

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06864

研究課題名(和文) チンパンジー/ヒトiPS細胞の初期神経発生動態から探る「ヒト化」の分子基盤

研究課題名(英文) Investigation of molecular basis underlying human evolution by comparing early neural development from chimpanzee and human iPSCs

研究代表者

今村 公紀 (Imamura, Masanori)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経発生のヒト化の特性と分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細胞を用いた初期神経発生の分化誘導と種間比較解析を行った。具体的には、3種の分化誘導培養における遺伝子発現の変遷やニューロン分化のタイミングについて解析したところ、神経発生に重要な遺伝子の発現はいずれの種においても類似したパターンで観察されるものの、その進行がヒトではチンパンジー/ニホンザルよりも遅いこと、またニューロン分化はチンパンジーよりもニホンザルで先行するなどの異時性を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト脳進化の特異性を解明するためには、ヒトと非ヒト霊長類の脳神経発生を比較解析することが不可欠である。しかし、ヒトやチンパンジーの胚や胎児を対象に研究を実施することは現実的ではない。本研究では、チンパンジーとニホンザルのiPS細胞を作製し、ヒトを加えた霊長類3種のiPS細胞を使用することで、同一の方法による神経発生の分化誘導と培養下での比較解析を実現した。また、これまでの解析結果から、僅か1週間という短期間の分化誘導培養であっても、神経発生のタイミングに種間差が認められることが判明した。神経発生のヒト特異性を解明することで、ヒトの本質とその破綻がもたらす疾患の理解につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the neural developmental characteristics and molecular basis of human evolution, we conducted comparative analysis of the differentiation induction of early neural development using human/chimpanzee/Japanese macaque iPSC cells. We compared the gene expression and neuronal differentiation dynamics among three species and found that although the expression of genes essential for neural development was observed in all species, the progression was slower in humans than in chimpanzees or Japanese monkeys, and that neuronal differentiation happened faster in Japanese than in chimpanzees.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 神経発生 ヒト進化 チンパンジー ニホンザル

1. 研究開始当初の背景

ヒトへと至る霊長類進化は生物学上の大きな命題であり、なかでも知性の獲得は「ホモ・サピエンス (=賢いヒト)」のアイデンティティの根底をなす。ヒトと最も近縁な現生動物であるチンパンジーは、ゲノム配列がヒトと 98.77%相同であるにも関わらず、知性や言語・道具使用をもたらす高次脳機能はヒト固有の特性である。ヒトの知性を考える上で、特に大脳形成は重要な発生進化イベントである。近年の次世代シーケンサーの技術革新に伴い、比較ゲノム解析からヒト表現型を司る「ヒト化責任遺伝子」の探索が隆興し、何かしらのヒト特異性を呈する遺伝子が同定され始めた。しかし、こうしたアプローチではヒト特異的な配列・変異・発現を示す遺伝子は同定できるものの、ヒト固有の表現型すなわち機能的な「ヒト化」をもたらす得るのか、という根本的な因果関係を検証することはできず、相関関係のまま置き去りにされている。その原因としては、ヒトやチンパンジーの神経発生動態と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の実施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現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、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で、チンパンジー/ヒト間での神経発生の動態・分子基盤の比較解析や、遺伝子操作・表現型解析による「ヒト化責任遺伝子」候補の機能的検証を行うことも可能である。本研究に先立ち、申請者はニホンザルおよびチンパンジーの初代培養細胞から iPS 細胞を作製することに成功していた。そこで、本研究では、それら霊長類 iPS 細胞を実際に利用した発生進化研究の展開を試みることにした。

2. 研究の目的

本研究では、脳神経発生のヒト進化に伴う生物学的指向と分子基盤を解明するために、ヒトと非ヒト霊長類の iPS 細胞を用いた初期神経発生の分化誘導系の種間比較を行うことで、ヒト特異的な発生動態・遺伝子発現プロファイルの特定と、「ヒト化責任遺伝子」候補の機能解析に基づく実証的研究の基盤づくりを目指した。チンパンジー/ヒト間における表現型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、神経発生の「ヒト化」の強力なエビデンスになると考えられる。これにより、遺伝子配列ベースの解析に欠けていた実証的研究を補完し、ヒト進化生物学を「相関」の研究から「実証」の研究へと飛躍させることができると考えた。

3. 研究の方法

新たなチンパンジー iPS 細胞株の作製については、皮膚由来線維芽細胞および末梢血単核球へのセンダイウイルスベクターによるヒト初期化因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53 shRNA) の導入を行った。樹立したチンパンジー iPS 細胞株に対して、免疫染色による分化多能性マーカー遺伝子の発現解析や胚様体形成培養による三胚葉分化能の検証を行った。また、小型類人猿であるシロテナガザルの iPS 細胞の作製について、皮膚由来線維芽細胞への SRV ベクターによるヒト初期化因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、C-MYC) の導入を行った。

