

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08440

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたヒト背側中胚葉の形態形成解析

研究課題名(英文) Analysis of morphogenesis in human dorsal mesoderm from iPS cells

研究代表者

二宮 裕将 (ninomiya, hiromasa)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：40514237

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)：ヒトiPS細胞を用いて、ヒトの胎児内で脊椎・脊髄等のもとになる組織の形が出来る過程を試験管内で制御・再現することに世界で初めて成功した。この実験系の組織形成過程を調べることにより、これまでモデル動物で知られていた組織形成のいくつかの仕組みがヒトにも当てはまることを確かめた。また、胎盤を通過する毒物であるメチル水銀がヒト組織形成を害する過程を再現した。これらの研究により、ヒト組織形成過程の詳細を明らかにする足がかりを得ると共に、新規の毒性評価系開発につながる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで組織形態形成の研究はマウス等のモデル動物を用いて遂行されてきた。本研究で確立した実験系は、ヒトiPS細胞を用いて、意図した場所・方向で組織形成を再現でき、これまで研究する方法が無かったヒト組織の形成過程を調べることが出来る。この実験系はシンプルで扱いやすいので、多くの研究室に対し手軽にヒト組織の研究を試みる機会を提供する。また、病気の原因解明、化学物質の毒性評価、再生医療のための組織調製など様々な研究への応用が可能である。このように本研究成果は広範な分野の研究の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Using human induced pluripotent stem cells, morphogenetic processes of dorsal tissues (backbone anlagen, spinal cord anlagen, etc) in human fetus were reproduced in vitro for the first time in the world. By studying this experimental system, some mechanisms of tissue morphogenesis in human are confirmed to be the same as in model animals. In addition, tissue morphogenesis were impeded by methylmercury, which is a poison passing through placenta, in this experimental system. These results give us clue for a human tissue morphogenesis study, and give a new assessment system for chemical toxicity.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 中胚葉 iPS細胞 組織伸長

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)組織形態形成を制御する仕組み 生体が機能するためには細胞の分化だけでなく、組織レベルの形態が正常であることが必要である。動物の胚発生の初期には細胞の分化・誘導・移動が同時進行し、細胞が正確に配置された精巧な形態を自ら作り上げる。例えば背側組織は分化と共に収斂伸長運動により頭尾方向に伸長する^{1,2}(図1)。様々な組織に見られる収斂伸長は形態形成の代表的なモデルとして研究されてきた。収斂伸長は細胞が挿入運動を繰り返し伸長軸上の細胞数を増やすことにより組織形態を効率的に細長く変化させる自立的な形態形成運動である(図1)。

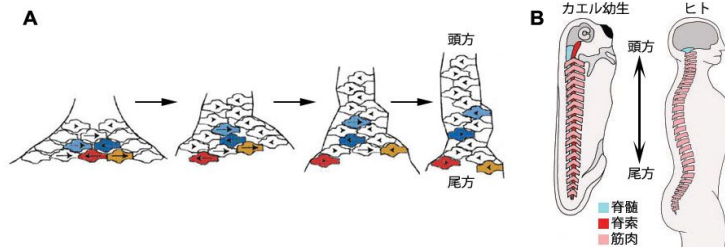


図1. 伸長組織の形成。(A)細胞の動き¹。(B)組織伸長により頭尾方向に伸長した背側組織²。

この細胞運動に必要な多くの遺伝子が報告されているが、細胞運動の方向を決める仕組みは不明だった。研究代表者は両生類脊索が常に組織の極性の方向に伸長することを発見した^{3,4}。これは、分化する際に受ける誘導シグナルの方向に沿った細胞分化状態の差異「前後組織極性」が細胞運動の方向を制御するという仕組みである(図2)。

