

令和元年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07533

研究課題名(和文) チンパンジーiPS細胞を用いた神経発生の「ヒト化」責任遺伝子の機能的同定

研究課題名(英文) Functional identification of genes responsible for human neural evolution by in vitro differentiation of chimpanzee iPSCs

研究代表者

今村 公紀 (Imamura, Masnaori)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：80567743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経発生のヒト特異性の遺伝子基盤を解明するために、ヒト、チンパンジー、ニホンザルのiPS細胞を用いて初期神経発生を簡便に誘導する手法を開発し、分化過程における遺伝子発現と発生動態の解析を行った。今回開発した分化誘導法(ダイレクトニューロスフェア形成法)では、培養1週間でiPS細胞から神経幹細胞を分化誘導することができた。その間、遺伝子発現プロファイルは段階的に変化し、エピブラスト(1日目)、神経上皮細胞(3日目)、ラジアルグリア(5,7日目)へと細胞運命が転換することが明らかとなった。また、特定の発生段階特異的に発現する新規遺伝子が、ヒトでは発現期間が延長していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「ヒト進化」について考える上で、脳発生進化の遺伝子基盤を解明することは不可欠である。しかし、ヒトやチンパンジーの個体を対象とした分子発生物学的研究には倫理的・技術的限界が多く、現実的ではない。本研究で開発したチンパンジー・ニホンザルiPS細胞およびダイレクトニューロスフェア形成法は、個体では不可能な初期神経発生の研究を細胞培養の形で可能とするものであり、ヒト固有の特性やその分子基盤を解明するための強力なツールとなる。本試みは、ヒト進化生物学/進化医学を確立していくための重要な1歩であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to investigate the molecular foundation underlying human brain evolution. For this aim, we first established chimpanzee and Japanese macaque iPS cells and direct neurosphere formation culture to induce early neural development in vitro. Human, chimpanzee, and Japanese macaque iPS cells underwent sequential early neural development via late epiblast, neuroepithelium, and radial glia by direct neurosphere formation culture. Gene expression profiling identified some developmental stage-specific genes, and one of them exhibited prolonged gene expression pattern in human compared to chimpanzee and Japanese macaque.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：チンパンジー iPS細胞 神経発生 ヒト進化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの知性を考える上で、大脳皮質の発達は発生進化生物学的に非常に重要なイベントであり、比較ゲノミクスの発展によって、大脳形成と高次脳機能のヒト化を司る責任遺伝子について様々な状況証拠が提示されてきた。しかし、これまでの知見では遺伝子の「配列」や「発現パターン」との相関は示されているものの、「機能」や「表現型」に関する実証的なエビデンスは乏しい。その原因としては、ヒトやチンパンジーの神経発生動態やその分子機序を継時的に追跡・操作することに対する倫理的・技術的制限が律速となり、因果律を実証するための実験を行うことが困難であることが大きい。

一方、iPS細胞という新たな細胞供給システムの確立を受け、任意の動物種・細胞系譜の発生・分化を培養下で再構成する試みが可能となった。iPS細胞は培養細胞であることから、強制発現やノックダウン、ゲノム編集などの遺伝子操作を施すことも容易である。従って、iPS細胞の分化誘導系を利用することにより、チンパンジー/ヒト間の神経発生動態の比較や、遺伝子操作・表現型解析による「ヒト化責任遺伝子」の機能的検証を行うことも可能である。チンパンジー/ヒト間における神経特性の差異を特定の遺伝子機能によって再現することが出来れば、「ヒト化」の強力なエビデンスとなると考えられる。