ヒト/チンパンジー/ニホンザルの iPS 細胞を用いた初期神経発生の分化誘導に関しては、申請者が考案したダイレクトニューロスフェア形成法による分化誘導培養を適用し、Real-time PCR によるマーカー遺伝子の発現解析、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析、ニューロン分化誘導培養を継時的に行った。また、トランスクリプトーム解析によって、初期神経発生への寄与が推測されたシグナル伝達経路について、低分子化合物の阻害薬を用いたダイレクトニューロスフェア形成過程における薬理的な機能解析を行った。一方、神経幹細胞の純化増幅培養として、ダイレクトニューロスフェア形成から接着培養への移行を行い、複数のチンパンジー iPS 細胞から神経幹細胞株を樹立した。

種特異的な遺伝子の機能解析としては、ヒト/チンパンジー/ニホンザルのダイレクトニューロスフェア形成において発現パターンに違いが認められた CUZD1 に着目し、ヒト CUZD1 強制発現ヒト/チンパンジー iPS 細胞を作製した。さらに、マウス ES 細胞においてもヒト CUZD1 の強制発現を行い、細胞特性の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 霊長類 iPS 細胞の作製

本研究に先立ち、申請者はプラスミドベクターの導入によってチンパンジー iPS 細胞に加え、プラスミドベクターおよびセンダイウイルスベクターの導入によってニホンザル iPS 細胞を作製していた。これを踏まえ、ドナー個体と iPS 細胞株のバリエーションを増すために、新たにセンダイウイルスベクターの導入によるチンパンジー iPS 細胞の作製を行った。樹立した iPS 細胞の 5 株について、性状解析と分化誘導による分化多能性の検証を行い、さらにダイレクトニューロスフェア形成によって神経幹細胞への選択的な分化誘導を行った。また、共同研究を通じてチンパンジー以外の大型類人猿についても、ゴリラとオランウータンで iPS 細胞を作製したほか、

ボノボの末梢血単核球の採取と凍結保存を行った。一方、小型類人猿のテナガザルに関しても、SRV ベクターの導入によって iPS 細胞を作製することに成功した。

(2) 初期神経発生の分化誘導

チンパンジーiPS細胞のダイレクトニューロスフェア形成1、3、5、7日目の細胞についてRNA-seqによるトランスクリプトーム解析を実施した結果、各細胞は①iPS細胞とダイレクトニューロスフェア (Day 1) と②ダイレクトニューロスフェア (Day 3、5、7) に分岐し (1st shift)、次に③ダイレクトニューロスフェア (Day 3) と④ダイレクトニューロスフェア (Day 5、7) に分岐する (2nd shift) ことが判明した。また、iPS細胞とダイレクトニューロスフェア (Day 1) がグループ1、ダイレクトニューロスフェア (Day 5) と (Day 7) がグループ3として比較的近い関係にあり、ダイレクトニューロスフェア (Day 3) は両者のグループの中間 (グループ2) に位置付けられた。1st shiftと2nd shiftにおける細胞運命を解明するために遺伝子発現を精査したところ、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。さらに、各ダイレクトニューロスフェアのニューロン分化誘導を行ったところ、ダイレクトニューロスフェア (Day 3) まではニューロン分化が乏しいものの、ダイレクトニューロスフェア (Day 5) 以降は高効率で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判明した。以上より、dNS形成過程においてiPS細胞から後期前方エピプラスト (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。

チンパンジーの結果を踏まえ、ヒトおよびニホンザルiPS細胞を用いたダイレクトニューロスフェア形成培養を同様にを行い、ヒト/チンパンジー/ニホンザルの比較解析を行った。まず、初期神経発生の進行に重要な遺伝子の発現パターンを比較したところ、一部の遺伝子においてニホンザル、チンパンジー、ヒトの順に発現上昇のタイミングが遅延することが明らかになった。また、ニューロン産生能が獲得される時期に注目したところ、チンパンジーではdNS形成培養3日目から5日目の間にニューロン分化能が獲得されるのに対し、ニホンザルでは培養1日目から3日目の間に獲得されることが明らかになり、神経上皮細胞 (NE) -放射状グリア細胞 (RG) 転換のタイミング (ニューロン分化能の獲得) に種特異的な異時性があることが示唆された。

また、各種の神経幹細胞の特性比較と遺伝子機能解析を行うためのツールとして、神経幹細胞の純化増幅培養を試みた。チンパンジーiPS細胞6株について、ダイレクトニューロスフェア形成7日目の細胞を接着条件下に移行し、神経幹細胞マーカーの発現とニューロンおよびアストロサイトの分化能をもつ長期継代可能な細胞株を樹立した。