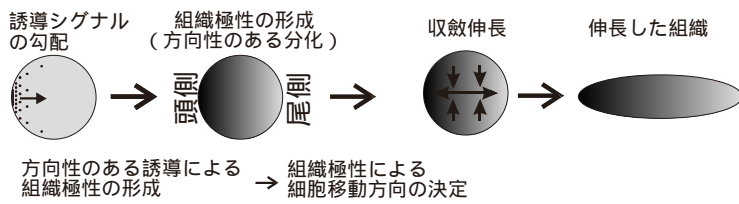


図2. 研究代表者が以前に解明した伸長運動の仕組み^{3,4}。

(2)ヒト組織形態形成の研究 ヒト細胞運動の解析には培養細胞が用いられてきたが、基質に接着する二次元的な培養細胞から細胞同士で接着する三次元的な組織形態形成を理解するのは限界があり、細胞の性質も異なる。近年ヒト iPS 細胞より分化誘導した細胞塊の三次元培養により組織形態を作る方法も報告されている。しかし多くの場合この方法による形態形成は不均一な細胞間のランダムな相互作用に依存しており、形態形成を引き起こす位置と再現性を予測できなかった。よって形態形成の解析に不十分であり、改善の余地があった。さらにヒト組織伸長の in vitro での再現に関しては、これまで報告が無かった。

2. 研究の目的

ヒトの発生、特に胚子期の形態形成に関しては、これまで解析する手段がほとんどなかった。本研究では、研究代表者の開発した方法³(図3)をヒト iPS 細胞の分化誘導系に適用することにより、ヒト組織形態形成を in vitro で制御できる系を開発し、解析した。位置を予測でき再現性が高く、簡便な系を確立し、ヒト背側組織の形態形成様式を解明することを目的とした。

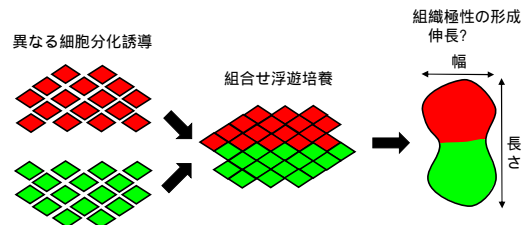


図3. 研究代表者が開発した伸長組織の作成法³。2種の細胞を調製し、組合せ浮遊培養する。長さ/幅の計測により組織伸長を評価する。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から異種の細胞を誘導・調製し、組合せ浮遊培養することにより、組織伸長過程を in vitro で再現した(図3)。この系を用いてヒト組織の形態形成過程の解明を試みた。細胞分化は免疫蛍光染色や定量的 RT-PCR 法により確認し、組織伸長は長さ/幅の計測により評価した。組織伸長過程の動態についてはタイムラプス撮影により経時的かつ定量的に解析した。さらに、形態形成因子の阻害剤を加えた場合の挙動についても調べ、形態形成の仕組みがどの程度保存されるか調べた。また、胎盤通過性の毒物であるメチル水銀処理を加え、形態形成に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1)ヒト iPS 細胞を用いた背側中胚葉伸長形態形成の再現 ヒト iPS 細胞は WNT シグナル賦活化剤(CHIR99021)処理の程度を変えることにより、異なる分化状態の中胚葉細胞になった。定量的 RT-PCR 法により、伸長している組織内に中胚葉遺伝子(TBOX1, CDX2)発現の差「組織極性」が形成されていることが示された(図4)。通常の細胞塊は浮遊培養で球形の組織形態を示すのに対し、分化程度の異なる中胚葉細胞を組合せた細胞塊は、異種細胞の

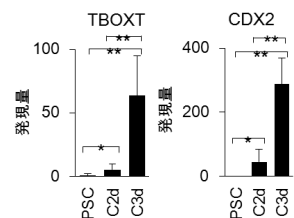


図4. ヒト iPS 細胞から調製した中胚葉細胞(C2d, C3d)の分化。

境界で組織極性の方向に伸長した(図 5A-C)。組織伸長は1,000から20,000細胞の広い組織サイズ範囲で見られ、組織伸長がはっきりと確認できるのは組合せ後16時間以降であった(図 5D)。組織伸長の形態変化の経時的かつ定量的解析により、伸長が細胞の再配置により引き起こされていることが示唆された。また、異なる3系統のhiPS細胞を用いて組織伸長系が再現できることを確認した。このようにヒトiPS細胞を用いて背側中胚葉組織伸長を再現する*in vitro*系を確立した。