### 2. 研究の目的

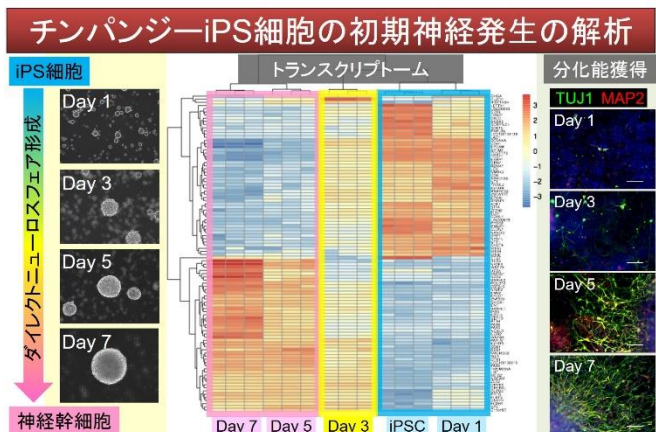
本申請プロジェクトでは、「神経発生のヒト化(ヒト進化)を駆動する分子基盤」を解明するために、ヒトと最も近縁な動物であるチンパンジーとヒトのiPS細胞から培養下で神経発生を誘導し、ヒト特有の神経特性/表現型をもたらす「ヒト化責任遺伝子」の探索と機能解析を目指し、研究に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

既に作製済みのチンパンジーiPS細胞株に対して、RT-PCRや免疫染色による分化多能性マーカー遺伝子の発現解析および胚様体形成培養による三胚葉分化能の検証を行い、初期化レベルの高いiPS細胞株を選別した。続いて、選別したチンパンジーiPS細胞株を用い、神経幹細胞へと効率・再現性良く分化誘導可能な培養系(ダイレクトニューロスフェア形成法)の開発を行った。ダイレクトニューロスフェア形成法を確立した後、初期神経発生動態を解明するために、分化誘導過程における遺伝子発現(Real-time PCR, RNA-seq)とニューロン分化能のタイムコース解析を行った。さらに、ニホンザルやヒトiPS細胞でも同様にダイレクトニューロスフェア形成法を行い、チンパンジー初期神経発生で時期特異的な一過的発現が認められた遺伝子について種間比較解析を行った。

### 4. 研究成果

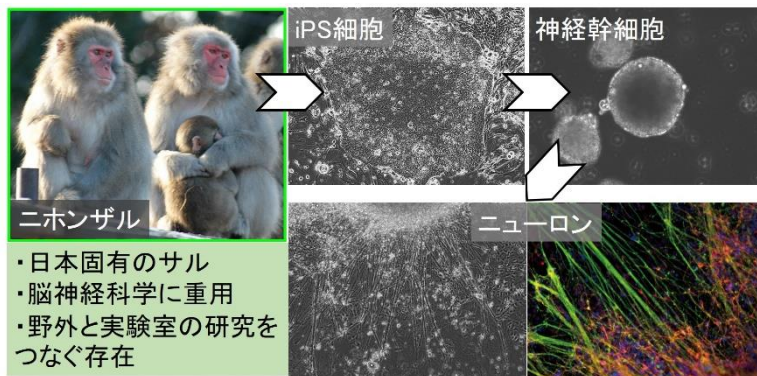
まず、チンパンジー成体皮膚線維芽細胞から作製した複数のiPS細胞株について、未分化状態での遺伝子発現や胚様体形成による三胚葉分化効率の検証を行い、最もクオリティの高いチンパンジーiPS細胞株を選別した。次に、選別したチンパンジーiPS細胞株を用い、ダイレクトニューロスフェア(dNS)形成法による神経幹細胞およびニューロンへの分化誘導系を行った。申請者が開発したdNS形成法では、Dual-Smad inhibitors (Dorsomorphin, SB431542)を用いることで、培養1週間でiPS細胞から神経幹細胞へと分化誘導することが可能である。そこで、iPS細胞から神経幹細胞へと至る分化過程に注目し、チンパンジー初期神経発生の分子基盤の解明を試みた。dNS形成培養1、3、5、7日目の細胞を継時的に回収し、分化誘導過程における遺伝子発現動態についてRNA-seqによるトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、まず各細胞は①iPS細胞とdNS (Day 1)の区分と②dNS (Day 3、5、7)の区分の2つに分岐し(1st shift)、続いて③dNS (Day 3)の区分と④dNS (Day 5、7)の区分に分岐する(2nd shift)ことが判明した。また、iPS細胞とdNS (Day 1)がグループ1、dNS (Day 5)とdNS (Day 7)がグループ3としてそれぞれ比較的近い関係にあり、dNS (Day 3)は両者のグループの中間状態(グループ2)に位置付けられることが判明した。そこで、1st shiftと2nd shiftにおける細胞の発生運命転換を理解するために遺伝子発現のプロファイルを精査したところ、1st shiftでは多能性関連遺伝子の発現消失と神経発生関連遺伝子の発現開始が認められ、多能性から神経発生へのコミットメントが誘発されていることが示された。一方、各dNSを用いてニューロン分化誘導を行ったところ、dNS (Day 3)まではニューロン分化が乏しいものの、dNS (Day 5)以降では高効率でのニューロン分化が観察され、2nd shiftではニューロン分化能が獲得されることが明らかとなった。以上より、dNS形成過程においてiPS細胞から後期前方エピブラスト (Day 1)、初期神経上皮細胞 (Day 3)、脳胞ラジアルグリア



