培養系を構築してきた。そこでは種特異的な発生の時間スケールも同様に再現される。例えば視細胞が分化するまでに、マウスES細胞の場合は培養20日ほどかかるのに対して、ヒトES細胞の場合では150日以上培養期間が必要である。つまり、多能性幹細胞からの分化誘導系は種特異的な発生時間スケールの分子基盤を研究するための良いモデルとして捉えることができる。研究開始当初は多能性幹細胞からの組織誘導モデルを用いて種間比較解析をする研究は、神経堤など一部の細胞を用いた報告のみであった。本研究では、神経オルガノイドを用いた種間比較実験を行うことで種特異的な発生様式の分子基盤に迫ると同時に、これまでに報告のない組織の多能性幹細胞からの誘導系を確立することを目指した。

2. 研究の目的

我々は、神経組織及び肢芽組織をマウス及びヒトを含む霊長類の多能性幹細胞から誘導する技術を開発し、比較解析することで種特異的な発生様式の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始時点で、マウスおよびヒトES/iPS細胞から大脳組織、網膜組織の誘導技術を開発していた。種間比較のために、既存のマーカー遺伝子の発現パターンをもとに各組織の発生ステージの対応を調べた。対応する各ステージのマウスおよびヒト神経組織の1細胞RNAシーケンズを行った。さらに、網膜組織形成過程の数値シミュレーションとin vitro組織構築系を融合することで、種特異的なサイズや形態形成動態を解釈できるシステムを構築した。さらに、これまでに多能性幹細胞からの誘導報告のなかった肢芽組織を自己組織的に誘導する技術を確立するために、発生学的知見に基づいた培養条件の検討を行った。

4. 研究成果

オルガノイド培養系を用いてヒトおよびマウス網膜組織発生を継時的な1細胞RNAseqにより比較解析した。その結果、マウス発生過程網膜において一過的に出現する細胞集団を同定した。この細胞集団は、神経上皮組織由来にもかかわらず平滑筋とよく似た遺伝子発現パターンを示した。その中でもアクチン制御因子として知られるTaglnに注目し、その機能解析を行った。その結果、Taglnの発現は細胞の力学的環境に制御されており、眼杯形成過程において上皮の厚さを制御することで適切な形態形成に寄与することがわかった。このことは神経上皮を由来として動的に収縮を繰り返す、平滑筋様の組織が形成されるという点において、形態形成の新たな知見をもたらした (Seto et. al., in preparation)。

また、数値シミュレーションと網膜オルガノイド培養系を組み合わせた研究によって、眼杯形成機構についての力学フィードバック機構を明らかにした (Science Advances, 2018)。眼杯組織の形作りでは、多くの細胞が増殖したり、死んだり、異なる細胞種へと分化したり、変形したりしながら、組織全体の立体的な形を作る。このような複雑な形作りの仕組みを理解するため、コンピュータを使って組織の立体的な動きを予測するシミュレーション技術を開発した。このシミュレーション技術により、細胞の増殖、変形、粘性、細胞死、移動や力学的な特性など多様な細胞現象を再現し、コンピュータ内のバーチャルな世界で器官の形作りを再現するだけでなく、その細胞レベルの変形メカニズムを予測した (図1下)。さらに、シミュレーションによって予想された変形機構を、ES細胞から作製した眼杯組織 (図1上) を使った実験で検証した。