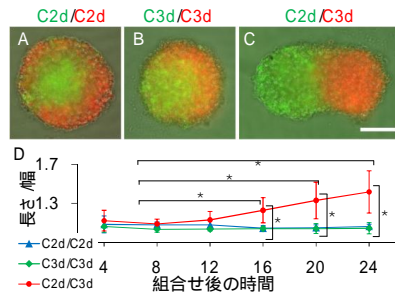


図 5. (A-C) 組合せ中胚葉組織の形態(1日後)。 (D) 組織形態の経時変化。

(2)ヒト背側中胚葉組織伸長の仕組みの解析 モデル動物で組織伸長時の細胞運動に必要であることが報告されている planar cell polarity シグナルのリガンドである *WNT5A* がヒト背側中胚葉で発現していることを確認した。さらに PCP シグナル下流因子である ROCK や MYOSIN II の阻害剤 (Y27632, blebbistatin) で処理すると、ヒト背側中胚葉伸長の伸長が阻害されたことから、ヒトでもモデル動物と同様のメカニズムが働いていることが示された(図 6)。このことより、この*in vitro*系はヒト形態形成研究に有用な系であると考えられる。さらに、この系を細胞が死なない程度の低濃度メチル水銀で処理した場合、組織伸長が抑えられたことから、化学物質に対する鋭敏なリスク評価系として機能することが示唆された。

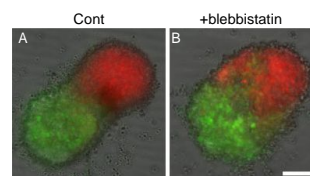


図 6. Blebbistatin 処理による中胚葉組織伸長の阻害。

(3)ヒトiPS細胞を用いた神経形態形成の再現 ヒトiPS細胞より脊髄細胞を誘導した。背側中胚葉組織伸長系の方法と同様に(図 3)、異種の細胞集団と組み合わせることにより、組織極性を誘導し、極性に沿った組織伸長を引き出すことに成功した(図 7A)。また、ヒトiPS細胞より神経幹細胞を誘導した後、細胞塊を播種することにより神経管様の構造である「ロゼット」を作成した。これに対しメチル水銀で処理を施し、細胞死(アポトーシス)が起こることを確認した(図 7B, C)。このことから、神経幹細胞のロゼット系が化学物質に対するリスク評価系として使えることを明らかにした。

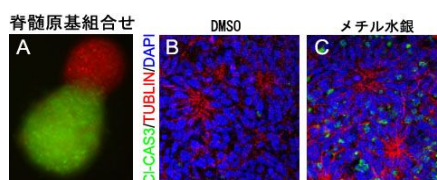


図 7. (A) 組合せ脊髄細胞塊の組織伸長。 (B, C) 神経幹細胞ロゼットのメチル水銀処理は細胞死 (CI-CAS3, 緑) を引き起こす。

(4)まとめ これまで解析する手段が無かった初期ヒト胎児の組織形態形成*in vitro*再現系を開発し、ヒト組織伸長様式が他のモデル動物と多くの部分で共通することを世界で初めて確認した。開発した*in vitro*組織伸長系は通常の細胞培養施設があれば容易に再現することができ、組織伸長までの実験は一週間以内に完了し、形態判定基準が明白であることから解析が容易な系であり、手軽にヒト組織の解析を試みる機会を多くの研究者に提供する。また、この系は先天性奇形の原因解明、遺伝子変異・毒物のリスク評価、さらに再生医療のための組織形態制御など様々な研究に応用できる。このように本研究は多くの研究にインパクトを与えることが期待される。研究代表者は今後、これらの系を用いてヒト形態形成や先天性疾病発症の仕組みをさらに明らかにしていく予定である。

<引用文献>

1. Keller R. Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science*. 298, 2002, 1950-1954.
2. Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell*. 2, 2002, 695-706.
3. Ninomiya H, Elinson R P, Winklbauer R. Antero-posterior tissue polarity links mesoderm convergent extension to axial patterning. *Nature*. 430, 2004, 364-367.
4. Ninomiya H, Winklbauer R. Epithelial coating controls mesenchymal shape change through tissue-positioning effects and reduction of surface-minimizing tension. *Nat Cell Biol*. 10, 2008, 61-69.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Li X, Ohgami N, Yajima I, Xu H, Iida M, Oshino R, Ninomiya H, Shen D, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Arsenic level in toenails is associated with hearing loss in humans. PLoS One. 査読あり, 13, 2018, e0198743.

doi: 10.1371/journal.pone.0198743.

Yoshinaga M, Ninomiya H, Al Hossain MMA, Sudo M, Akhand AA, Ahsan N, Alim MA, Khalequzzaman M, Iida M, Yajima I, Ohgami N, Kato M. A comprehensive study including monitoring, assessment of health effects and development of a remediation method for chromium pollution. Chemosphere. 査読あり, 201, 2018, 667-675.

doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.026.