(Day 5、7)へと段階的に発生が進行することが示唆された (Kitajima et al., 論文発表準備中)。

また、チンパンジーiPS細胞のdNS形成過程で発現変化量の大きい遺伝子の中には、神経発生における発現や機能が知られていないシグナル伝達関連遺伝子が含まれていた。興味深いことに、これらの遺伝子はチンパンジーとヒトのiPS細胞のdNS形成過程で発現パターンが異なり、なかでもJAK/STATおよびEGF経路に関わるある因子は、チンパンジーでは対称分裂期の神経上皮細胞で一過的に発現するのに対し、ヒトではその発現時期が延長されていることを特定した。この因子がヒトの神経幹細胞の対称分裂を亢進し、ヒトの脳進化とグリオーマリスクに寄与している可能性が推測されることから、今後は強制発現やシグナル経路操作による機能解析や、ヒトグリオーマにおける発現解析に着手する予定である。

ヒト特異性の解明を試みるにあたり、チンパンジー/ヒトのみの比較解析では、特定した種特異的な現象が「ヒト進化」と「チンパンジー進化」のどちらに起因するのか判断することができない。従って、外群となる他の霊長類の種を組み込むことが必要である。そこで、外群となる比較対象として我が国固有のサルであり、脳神経科学研究に重用されているニホンザルに注目し、iPS細胞を作製した。ニホンザルiPS細胞は基本的にヒトやチンパンジーと同様の分子・細胞特性を示し、dNS形成培養によって神経幹細胞へと分化誘導することも可能であった (Nakai et al., 2018)。また、ニホンザルiPS細胞のdNS形成培養1週間の遺伝子発現を解析したところ、上述のヒト/チンパンジー間で発現期間の違いが認められたシグナル伝達因子は、ニホンザルの初期神経発生過程では一貫して発現しないことが明らかとなり、ヒト進化との関連がより強く示唆された。



Nakai et al. *Scientific Reports* 8(1): 12187, 2018; 今村, 仲井. *academist journal*, 2018年; 各種テレビ・新聞報道