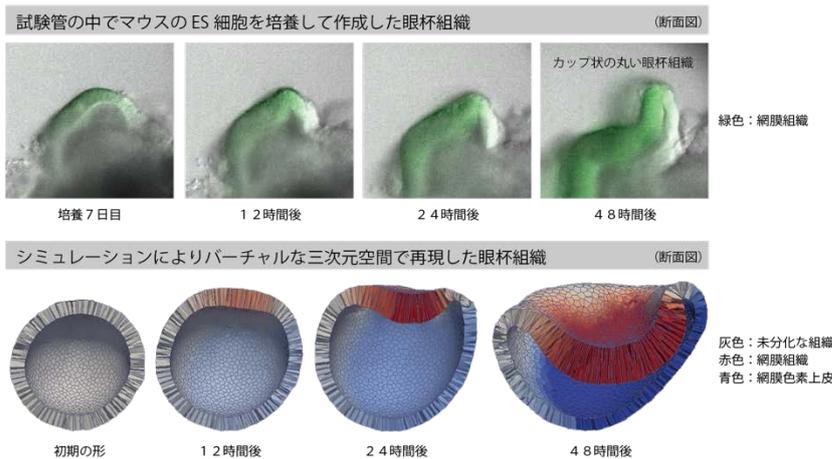


図1：シミュレーションにより再現した眼杯組織の形作り

この時、突出した組織の先端が網膜組織へ分化し、内側に溜まったミオシンの働きが弱まることで、網膜組織が自発的に内側へ入り込む (①)。この網膜組織の自発的な入り込みにより、網膜組織と周辺の網膜色素上皮との境界 (カップの縁) の細胞は、外力により曲げられる (②)。この境界の細胞は、曲げられたことで生じる歪みを感じ取り、それをきっかけにして組織の厚み方向に沿って能動的に収縮することで、網膜組織をさらに内側へ押し込む (③)。つまり、境界の細胞は、機械的な力を通して、眼杯組織全体の変形度合いを感じながら、その丸い形を微調整していることが明らかになった。

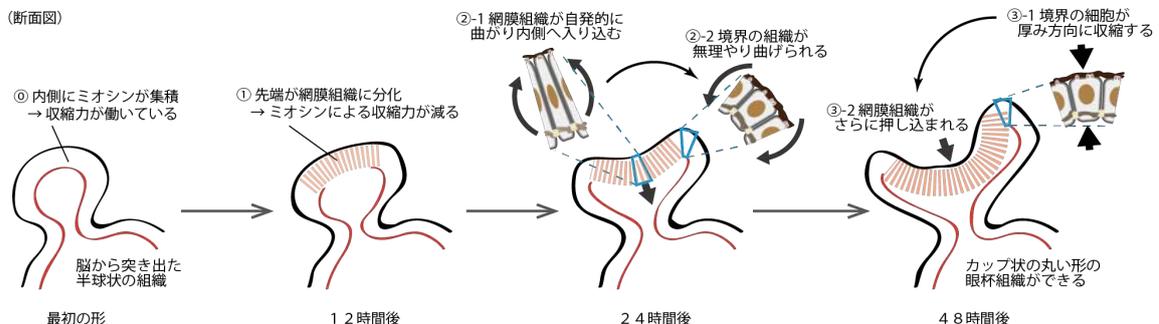


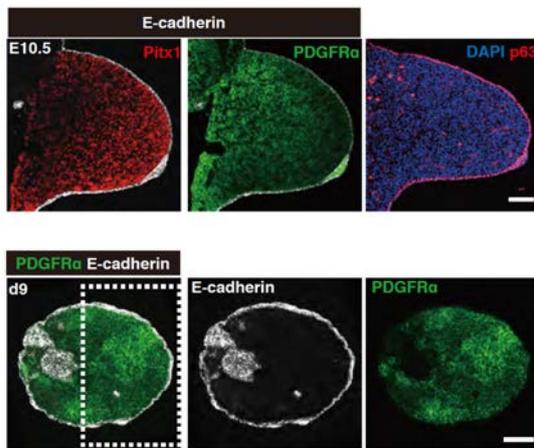
図2：1つ1つの細胞が機械的な力を通して眼杯組織全体の丸い形を調整する

また、この組織形態の調節機構の発見により、本研究グループが開発したシミュレーション技術が器官の形作りの予測に役立つことが示され、器官の形作りの理解に向けた新しいアプローチとなることを提案した。また、この機構をうまく利用することができれば、試験管内での器官の

数値シミュレーションからの予測とES細胞分化誘導系による実験的検証の結果、眼杯組織の丸い形は、図2のような機構により作られることが分かった。はじめに、脳から突出した神経組織の内側の面には、ミオシンが集まり、内側の面を収縮する力が働く (ⓐ)。この時、突出した組織の先

形作りをより正確に制御できる可能性も考えられる (Okuda et al., *Science Advances*)。さらに、世界に先駆けて多能性幹細胞から肢芽組織を自己組織化的に誘導する技術を開発した (Nature Communications, 2019)。

本研究では、四肢発生を模倣することでマウス多能性幹細胞から試験管内において四肢の原基である肢芽組織への自己組織化を誘導する手法の確立を目指した。



四肢の発生は体幹から肢芽と呼ばれる突起状の構造が形成されることから始まる。肢芽は体表を覆う表皮外胚葉と側板中胚葉由来の間葉系細胞の 2 種類の組織から構成される。肢芽発生は古くから形態形成のモデルとして研究されてきた。近年、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞から試験管内で機能的な組織を誘導するオルガノイドと呼ばれる技術が盛んに研究されているが、肢芽のように複数の胚葉由来の組織を試験管内で誘導することは困難であった。我々

はマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) の胚葉体に表皮外胚葉と側板中胚葉を同時に誘導することにより世界で初めて肢芽様組織の試験管内誘導に成功した。我々はこれまでに、網膜組織や大脳組織などの外胚葉性の神経組織をマウスおよびヒト多能性幹細胞から誘導する方法論 (SFEBq 法) を開発してきた。今回は、SFEBq 法を中胚葉誘導に拡張することで、側板中胚葉と外胚葉組織を 1 つの胚葉体に誘導することを目指した。その結果、側板中胚葉組織誘導と表皮外胚葉形成のどちらにも関与する BMP シグナルを制御することで、側板中胚葉由来の間葉細胞が表皮外胚葉に包まれた肢芽に似た組織を誘導することがわかった (図 1)。また、体幹の前後軸パターンに関与するレチノイン酸シグナルを制御することで、前肢になる前方肢芽と後肢になる後方肢芽へと選択的に誘導できることも示した。さらに、RNA シークエンスによりゲノムワイドな遺伝子発現パターンを様々な組織と比較した結果、ES 細胞由来の肢芽様組織は、発生過程の肢芽とよく似た遺伝子発現パターンを示した (図 3)。

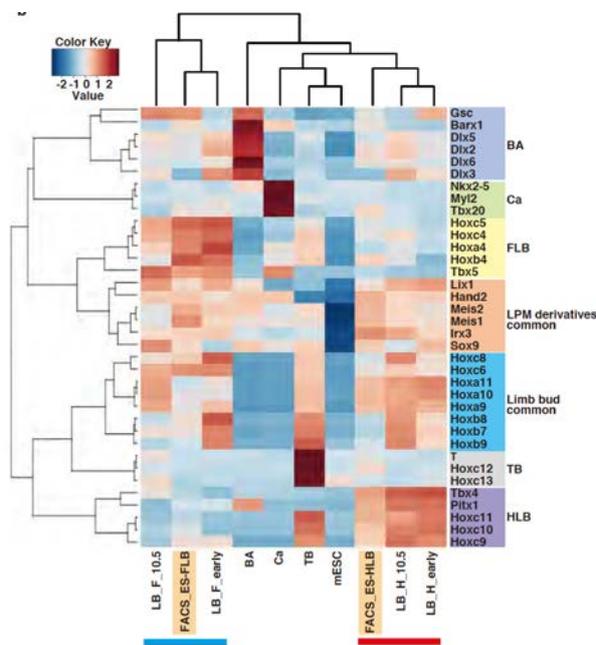


図 3、RNA シークエンスによる遺伝子発現比較。ES 細胞由来の肢芽様組織は、発生過程の肢芽とよく似た遺伝子発現パターンを示す。

さらに、人為的に局所的な背腹軸シグナルを与えることで、肢芽先端部に形成される指パターン形成のオーガナイザーである外胚葉性頂堤 (AER) の誘導にも成功した。最後に、ES 細胞由来の肢芽様組織は発生過程のマウス肢芽に移植することで、正常な四肢形成を阻害することなく軟骨組織、および結合組織へと分化することがわかり、ES 細胞由来の肢芽様組織が四肢を形成できる能力を有していることが示された (図 4)。

今後は、ヒト多能性幹細胞にこの技術を応用し、ヒトの肢芽様組織を試験管内で誘導する技術を確立するとともに、損傷した四肢の再生に貢献できる可能性を探りたい。本研究成果は Nature Communication に掲載された。