Ninomiya H, Ohgami N, Oshino R, Kato M, Ohgami K, Li X, Shen D, Iida M, Yajima I, Angelidis CE, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Kato M. Increased expression level of Hsp70 in the inner ears of mice by exposure to low frequency noise. Hearing Research. 査読有, 363, 2018, 49-54.

doi: 10.1016/j.heares.2018.02.006.

Kumasaka MY, Yajima I, Ohgami N, Ninomiya H, Iida M, Li X, Oshino R, Tanihata H, Yoshinaga M, Kato M. Manganese-mediated decrease in levels of c-RET and tyrosine hydroxylase expression in vitro. Neurotoxicity Research. 査読有, 32, 2017, 661-670.

doi: 10.1007/s12640-017-9783-0.

Ohgami N, Oshino R, Ninomiya H, Li X, Kato M, Yajima I, Kato M. Risk assessment of neonatal exposure to low frequency noise based on balance in mice. Frontiers in Behavioral Neuroscience. 査読有, 11, 2017, 30.

doi: 10.3389/fnbeh.2017.00030.

大神信孝, 押野玲奈, 二宮裕将, 李香, 加藤昌志. 物理的環境ストレスが誘発する内耳障害. 日本衛生学会誌. 査読無, 72, 2017, 38-42.

doi: 10.1265/jjh.72.38.

二宮裕将. ヒト iPS 細胞を用いた二分脊椎発症機構の解明. Brain and Spinal Cord “B & C”. 査読無, 24, 2017, 5.

Ilmiawati C, Thang ND, Iida M, Maeda M, Ohnuma S, Yajima I, Ohgami N, Oshino R, Al Hossain A MM, Ninomiya H, Kato M. Limited effectiveness of household sand filters for removal of arsenic from well water in North Vietnam. Journal of Water and Health. 査読有, 14, 2016, 1032-1040.

<https://iwaponline.com/jwh/article-lookup/doi/10.2166/wh.2016.254>

Omata Y, Iida M, Yajima I, Ohgami N, Maeda M, Ninomiya H, Oshino R, Tsuzuki T, Hori M, Kato M. Modulated expression levels of tyrosine kinases in spontaneously developed melanoma by single irradiation of non-thermal atmospheric pressure plasmas.

International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 査読有, 9, 2016, 1061-1067.

<http://www.ijcep.com/files/ijcep0019576.pdf>

〔学会発表〕(計 7 件)

二宮裕将, 大神信孝, 加藤昌志. ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた催奇形性評価系の開発. 第 89 回日本衛生学会, 2019.

二宮裕将, 大神信孝, 加藤昌志. ヒト iPS 細胞由来自律伸長組織を用いた二分脊椎発症リスク評価系の開発. 第 18 回分子予防環境医学研究会大会, 2019.

二宮裕将, 大神信孝, 加藤昌志. ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた中胚葉の組織伸長運動の解析. 第 8 回生理研・名古屋大学医学部合同シンポジウム, 2018.

Ninomiya H. Elongation of posterior dorsal tissue prepared from human induced pluripotent stem cells. 第 51 回日本発生物学会・第 70 回日本細胞生物学会合同大会, 2018.

二宮裕将, 大神信孝, 押野玲奈, 李香, 加藤昌志. 低周波騒音の曝露により変動するストレス分子の探索. 第 88 回日本衛生学会, 2018.

二宮裕将, 大神信孝, 加藤昌志. ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた毒性評価系の開発. 第 87 回日本衛生学会, 2017.

二宮裕将, 大神信孝, 加藤昌志. ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた化学物質の毒性評価の可能性. 第 89 回日本産業衛生学会, 2016.

〔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〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 昌志・ローマ字氏名：(KATO, masashi)

所属研究機関名：名古屋大学・部局名：医学系研究科・職名：教授・研究者番号(8桁):10281073

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大神 信孝・ローマ字氏名：(OHGAMI, nobutaka)

研究協力者氏名：矢嶋 伊知朗・ローマ字氏名：(YAJIMA, ichiro)

研究協力者氏名：Ilmiawati Cimi・ローマ字氏名：(ILMIAWATI, cimi)

研究協力者氏名：押野 玲奈・ローマ字氏名：(OSHINO, reina)

研究協力者氏名：李 香・ローマ字氏名：(LI, xiang)

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。