(3) 初期神経発生の分子基盤解析

チンパンジー/ニホンザル間で細胞運命転換タイミングの異時性が認められたNE-RG転換に着目し、発生動態と相関する遺伝子発現の種間比較解析に取り組んだ。まず、ニホンザルではチンパンジーよりもニューロン分化能の獲得時期が先行する現象について、両種のiPS細胞のダイレクトニューロスフェア形成過程における遺伝子発現の比較解析を実施し、初期神経発生を制御する重要なコア遺伝子の発現は概ね共通していることを明らかにした。一方、チンパンジーでニューロン分化能獲得前に一過的に発現上昇する遺伝子に関しては、ニホンザルで先行した発現またはチンパンジーとは全く異なる発現パターンを示すことを見出した。さらに、これら発生段階特異的かつ種特異的な遺伝子はヒトにおいてチンパンジーやニホンザルとも異なる発現パターンを示したことから、それら遺伝子のうちの一つであるCUZD1に注目し、ヒトCUZD1遺伝子の強制発現や内在性CUZD1のノックダウンを施した細胞株の作製を行った。それらの細胞株のうち、ヒトCUZD1を強制発現させたマウスES細胞において、野生型のマウスES細胞に比べて増殖能力が亢進することが認められた。

また、NE-RG転換を促す分子制御基盤を解明するために、チンパンジーiPS細胞のダイレクトニューロスフェア形成過程のトランスクリプトームデータに基づくパスウェイ解析を行った。その結果、ダイレクトニューロスフェア形成培養3日目と5日目の間ではシグナル伝達関連遺伝子の発現変動が大きいことが判明した。そこで、チンパンジーのダイレクトニューロスフェア形成3日目の細胞に対して低分子化合物を用いた薬理的なシグナル伝達経路の阻害を行ったところ、STATシグナル伝達経路を阻害した場合にはニューロスフェアの細胞死が、NOTCHやWNTシグナル伝達経路を抑制した場合にはRGマーカー遺伝子の発現上昇が抑制されることを見出した。さらに、ダイレクトニューロスフェア形成3日目の細胞からニューロンへの分化を誘導した際、ニホンザルではNOTCHシグナル関連遺伝子の自発的な発現誘導が誘発されるのに対し、チンパンジーでは発現誘導が起こらないことが判明した。初期神経発生の進行に重要なコア遺伝子の発現パターンは両種でほぼ共通していることから、初期神経発生のコアネットワークを調節するサブネットワークの違いが、チンパンジーとニホンザルのニューロン分化能獲得時期の種差をもたらしていると示唆された。現在、ヒトiPS細胞の初期神経発生過程のRNA-seqデータの取得も完了し、ヒト/チンパンジー間でのトランスクリプトームの比較解析に着手している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 今村公紀, 仲井理沙子	4. 巻 -
2. 論文標題 ヒト脳進化研究としてのチンパンジーiPS細胞「ヒトの知性」の解明を目指して、脳の形成プロセスを追う	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 academist Journal	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) なし	査読の有無 無
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 今村公紀	4. 巻 11
2. 論文標題 生命医科学における霊長類のiPS細胞	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 162-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Cody A. Ruiz, Morgan E Chaney, Masanori Imamura, Hiroo Imai, Anthony J. Tosi	4. 巻 89
2. 論文標題 Predicted structural differences of four fertility-related Y-chromosome proteins in <i>Macaca mulatta</i> , <i>M. fascicularis</i> , and their Indochinese hybrids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proteins	6. 最初と最後の頁 361-370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.26021	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 該当する
1. 著者名 Sawako Okada, Kota Kuroki, Cody A. Ruiz, Anthony J. Tosi, Masanori Imamura	4. 巻 62
2. 論文標題 Molecular histology of spermatogenesis in the Japanese macaque monkey (<i>Macaca fuscata</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Primates	6. 最初と最後の頁 113-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10329-020-00857-8	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 該当する