以上の iPS 細胞を利用した初期神経発生の解析に加え、iPS 細胞とは異なる培養条件でのチンパンジー細胞の初期化についても検証を行った。霊長類の iPS 細胞がもつ分化多能性は一般的にプライムド型に分類され、着床後のエピプラストを反映していると考えられている。これに対し、マウスやラットの iPS 細胞の分化多能性はナイーブ型と分類され、着床前の内部細胞塊/エピプラストを反映しているとされる。そこで、チンパンジー線維芽細胞に iPS 細胞初期化因子を導入し、マウスのナイーブ型の iPS 細胞を誘導・維持する基礎培養条件 (N2B27+2i/LIF) で培養を行ったところ、マウス iPS 細胞と類似した形状のコロニーが形成された。これらの細胞は、チンパンジーを含む霊長類 iPS 細胞とは異なり ROCK inhibitor なしで継代が可能であり、正常な核型を維持して安定的・クローナルに増幅培養することができた。しかし、この細胞株における遺伝子発現を解析したところ、多能性関連遺伝子は部分的にしか発現していないのに対し、間葉上皮転換 (MET) 関連遺伝子の発現が完全には抑制されておらず、神経堤細胞発生に関わる遺伝子が異所的に発現していることが明らかとなった。また、初期化因子として導入したトランスジーンのうち、OCT3/4 の発現が内在性の遺伝子発現と置換されておらず、トランスジーンが iPS 細胞の内在性遺伝子と同等レベルに発現していた。こうした特徴的な遺伝子発現が認められた一方で、これらの細胞は免疫不全マウスへの移植によって三胚葉性の腫瘍を形成するほか、胚様体分化誘導によっても三胚葉分化能が確認された。さらに、dNS 形成培養によって末梢ニューロンを高効率に産生することも分かり、iPS 細胞と合わせてヒト進化解明のための発生・進化研究ツールとして利用できると考えられる (Lin et al., 論文投稿中)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① [Risako Nakai](#), Mari Ohnuki, [Kota Kuroki](#), [Haruka Ito](#), Hirohisa Hirai, [Ryunosuke Kitajima](#), Toko Fujimoto, Masato Nakagawa, Wolfgang Enard, [Masanori Imamura](#). Derivation of induced pluripotent stem cells in Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *Scientific Reports* 8(1): 12187, 2018
- ② [今村公紀](#), [仲井理沙子](#). 研究コラム『ニホンザルの iPS 細胞の製作に成功! - 「霊長類学」の新たな可能性-』. *academist journal*, 2018 年
- ③ Akihiko Koga, Hideyuki Tanabe, Yuriko Hirai, Hiroo Imai, [Masanori Imamura](#), Takao Oishi, Roscoe Stanyon, Hirohisa Hirai. Co-opted megasatellite DNA drives evolution of secondary night vision in *Azara's* owl monkey. *Genome Biology and Evolution*, 9: 1963–1970, 2017

[学会発表] (計 29 件)

- ① [今村公紀](#). 知識の源流を探る～アカデミアと産業界による研究テーマの共創～. 第 8 回超異分野学会. ベルサール新宿グランド (2019/3/9)

