

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04799

研究課題名(和文) 幹細胞から初期胚様構造を誘導するための新しい方法論の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new methodology for inducing early embryo-like structures from stem cells

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：オルガノイド形成過程において人為的な物質の濃度勾配を時空間的に自由度高く形成できるシステムを構築した。このシステムを使って、イメージング下において局所的にBMPやWnt, Activin等のモルフォゲン因子を作用させた。その結果、再現性良くprimitive streak用の構造を持つ胚葉体を誘導することに成功した。誘導された胚葉体は三胚葉由来の組織が秩序立って並んだ、初期胚に似た構造を呈することが明らかになった。同時に、初期のカルシウム動体から将来の分化パターンを予測できることをイメージングおよび統計解析により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、胚葉体に対して人為的にモルフォゲン勾配を安定的に作用させるための新規技術を確立した。これにより、より複雑な組織構造や分化パターンを持つオルガノイドを形成できる可能性を開いた。また三胚葉由来の組織を同時に一つのオルガノイド中に形成させることにより、より生体の個体発生過程に似た分化様式を再現することができる。今後はヒト多能性幹細胞にも応用することにより、再生医療や創薬スクリーニングの開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a system that can generate artificial substance concentration gradients with high spatial and temporal freedom in organoids culture. Using this system, morphogen factors such as BMP, Wnt, Activin, etc. were locally applied under imaging. As a result, we succeeded in inducing ESC-derived organoids with a primitive streak-like structure. The induced organoids exhibited a structure similar to the early embryo, in which the tissues derived from the three germ layers were orderly positioned. Additionally, it was revealed by calcium imaging and statistical analysis that the future differentiation patterns can be predicted from a pattern of spontaneous intracellular calcium transients in a early differentiating ESC aggregate.

研究分野：発生生物学

キーワード：モルフォゲン オルガノイド 幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまでに、機能的な立体組織を試験管内形成させることを可能にする多細胞の自己組織化能を利用した方法論と技術を構築してきた(SFEBq法)。同様のアプローチにより、この5年間に網膜や大脳、内耳、腸管上皮、腎臓など様々な立体組織をES/iPS細胞から試験管内で構築できることが示された(ref. 1-4)。これらのin vitroで形成された立体組織は、将来の移植治療(再生医療)や創薬スクリーニング、病態モデル構築などへの活用が期待されており、世界的にも盛んに研究されている分野である。しかし、これらはいずれも単一胚葉由来の細胞をES/iPS細胞から誘導し、その自己組織化能を利用して立体組織を構築したものであり、三胚葉(外胚葉、中胚葉、内胚葉)すべてに由来した細胞が複雑に組合わさった本来の臓器に近い機能的立体組織を多能性幹細胞から構築した例はまだない。我々の神経組織誘導法では、まずES細胞塊を低刺激環境で培養することによってepiblast様の全能性を持った連続上皮からなるボール状の組織が誘導される。これを引き続き低刺激環境のまま培養することで全周性に神経上皮組織が形成され、大脳や網膜など各神経領域へと分化誘導を行う(図1上)(ref. 2)。一方、マウスやヒトの個体発生では、原腸陥入の始めにepiblastが局所的な刺激を受けることにより、原条(primitive streak)が形成される(図1下)。primitive streakから誘導された中/内胚葉性細胞は原腸陥入の過程でダイナミックな細胞挙動を示し、体軸の形成や各臓器形成に寄与する。primitive streakを誘導する分子機構は古くから研究されており、BMPやWntあるいはNodalなどの位置情報シグナル分子が局所的に作用し、その誘導を促すことが明らかにされている。ES細胞の分化過程にこれらの位置情報シグナル分子を添加することによっても、中/内胚葉性の細胞を全周性に誘導することは出来るが(図1上)、誘導された細胞が個体発生で見られるような秩序だった動態を示すことはなく、体軸の形成がin vitroで再現出来たという報告はまだない。これは、多細胞の自己組織化能にゆだねた既存の方法では、個体発生過程で見られる組織間相互作用を介した局所的なシグナル制御を行うことが出来ずに、発生場に複雑な位置情報を与えることが出来ないためだと考えられる。

