

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08342

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来脊髄原基を用いた二分脊椎発症リスク評価系の開発

研究課題名（英文）Establishment of a risk evaluation system for spina bifida using spinal cord primordium derived from human induced pluripotent stem cells

研究代表者

二宮 裕将（Ninomiya, Hiromasa）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：40514237

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：組織伸長の試験管内系を確立し、伸長組織形態形成の仕組みを調べ、さらに試験管内での奇形発症再現を試みた。まず、試験管内において、前方と後方の組織が並置される条件でのみ前後軸方向に組織伸長が起きることを明らかにし、その組織の細胞分化パターンが正常胚と同様であることを確認した。次に試験管内系の伸長時の細胞挙動解析から、有糸分裂ではなく収斂伸長運動が組織伸長の駆動力であることを証明した。さらに伸長組織において、伸長運動関連因子の方向性のある局在を明らかにした。最後に催奇性物質処理や伸長運動関連遺伝子のノックダウンが試験管内系の組織伸長を抑えることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本件研究では正常胚の組織伸長過程を再現する試験管内系を作った。系は細胞種を限定した条件で形態形成を再現するので解析が容易であり、通常の細胞培養施設で再現可能であることから、専門外の多くの研究者にも組織伸長の解析を試みる機会を提供する。我々が系を用いて組織伸長の仕組みを調べた結果、組織の方向性、および伸長運動関連因子の局在が伸長に必要な条件であることが明らかになった。さらに系を用いて奇形発症を再現することにも成功したので、本研究で作った系を用いた解析は、モデル動物やヒト疫学研究で得られた知見との相乗効果で、奇形発症の原因解明・予防法開発に進展をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We established an in vitro system for tissue elongation, investigated the mechanism of elongated tissue morphogenesis, and attempted to reproduce malformations in vitro. First, we proved that tissue elongation occurs in the anterior-posterior axial direction only when the anterior and posterior tissues are juxtaposed position in vitro, and confirmed that the cell differentiation pattern of this tissue is similar to that of normal embryos. Next, convergent extension, not mitosis, is demonstrated as the main driving force of tissue elongation by the analysis of cell behavior during elongation in vitro. Furthermore, cell movements-related factors were shown to localize directionally in elongating tissues. Finally, treatment with teratogens or knockdown of cell movements-related genes have suppressed tissue elongation in vitro.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 細胞運動 組織伸長

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト新生児のかなり多くの割合(2-5%)は奇形児として生まれてくる。奇形の中でも重篤なものは着床後8週間までの胚子期に起こるが、この時期には細胞の誘導・分化・移動・増殖が連動することで、精巧な組織・器官原基の形態を細胞集団自らが作り上げる。例えば頸部より尾方の脊髄・背筋等の背側体軸組織原基は収斂伸長と呼ばれる細胞運動(並び替え)により頭尾方向に伸長する。これは形態形成のモデルとして世界中で研究が進められており、背側体軸の伸長を阻害したモデル動物では奇形である二分脊椎の症状を示す。しかし、胎児期組織形態形成に関する知見のほとんどはモデル動物胚の研究より得られたものである。本研究ではヒト iPS 細胞から背側体軸原基の伸長形態形成過程を再現性高く引き起こせる系を開発し、薬剤処理・遺伝子改変により伸長障害を引き起こす。モデル動物であるツメガエルの胚および外胚葉性幹細胞の系と比較しながら研究を進めることにより、ヒト組織の奇形発症リスク評価系を開発し、その発症機構を解析できるようにする。

2. 研究の目的

これまでヒト培養細胞由来の試験管内伸長組織については報告されていなかった。ヒト iPS 細胞から背側体軸原基の伸長過程を再現することにより、ヒト組織で形態形成を解析できるようになる。これにより、これまで研究されているモデル動物(マウス・ニワトリ・ツメガエル類等)の知見と合わせて奇形発症の仕組みをより良く理解できる。