1. 著者名 Ryunosuke Kitajima, Risako Nakai, Takuya Imamura, Tomonori Kameda, Daiki Kozuka, Hirohisa Hirai, Haruka Ito, Hiroo Imai, Masanori Imamura	4. 巻 44
2. 論文標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101749	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 Zachary Yu-Ching Lin, Risako Nakai, Hirohisa Hirai, Daiki Kozuka, Seiya Katayama, Shin-ichiro Nakamura, Sawako Okada, Ryunosuke Kitajima, Hiroo Imai, Hideyuki Okano, Masanori Imamura	4. 巻 112
2. 論文標題 Reprogramming of chimpanzee fibroblasts into a multipotent cancerous but not fully pluripotent state by transducing iPSC factors in 2i/LIF culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 67-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2020.01.002	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 今村公紀, 仲井理沙子	4. 巻 -
2. 論文標題 チンパンジーの細胞をリプログラミング - iPSC細胞作製の副産物が示す神経堤細胞様の特性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 academist Journal	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) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 今村公紀
2. 発表標題 ヒト老化表現型/関連疾患のモデルとしての希少疾患ニホンザル家系とそのiPS細胞
3. 学会等名 超異分野学会東京大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村公紀
2. 発表標題 霊長類幹細胞研究の総括
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲井理沙子, 北島龍之介, 今村拓也, 亀田朋典, 井藤晴香, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀
2. 発表標題 霊長類 iPS 細胞を用いたダイレクトニューロスフェア形成培養による初期神経発生の再現
3. 学会等名 第 65 回プリマーテス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山宗太郎, 今村公紀, 糸井川壮大, 吉村崇, 今井啓雄
2. 発表標題 アカゲザル(Macaca mulatta)季節性精子形成を制御するメカニズムの解明
3. 学会等名 第65回プリマーテス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲井理沙子, 北島龍之介, 今村拓也, 亀田朋典, 井藤晴香, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀
2. 発表標題 霊長類 iPS 細胞を用いたダイレクトニューロスフェア形成培養による初期神経発生の再現
3. 学会等名 第10回日本マーモセット研究会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲井理沙子, 北島龍之介, 今村拓也, 亀田朋典, 小塚大揮, 平井啓久, 井藤晴香, 今井啓雄, 今村公紀
2. 発表標題 チンパンジーiPS細胞を用いたダイレクトニューロスフェア形成培養による初期神経発生の再現
3. 学会等名 第36回日本霊長類学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山宗太郎, 今村公紀, 糸井川壮大, 吉村崇, 今井啓雄
2. 発表標題 アカゲザル(Macaca mulatta)精巣の精子形成における組織学的な季節変動
3. 学会等名 第36回霊長類学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sotaro Sugiyama, Masanori Imamura, Akihiro Itoigawa, Takashi Yoshimura, Hiroo Imai
2. 発表標題 Histomorphometrical seasonal changes of spermatogenesis in testis of rhesus macaque monkey (Macaca mulatta)
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Imamura
2. 発表標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of human/non-human primate induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zacahry Yu-Ching Lin, Risako Nakai, Hiroo Hirai, Daiki Kozuka, Seiya Katayama, Shin-ichiro Nakamura, Sawako Okada, Ryunosuke Kitajima, Hiroo Imai, Hideyuki Okano, Masanori Imamura
2. 発表標題 Reprogramming of chimpanzee fibroblasts into a multipotent cancerous state by transducing iPSC factors in 2i/LIF culture
3. 学会等名 2020 ICGSK-APCC7 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Risako Nakai, Ryunosuke Kitajima, Takuya Imamura, Tomonori Kameda, Daiki Kozuka, Hiroo Hirai, Haruka Ito, Hiroo Imai, Masanori Imamura
2. 発表標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 2020 ICGSK-APCC7 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山宗太郎, 今村公紀, 糸井川壮大, 吉村崇, 今井啓雄
2. 発表標題 アカゲザル(Macaca mulatta)精巣の精子形成における組織学的な季節変動
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Risako Nakai, Ryunosuke Kitajima, Takuya Imamura, Tomonori Kameda, Daiki Kozuka, Hirohisa Hirai, Haruka Ito, Hiroo Imai, Masanori Imamura
2. 発表標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第 43 回日本神経科学大会(Neuroscience 2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山宗太郎、糸井川壮大、今村公紀、今井啓雄
2. 発表標題 アカゲザル(<i>Macaca mulatta</i>)における季節性の精巣発達と味覚受容体の関係
3. 学会等名 第64回プリマーテス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲井理沙子、リンザッカリーユーチン、平井啓久、小塚大揮、片山聖也、中村紳一郎、岡田佐和子、北島龍之介、今井啓雄、岡野栄之、今村公紀
2. 発表標題 iPSC初期化因子導入による2i/LIF培養条件下でのチンパンジー線維芽細胞のリプログラミング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村公紀
2. 発表標題 霊長類iPS細胞を用いたヒト進化生物学/進化医学
3. 学会等名 中部幹細胞クラブシンポジウム2019「『幹細胞人類学』-幹細胞でヒトの発生・生理・疾患・進化を理解する-」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村公紀
2. 発表標題 iPS細胞×霊長類学で広がる研究
3. 学会等名 NBRPニホンザル 第15回公開シンポジウム「ニホンザル研究～ここがおもしろい～」(招待講演)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------