- ② 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉里, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. 第63回プリマーテス研究会. 日本モンキーセンター (2019/1/27)
- ③ 仲井理沙子, 北島龍之介, 亀田朋典, 平井啓久, 今井啓雄, 今村拓也, 今村公紀. チンパンジー/ヒト iPS 細胞を用いた初期神経発生動態の解析. 第 63 回プリマーテス研究会. 日本モンキーセンター (2019/1/26)
- ④ 仲井理沙子, 北島龍之介, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀. チンパンジー/ヒト iPS 細胞を用いた初期神経発生動態の解析. 第 41 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜 (2018/11/29)
- ⑤ 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉里, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. 第 41 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜 (2018/11/28)
- ⑥ 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. Cryopreservation Conference 2018. 岡崎コンファレンスセンター (2018/10/26)
- ⑦ 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉里, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. Cryopreservation Conference 2018. 岡崎コンファレンスセンター (2018/10/26)
- ⑧ Risako Nakai, Ryunosuke Kitajima, Hirohisa Hirai, Hiroo Imai, Masanori Imamura. Recapitulation of Epiblast-Neuroectoderm-Neural Stem Cell Differentiation from Chimpanzee iPSCs in vitro. 2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Seoul, Korea (2018/9/18)
- ⑨ Haruka Ito, Risako Nakai, Mari Ohnuki, Kota Kuroki, Hirohisa Hirai, Ryunosuke Kitajima, Toko Fujimoto, Masato Nakagawa, Wolfgang Enard, Masanori Imamura. Derivation of induced pluripotent stem cells in Japanese macaque (*Macaca fuscata*). 2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Seoul, Korea (2018/9/18)
- ⑩ Masanori Imamura. Evolutional Developmental Biology and Medicine with Primate Stem Cells. The 73rd Annual Conference of the Korean Association of Biological Science. Pyeongchang Alpensia Resort, Pyeongchang, Korea (2018/8/23)
- ⑪ 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉里, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザルの iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. 日本進化学会第 20 回大会. 東京大学 (2018/8/23)
- ⑫ 仲井理沙子, 北島龍之介, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀. チンパンジー iPS 細胞を用いた初期神経発生動態の解明. 日本進化学会第 20 回大会. 東京大学 (2018/8/22)
- ⑬ 仲井理沙子, 北島龍之介, 平井啓久, 今井啓雄, 岡野栄之, 今村公紀. ヒト/チンパンジー/ニホンザル iPS 細胞を用いた神経発生動態の比較解析. 第 34 回日本霊長類学会大会. 武蔵大学 (2018/7/14)
- ⑭ 今村公紀. 細胞からみた霊長類:「ヒト生物学」に向けて細胞研究は何ができるのか?. 第 34 回日本霊長類学会大会. 武蔵大学 (2018/7/13)
- ⑮ Masanori Imamura. Evolutional Developmental Biology with Primate Stem Cells. International symposium on Genomics and Cell Biology of Primates. Primate Research Institute, Aichi. (2018/3/24)
- ⑯ 仲井理沙子, 北島龍之介, 馬場庸平, 平井啓久, 今井啓雄, 岡野栄之, 今村公紀. ヒトの脳進化を駆動する分子基盤に迫る!—ヒト/チンパンジー iPS 細胞を用いた神経発生動態の比較解析—. 第 7 回超異分野学会 (2018/3/2-3)
- ⑰ 仲井理沙子, 北島龍之介, 馬場庸平, 平井啓久, 今井啓雄, 岡野栄之, 今村公紀. チンパンジー iPS 細胞を用いた神経幹細胞の分化誘導と発生動態の解明. 第 62 回プリマーテス研究会. 日本モンキーセンター (2018/1/27)
- ⑱ 仲井理沙子, 北島龍之介, 馬場庸平, 平井啓久, 今井啓雄, 岡野栄之, 今村公紀. チンパンジー iPS 細胞を用いた神経幹細胞の分化誘導と発生動態の解明. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 神戸ポートアイランド. 2017/12/6
- ⑲ 黒木康太, 大貫茉里, 北島龍之介, 仲井理沙子, 平井啓久, 今井啓雄, 中川誠人, 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製. Cryopreservation Conference 2017. 文部科学省研究交流センター (2017/11/1)
- ⑳ 今村公紀. 研究は流浪とともに〜水、カイコ、iPS 細胞、進化〜. 学生のためのキャリア発見シンポジウム「先人たちの研究人生解体新書」. 京都大学 (2017/10/7)
- ㉑ 今村公紀. 霊長類 iPS 細胞を用いたヒトの進化発生生物学. 第 89 回日本遺伝学会. 岡山大学 (2017/9/15)
- ㉒ 仲井理沙子, 北島龍之介, 平井啓久, 今井啓雄, 岡野栄之, 今村公紀. チンパンジー iPS 細胞を用いた神経幹細胞の分化誘導と発生動態の解明. 日本遺伝学会第 89 回大会. 岡山大学 (2017/9/14)
- ㉓ 仲井理沙子, 北島龍之介, 馬場庸平, 平井啓久, 今井啓雄, 岡野栄之, 今村公紀. チンパンジー iPS 細胞を用いた神経幹細胞の分化誘導と発生動態の解明. 日本進化学会第 19 回大会. 京都大学 (2017/8/26)