3. 研究の方法

本研究では研究代表者の研究(*Nature* 2004; *Nat Cell Biol* 2008)を応用して、ヒト iPS 細胞から背側体軸組織の分化と同時に組織前後極性を誘導し、伸長形態形成を再現する試験管内系を確立した。この試験管内系を解析し、組織伸長の仕組みを調べると共に、薬剤処理・遺伝子機能阻害による奇形発症の再現を試みた。実験はツメガエル胚およびツメガエル細胞試験管内系と比較しながら進め、生体の組織形成を反映する系の確立を目指した。

a) 組織分化パターンの確認

誘導した組織が正常に細胞分化し組織極性が形成されていることを確かめるため、背側体軸組織の分化マーカー遺伝子および前方・後方マーカー遺伝子発現の免疫染色(タンパク発現)、*in situ* hybridization (mRNA 発現局在)もしくは RT-qPCR (mRNA 発現定量)法による検出を試みた。

b) 細胞局在因子の解析

形態形成の仕組みがモデル動物と同様か調べるため、細胞内で局在して組織伸長運動に働くとされている planar cell polarity 因子の局在を免疫染色および GFP をつなげた遺伝子の発現により解析した。

c) 形態形成時の細胞挙動の解析

細胞運動を解析するため、生組織の撮影条件を設定し、細胞膜 GFP 等によりラベルした組織をタイムラプス撮影により観察した。また免疫染色した有糸分裂の紡錘体と伸長軸との関係を解析した。

d) 奇形発症の試験管内での再現

試験管内系の薬剤暴露により環境要因による奇形発症の再現を、遺伝子の働きを阻害することにより遺伝的要因による奇形発症の再現を試みた。

参考文献

Ninomiya H, Elinson RP, Winklbauer R. *Nature* 430, 364-367 (2004).

Ninomiya H, Winklbauer R. *Nature Cell Biology* 10, 61-69 (2008).

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞およびツメガエル幹細胞から組織伸長の試験管内系を確立し、ツメガエル胚内の組織と比較しながら解析することにより、伸長組織形態形成過程を明らかにした。さらに薬剤処理や遺伝子阻害実験を試み、環境・遺伝的要因による奇形発症を試験管内で解析できる系を開発した。

a) 組織分化パターンの確認

試験管内系において、前方と後方の組織が並置され、前後組織極性が形成される条件でのみ前後軸方向に組織伸長運動が起きることを確認した。さらに調製した組織の背側体軸細胞分化および前後組織極性(前方および後方遺伝子発現量の前後軸に沿った勾配)の形成が胚内と同様であることを確認した。

b) 細胞局在因子の解析

planar cell polarity シグナル因子が前後方の細胞接着面へ局在していることを確認した。これは因子が収斂伸長運動時の細胞接着面縮小に働くことを示唆する。

- c) 形態形成時の細胞挙動の解析
試験管内組織伸長系の細胞の追跡から、収斂伸長運動が組織伸長の駆動力であることを明らかにした。また、有糸分裂時の紡錘体には方向性が見られないことから、有糸分裂の組織伸長への直接的な関与は少ないことが示された
- d) 奇形発症の試験管内での再現
催奇性物質として知られているレチノイン酸等が試験管内系の伸長を抑えることが示された。また、planar cell polarityシグナル関連遺伝子の変異や後方因子であるFGFの薬剤による阻害も伸長を抑えることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ninomiya H, Intoh A, Ishimine H, Onuma Y, Ito Y, Michiue T, Tazaki A, Kato M	4. 巻 250
2. 論文標題 Application of a human mesoderm tissue elongation system in vitro derived from human induced pluripotent stem cells to risk assessment for teratogenic chemicals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 126124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2020.126124	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 稜介、二宮 裕将、キム ジョンヒョン、前田英次郎、田村 篤敬、松本 健郎
2. 発表標題 シームレスな単軸引張・圧縮による アフリカツメガエル胚の力学特性解明
3. 学会等名 日本機械学会 第 32 回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤稜介、二宮裕将、キムジョンヒョン、前田英次郎、田村篤敬、松本健郎
2. 発表標題 シームレスな単軸引張・圧縮によるアフリカツメガエル胚の力学特性解明
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 健郎、齋藤 稜介、二宮 裕将、キム ジョンヒョン、前田 英次郎、田村 篤敬
2. 発表標題 アフリカツメガエル原腸胚の力学特性：見えてきた引張特性と圧縮特性の大きな違い
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生化学分野ホームページ
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/2seika.dir/index.html>
名古屋大学大学院医学系研究科 環境労働衛生学
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/>
東京大学大学院総合文化研究科 道上研究室
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/michiuelab/publication.html>

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	加藤 昌志 (Kato Masashi)		
研究協力者	大神 信孝 (Ohgami Nobutaka)		
研究協力者	矢嶋 伊知朗 (Yajima Ichiro)		
研究協力者	橋本 和宜 (Hashimoto Kazunori)		
研究協力者	田崎 啓 (Tazaki Akira)		

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