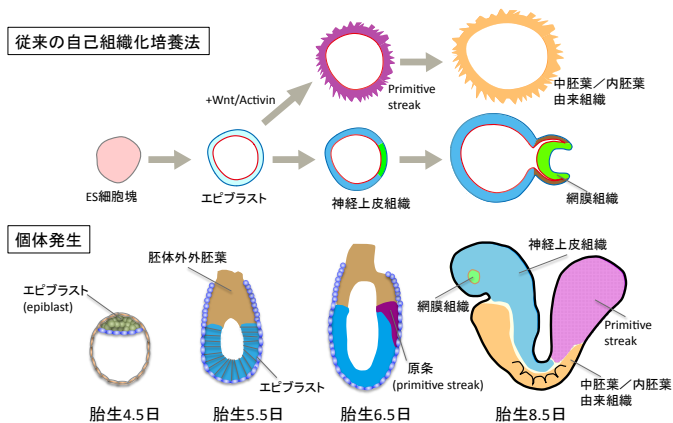


図1 (上) ES細胞塊からの自己組織化培養。低刺激環境ではエピブラストから自己組織化的に神経上皮組織へと分化し、網膜や大脳組織を誘導出来る。エピブラスト状態にWnt/Activinで刺激することによって全周性に中胚葉/内胚葉組織へと分化誘導されるが、体軸が形成されることはない。  
(下) マウスの初期発生。胚体外組織

### 2. 研究の目的

試験管内で機能的な臓器を形成することは細胞生物学の大きな目的の一つである。研究代表者らは、網膜や下垂体など外胚葉由来の組織が、多能性幹細胞から自己組織化的に誘導出来ることを報告してきた。しかし、三胚葉由来細胞が複雑に組合わさった本来の臓器に近い機能的組織を誘導するためには、既存の方法論を超えた新しいアプローチが必要である。臓器形成のための最も効率的で頑強なプロセスは、進化過程で獲得された個体発生プロセスであるが、初期胚形成の創発メカニズムは未知の部分が多い。以上のことから、本研究の目的を以下に定める。

「in vitroで初期発生過程(原腸陥入、体軸形成、体節形成など)を再現し、複雑な臓器を再構築させるための新しい方法論およびイメージング技術の確立」

### 3. 研究の方法

テーマ1: 組織間相互作用を模倣した局所刺激による体軸形成過程のin vitro再現

分化状態をモニター出来る細胞株の作成

以下の遺伝子の発現およびシグナル活性をモニターできる蛍光レポーターマウスES細胞株を樹立した。

Brachyury/Rax/Hand2/Foxj1/Noto/Wnt signal/BMP signal/Shh signal/Ca dynamics

任意のタイミングで複数の局所刺激を行うことの出来るライブイメージングシステムの構築

ピエゾマイクロマニピュレータとインキュベーター型共焦点顕微鏡を組み合わせたシステムを構築し、イメージング下で長期間安定的に人為的な濃度勾配を形成できるシステムを構築し、マウスES細胞の分化培養系に応用した。

**テーマ2：組織の分化状態予測を介したフィードバック操作システムの構築**

初期の分子動態（カルシウム、ATP、ERK）や形態から分化状態を予測するシステムの構築

マウス ES 細胞の分化培養系において、初期の分化状態の時のカルシウム動態を観察し、ダイナミクスの特徴とその後の分化パターンとの相関を調べた。また、IR-DIC 顕微鏡を用いて分化初期の形状を撮影し、その後の分化パターンとの相関を調べた。