- ②④ 岡田佐和子, 仲井理沙子, 北島龍之介, 黒木康太, 今村公紀. 霊長類における幹細胞研究～ニホンザル iPS 細胞を使った新しいアプローチ～. 第 16 回ニホンザル研究セミナー. 京都大学 (2017/6/10)
- ②⑤ Ryunosuke Kitajima, Felix Beyer, Masanori Imamura, Hiroo Imai, Patrick Küry, Hirohisa Hirai. Oligodendrocyte generation from human and chimpanzee neural stem cells with the suppression of p57kip2. CDB Symposium 2017. CDB (2017/3/27-29)
- ②⑥ 今村公紀. リバネス研究費から始まった駆出し大学教員の 0 ベース研究 「iPS 細胞×進化」研究者のケースレポート. 第 6 回超異分野学会. 秋葉原 UDX (2017/3/2)
- ②⑦ Ryunosuke Kitajima, Felix Beyer, Masanori Imamura, Hiroo Imai, Patrick Küry, Hirohisa Hirai. Neural cells generation from human and chimpanzee iPSCs toward comparative analysis. The 50<sup>th</sup> Anniversary Symposium of KUPRI. Primate Research Institute (2017/1/31)
- ②⑧ 今村公紀. 霊長類生殖細胞の発育生物学と iPS 細胞を用いたヒトの進化生物学/進化医学. 第 1 回オモロイ生き物研究会. 定山溪ホテル (2016/10/23)
- ②⑨ Masanori Imamura. Evolutional Developmental Biology and Medicine with Primate Stem Cells. The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health (4th SaSSOH). Hokkaido University (2016/9/21)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

- ① 京都大学 YouTube チャンネル 京大先生シアター. 『iPS 細胞×霊長類学』で、ヒト進化の謎を解く (2019 年 3 月)
- ② ニホンザルの iPS 細胞に関する報道: ABC ニュース、KBS 京都放送、読売新聞 (夕刊 12 面)、毎日新聞 (29 面)、日本経済新聞 (42 面)、産経新聞 (夕刊 11 面)、京都新聞 (28 面)、日刊工業新聞 (3 面)、共同通信など (2018 年 8 月)
- ③ 京都大学案内 2019 知と自由への誘い ～京大は、おもしろい。～. 霊長類研究所は「ヒトとはなにか?」を科学する研究所 (2018 年 7 月)
- ④ 週刊現代 (第 60 巻 第 5 号). 人類の過去と未来が交差する 京大霊長類研究所に潜入! (2018 年 2 月)
- ⑤ Platine (プラティーン) (Vol. 5). 座談会 Talk Session 2 京都大学霊長類研究所ゲノム細胞研究部門ゲノム進化分野研究者の方々×SANPLATEC (2017 年 12 月)
- ⑥ 研究キャリア応援マガジン 『incu・be』 (2017 秋号 vol. 38). 採択が出发点。「何か」が始まる研究費。 (2017 年 9 月)
- ⑦ 京都大学案内 2018 知と自由への誘い ～京大は、おもしろい。～. 霊長類研究所は「ヒトとはなにか?」を科学する研究所 (2017 年 7 月)
- ⑧ テレビ東京 BS ジャパン 未来 EYES. 京都大学霊長類研究所 今村公紀 (2017 年 2 月)
- ⑨ チンパンジー iPS 細胞に関する報道: 中日新聞 (1 面) (2016 年 12 月)
- ⑩ 第 27 回堀科学芸術振興財団研究助成事業 第 3 部研究成果発表会 準優秀賞 (今村公紀, 2019 年)
- ⑪ 2018 International Conference Korean Society for Molecular and Cellular Biology Travel Award (仲井理沙子, 2018 年)
- ⑫ 第 62 回プリマーテス研究会 優秀ポスター発表賞 (仲井理沙子, 2018 年)
- ⑬ 2016 International Conference Korean Society for Molecular and Cellular Biology Travel Award (伊藤達矢, 2016 年)
- ⑭ YG Platinum Award (北島龍之介, 2016 年)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 北島龍之介

ローマ字氏名: KITAJIMA Ryunosuke

研究協力者氏名: 黒木康太

ローマ字氏名: KUROKI Kota

研究協力者氏名：伊藤達矢  
ローマ字氏名：ITO Tatsuya

研究協力者氏名：仲井理沙子  
ローマ字氏名：NAKAI Risako

研究協力者氏名：岡田佐和子  
ローマ字氏名：OKADA Sawako

研究協力者氏名：井藤晴香  
ローマ字氏名：ITO Haruka

※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。