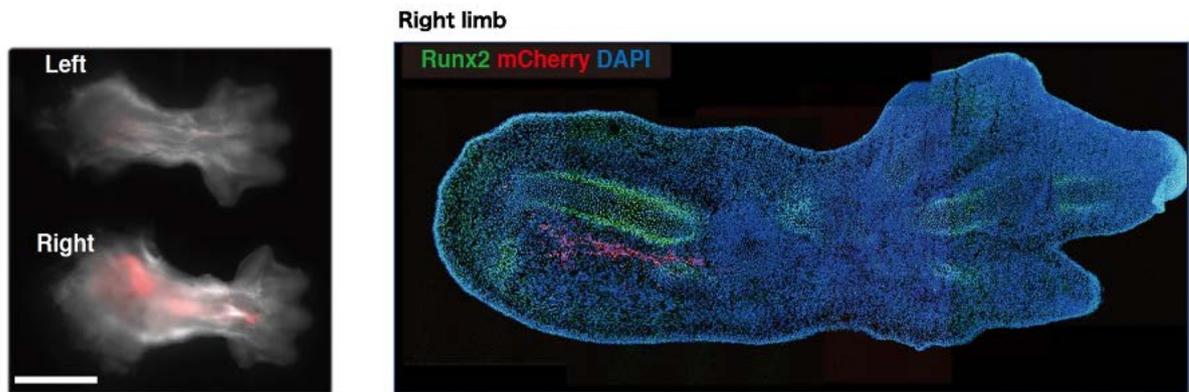


図 4、ES 細胞由来の肢芽様組織を発生過程のマウス肢芽に移植した (赤色)。移植された細胞は軟骨組織および結合組織に分化し、正常な四肢形成に組み込まれた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mori Shunsuke, Sakakura Eriko, Tsunekawa Yuji, Hagiwara Masaya, Suzuki Takayuki, Eiraku Mototsugu	4. 巻 10
2. 論文標題 Self-organized formation of developing appendages from murine pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-11702-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seto Yusuke, Eiraku Mototsugu	4. 巻 61
2. 論文標題 Toward the formation of neural circuits in human brain organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 86～91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceb.2019.07.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okuda S, Takata N, Hasegawa Y, Kawada M, Inoue Y, Adachi T, Sasai Y, Eiraku M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Strain-triggered mechanical feedback in self-organizing optic-cup morphogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaau1354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aau1354.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seto Y, Eiraku M.	4. 巻 138
2. 論文標題 Human brain development and its in vitro recapitulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 33-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.09.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Satoru, Miura Takashi, Inoue Yasuhiro, Adachi Taiji, Eiraku Mototsugu	4. 巻 8
2. 論文標題 Combining Turing and 3D vertex models reproduces autonomous multicellular morphogenesis with undulation, tubulation, and branching	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20678-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takata Nozomu, Sakakura Eriko, Eiraku Mototsugu, Kasukawa Takeya, Sasai Yoshiki	4. 巻 8
2. 論文標題 Self-patterning of rostral-caudal neuroectoderm requires dual role of Fgf signaling for localized Wnt antagonism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01105-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Y, Takata N, Okuda S, Kawada M, Eiraku M, Sasai Y	4. 巻 143
2. 論文標題 Emergence of dorsal ventral polarity in ESC-derived retinal tissue	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 3895-3906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.134601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Mototsutu Eiraku
2. 発表標題 Self-organization of patterned functional tissues from pluripotent stem cells
3. 学会等名 119th International Tissue Conference: Tissue formation and regeneration: from molecules to models (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永樂元次
2. 発表標題 発生システムの試験管内構築と制御
3. 学会等名 日本発生生物学会秋季シンポジウム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mototsugu Eiraku
2. 発表標題 Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells
3. 学会等名 EMBO Workshop :Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永樂元次
2. 発表標題 多能性幹細胞からの神経組織形成～海馬組織の再構成はできるか？～
3. 学会等名 第27回 海馬と高次脳機能学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mototsugu Eiraku
2. 発表標題 Self-organized formation of neural organoids from stem cells
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mototsugu Eiraku
2. 発表標題 Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells
3. 学会等名 DB Symposium 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mototsugu Eiraku
2. 発表標題 Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mototsugu Eiraku
2. 発表標題 Self-organization of patterned tissues from pluripotent stem cells
3. 学会等名 SDB 75th Annual Meeting/ISD 19th International Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Mototsugu Eiraku
2. 発表標題 Self-organization of patterned tissues from pluripotent stem cells
3. 学会等名 Engineering the embryo beyond systems biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Mototsugu Eiraku
2. 発表標題 Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells
3. 学会等名 CDB Symposium 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	奥田 覚 (Okuda Satoru)		
研究協力者	長谷川 結子 (Hasegawa Yuiko)		
研究協力者	高田 望 (Takata Nozomu)		
研究協力者	森 俊介 (Mori Shunsuke)		
研究協力者	瀬戸 裕介 (Seto Yusuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------