4. 研究成果

1. 初期発生過程を再現するための局所刺激システムの開発

マウス ES 細胞塊をマトリゲル中で分化させ、分化 2 日目に局所的に BMP/Wnt/Activin などを用いた。条件検討の結果、再現よく局所的に primitive streak 様の構造を誘導することに成功した。局所誘導された細胞塊では、外胚葉・内胚葉・中胚葉マーカーを発現する細胞が秩序立って分化し、初期胚に似た構造体が形成された。一部は node マーカーを発現する窪んだ上皮構造も観察された。また、局所的に primitive streak を誘導した細胞塊はマトリゲル中において刺激方向に移動した。マトリゲルの動態観察の結果、周辺のマトリゲルが局所誘導された primitive streak 様の構造体の脱上皮した細胞群に向けて牽引されており、その反作用で細胞塊全体が刺激方向へと移動することが明らかになった。これは、原腸陥入において EMT を起こした細胞が強い牽引力を示すこれまでの知見と一致する結果であった（論文作成中）。

また、初期 (day2) の分化状態の時のカルシウム動態を観察した。その結果、自発的なカルシウム伝播が頻繁に観察された。画像処理および統計的な解析を行った結果、これらのカルシウム伝播の起点は、ランダムではなく異方性を示すことが明らかになった。この様な初期のカルシウム動態の異方性はその後の神経分化パターンと相関を示すことを明らかにした（論文作成中）。

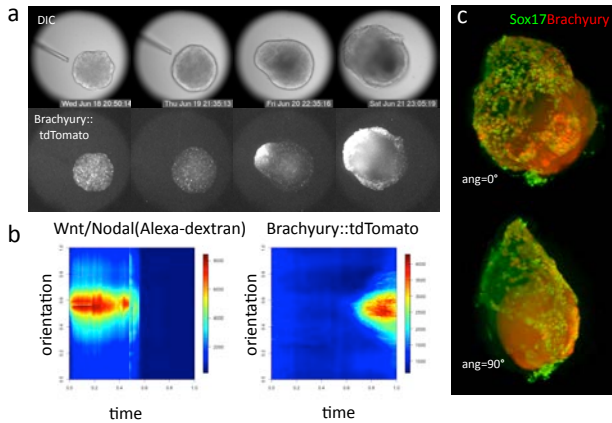
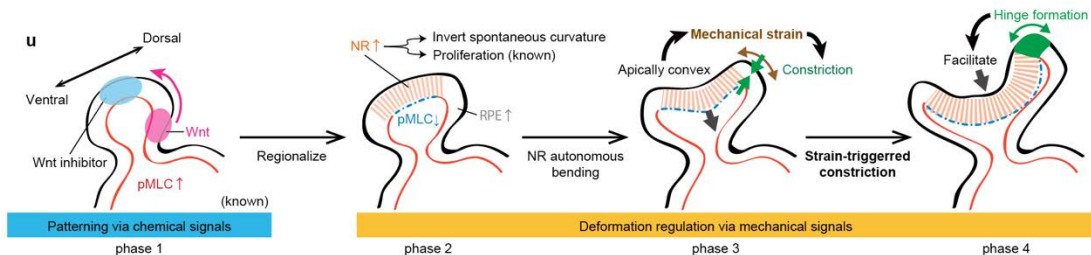


図2 分化途中の ES 細胞塊への局所刺激実験。a) ES 細胞塊への Wnt/Nodal シグナルの局所刺激のタイムラプスイメージング。Brachyury::tdTomato が局所的に誘導される。b) 上記実験の定量解析。c) 局所刺激後(3日後)の ES 細胞塊。胚性内胚葉(緑) 中胚葉

2. 眼杯形成の力学フィードバックシステムの発見

我々はこれまでに、ヒトおよびマウス ES 細胞を用いて眼杯形成が神経上皮の自律的なメカニズムによって起こることを示してきた。しかしながらその詳細なメカニズムについては依然として不明な点が多い。我々はコンピュータシミュレーションを用いて眼杯形成過程の細胞レベルの再現を試みた。その結果、網膜神経上皮が内側に貫入するために必要がいくつかの条件を絞り込み、それに伴う特徴的な細胞現象を予測した。これらの予測を、ES 細胞からの眼杯形成再現系に対して、今回開発した局所刺激システムを用いて、実験的に検証した。その結果、以下の協調的な変形メカニズムがステップごとに働くことが明らかになった。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き(①)。まず、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(②)。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、無理やり曲げられる(③)。この境界の細胞は、無理やり曲げられたことで生じる機械的な力を感じ取り、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(④)。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、その網膜の曲率を調整していることがわかった(Okuda et al., Science Advances, 2018)。



(Okuda et al, Science Advances 2019 より抜粋)

### 3. 網膜オルガノイドを用いた背腹軸形成メカニズムの解明

局所刺激システムを網膜オルガノイド や肢芽オルガノイドに対しても応用し、人為的に背腹軸を誘導することでより生体に近いオルガノイド を形成することに成功した。(Hasegawa et al., Development, 2015, Mori et al., Nature Comm, 2019 (in revision) )。網膜オルガノイド では自発的に背腹パターンが形成されることが明らかになった。この自発的パターン形成には BMP および Wnt シグナルが関与するが、その詳細なメカニズムを明らかにするために、局所的な Wnt シグナルの活性化を試みた。その結果、局所的に Wnt シグナルを活性化された領域の周辺で BMP シグナルが活性化され、背側マーカーである Tbx5 が誘導されることが明らかになった。これは Wnt から BMP への連続的なシグナル経路が網膜の背側誘導に関与することを示す初めての証拠である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Seto Y, Eiraku M, Human brain development and its in vitro recapitulation, Neurosci Res, 査読有、138、2019、33-42  
DOI:10.1016/j.neures.2018.09.011
- ② Okuda S, Takata N, Hasegawa Y, Kawada M, Inoue Y, Adachi T, Sasai Y, Eiraku M, Strain-triggered mechanical feedback in self-organizing optic-cup morphogenesis, Sci. Adv, 4 巻、2018、eaau1354  
DOI: 10.1126/sciadv.aau1354
- ③ Okuda S, Miura T, Inoue Y, Adachi T, Eiraku M, Combining Turing and 3D vertex models reproduces autonomous multicellular morphogenesis with undulation, tubulation, and branching, Sci Rep, 査読有、8 巻、2018、2386  
DOI: 10.1038/s41598-018-20678-6
- ④ Takata N, Abbey D, Fiore L, Acosta S, Feng R, Gil HJ, Lavado A, Geng X, Interiano A, Neale G, Eiraku M, Sasai Y, Oliver G, An Eye Organoid Approach Identifies Six3 Suppression of R-spondin 2 as a Critical Step in Mouse Neuroretina Differentiation, Cell Rep, 査読有、1 巻、2017、1534-1549  
DOI:10.1016/j.celrep.2017.10.041
- ⑤ Takata N, Sakakura E, Eiraku M, Kasukawa T, Sasai Y, Self-patterning of rostral-caudal neuroectoderm requires dual role of Fgf signaling for localized Wnt antagonism, Nat Commun, 査読有、8、2017、1339  
DOI: 10.1038/s41467-017-01105-2
- ⑥ Takata N, Eiraku M, Stem Cells and genome editing : approaches to tissue regeneration and regenerative medicine, Journal of Human Genetics, 査読有、63 巻、2017、165-178  
DOI:10.1038/s10038-017-0348-0
- ⑦ Okuda S, Unoki K, Eiraku M, Tsubota KI, Contractile actin belt and mesh structures provide the opposite dependence of epithelial stiffness on the spontaneous curvature of the spontaneous curvature of constituent cells, Dev Growth Differ, 査読有、59 巻、2017、455-464  
DOI: 10.1111/dgd.12373
- ⑧ Okuda S, Eiraku M, Role of molecular turnover in dynamic deformation of a three-dimensional cellular membrane, Biomech Model Mechanobiol, 査読有、16 巻、2017、1805-1818  
DOI:10.1007/s10237-017-0920-8
- ⑨ Hasegawa Y, Takata N, Okuda S, Kawada M, Eiraku M, Sasai Y, Emergence of dorsal-ventral polarity in ESC-derived retinal tissue, Development, 査読有、143 巻、2016、3895-3906  
DOI:10.1242/dev.134601

[学会発表] (計 13 件)

- ① Mototsugu Eiraku, Self-organization of patterned functional tissues from pluripotent stem cells, 119th International Tissue Conference: Tissue formation and regeneration: from molecules to models (招待講演) (国際カンファレンス)、2019
- ② 永樂元次、発生システムの試験管内構築と制御、日本発生生物学会秋季シンポジウム 2018 (招待講演)、2018
- ③ Mototsugu Eiraku, Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells, EMBO Workshop :Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology (招待講演) (国際学会)、2018

- ④ 永樂元次、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？～、第27回海馬と高次脳機能学会（招待講演）、2018
- ⑤ 永樂元次、多細胞の自己組織発生制御による in vitro での機能的な神経組織形成、第56回日本生物物理学学会年会（招待講演）、2018
- ⑥ 永樂元次、Self-organized formation of neural organoids from stem cells、第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学学会大会、2018
- ⑦ 永樂元次、多細胞体の自己組織的なパターン形成および形態形成メカニズム、Cell aggregation meeting 2018/第6回細胞凝集研究会（招待講演）、2018
- ⑧ 永樂元次、多細胞の自己組織化能を利用した in vitro での機能的立体組織の構築、日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会(招待講演)、2017
- ⑨ Mototsugu Eiraku、Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells、Cold Spring Harbor Laboratory Symposium（招待講演）、2017
- ⑩ 永樂元次、細胞の自己組織化能を利用した in vitro での機能的立体組織の構築、第37回比較眼科学学会年次大会（招待講演）、2017
- ⑪ Mototsugu Eiraku、Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells、CDB Symposium 2017(招待講演)(国際学会)、2017
- ⑫ Mototsugu Eiraku、Self-organization of patterned tissues from pluripotent stem cells、Engineering the embryo beyond systems biology（招待講演)(国際学会)、2016
- ⑬ Mototsugu Eiraku、Self-organization of patterned tissues from pluripotent stem cells、SDB 75<sup>th</sup> Annual Meeting/ISD19<sup>th</sup> International Conference（招待講演)(国際学会)、2016

〔図書〕（計7件）

- ① 永樂元次、「ES・iPS細胞由来オルガノイド作製の技術的、理論的背景（神経系）」、羊土社、実験医学別冊、2019
- ② 瀬戸祐介、永樂元次、「人多能性幹細胞からの網膜オルガノイド作成法」、羊土社、実験医学別冊、2019
- ③ 奥田覚、永樂元次、「三次元バーテックスによる物理シミュレーションとオルガノイドへの応用」、羊土社、実験医学別冊、2019
- ④ 瀬戸祐介、永樂元次「神経オルガノイドの自発的軸形成」、羊土社、実験医学増刊号、2018
- ⑤ 永樂元次、「神経オルガノイドにおける組織自律的なパターンニング機構」、医歯薬出版、医学のあゆみ、2018
- ⑥ 奥田覚、永樂元次、「眼杯オルガノイド×Computational Biology—in vitro と in silico の相補的アプローチ」羊土社、実験医学、2017
- ⑦ 坂口秀哉、永樂元次、「大脳皮質オルガノイド—発生学的観点からの解説とその将来的展望」、羊土社、実験医学増刊号、2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当しない

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：高田 望

ローマ字氏名：Takata Nozomu

研究協力者氏名：奥田 覚

ローマ字氏名：Okuda Satoru

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。