

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22652

研究課題名(和文) ヒト四肢オルガノイドを用いた種間・部位特異的な骨成長メカニズムの研究

研究課題名(英文) The study on mechanisms of species- and position-specific cartilage growth using human limb organoids

研究代表者

堤 璃水 (Tsutsumi, Rio)

京都大学・高等研究院・特定研究員

研究者番号：60876241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス、ヒトの全能性幹細胞から肢細胞を分化させ、四肢軟骨の発生、成長過程を三次元培養下で再構築する実験モデル系を確立することで、四肢形態形成過程の細胞挙動の制御を明らかにし、さらにその種間差を明らかにすることを目的とした。これまで肢細胞から培養下で形態形成させる実験系がなかったため、まずマウス胚から得た肢細胞を三次元培養することで、肢の位置情報に応じて細胞がつくる軟骨の数、形状、伸長の仕方を変化させることができるモデル系を確立した。また、ヒト全能性幹細胞を二次元培養、および三次元培養で分化させ、肢間充織が側板中胚葉から発生する形態形成過程を再現するモデル系をつくることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、三次元培養で四肢形態形成を再構成するモデル系を新たに確立するとともに、ヒト肢芽細胞様の細胞を分化させることで、ヒトの四肢形態形成を培養下で再現することに繋がる成果を得た。このことは、以下4点の発展の可能性を切り開くものであったと考えている。(1)四肢発生に関わる分子が、どのような細胞挙動を制御し、それが組織レベルの形態変化に影響を及ぼすのかを明らかにする発生生物学的知見の解明。(2)四肢形態の種ごとの違いを細胞レベルで理解する進化発生学的知見の解明。(3)ヒトの四肢先天異常の原因となる遺伝変異や薬剤の検証モデルの確立。(4)ヒト四肢の欠損に対する移植治療の確立。

研究成果の概要(英文)：The research aims to establish reconstitutive models of limb cartilage morphogenesis in three-dimensional culture using the cells differentiated mouse and human pluripotent stem cells, to elucidate cellular behaviors governing tissue morphogenesis and their species-specificities. As there has not been an experimental model in which limb cartilage morphogenesis can be recapitulated in vitro, first we collected limb bud cells from mouse embryos and cultured them in a three-dimensional environment. We found the number, shapes, and growth of the cartilage could be manipulated in our model. Next, to establish human version of the in vitro limb morphogenesis model, we differentiated human pluripotent stem cells in two- and three-dimensional culture and recapitulated the morphogenetic process such that limb mesenchyme arise from the lateral plate and successfully derived limb mesenchyme-like cells.

研究分野：幹細胞工学、発生生物学、進化生物学

キーワード：オルガノイド 四肢発生 形態形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

四肢骨格の発生は側板中胚葉が上皮・間充織転換を起こして体幹の側部に移動し、そこで増殖することからはじまる。発生が進むと、肢芽の中で肢間充織が凝集し、軟骨原基に分化する。軟骨はその後、関節軟骨、成長板軟骨を残して骨化する。成長板軟骨は増殖軟骨層、休止軟骨層、肥大軟骨層の3部位に分けられ、ここでの軟骨細胞の働きが、成体サイズに至るまでの骨の成長を司る(図1)。

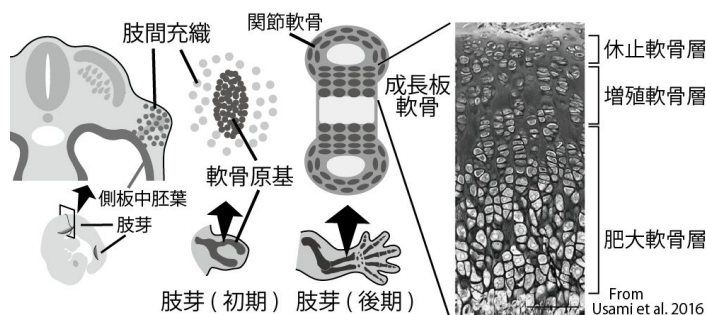


図1. 成長板の発生プロセス

骨の長さは同一個体でもそれぞれの骨格要素(前後肢・基部、中部、先端部)によって異なるし、種によっても異なる。例えば、ヒトでは腕の骨より脚部の骨が長い。また、マカクなど他の現生霊長類と比べても脚部の長さが長く、このことは直立二足歩行を行うヒトの特徴といえる。このような、部位・種特異的な骨成長の違いには、肥大軟骨の肥大の程度の違いが最も大きく寄与することが知られている^{1,2}。つまり、軟骨が、その位置情報や種によって固有の大きさに肥大する仕組みがあるはずである。本研究では、部位・種特異的な肥大軟骨の肥大の程度の違いはどのように制御されているか?という問いを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

骨成長を制御する分子シグナル系については、遺伝学的解析で比較的良好に研究されてきた。しかし、変異体ではほとんどの場合、体全体の軟骨に異常がでるため、それが部位や種によってどのように異なるかはよくわかっていない。

そこで本研究では、ヒトをはじめとする複数の動物種の全能性幹細胞を三次元的に培養し、成長板軟骨に分化させて骨成長過程を培養下で再現する系の確立を目的とした。これにより、ライブイメージング、遺伝子操作・薬剤を用いた機能解析のような侵襲的な種間比較実験を世界で初めて可能にし、部位・種固有の骨成長を制御する分子機構を明らかにすることを当初の目的とした。

3. 研究の方法

全能性幹細胞から、部位固有の位置情報をもつ肢間充織細胞への分化系の確立を実現するために、問題を以下2つのステップに切り分けて、並行して開発を進めた。

- ・肢間充織に対して位置情報を付加し、三次元での形態形成を起こさせる。
- ・ヒト全能性幹細胞から肢間充織を分化させる。

(1) 肢間充織に対して位置情報を付加し、三次元での形態形成

軟骨分化を可視化するため、Sox9-GFP ノックインマウス胚から肢間充織細胞を採取した。基部先端部軸の位置情報を制御するモルフォゲンを添加した培地で培養し、肢間充織細胞の遺伝子発現変化を qPCR で確認した。

その上で、モルフォゲンの存在下で三次元培養することで、肢間充織が形態変化を起こしながら軟骨分化する過程を、インキュベータ型コンフォーカル蛍光顕微鏡を用いてライブイメージングで観察した。さらに、形態変化の過程における個々の細胞挙動を観察するため、エレクトロポレーションで一部の細胞に tdTomato を発現させたうえで細胞塊を作り、インキュベータ型二光子顕微鏡にてライブイメージングで観察した。個々の細胞動態は、三次元画像解析ソフト IMARIS を用いて解析した。

(2) ヒト全能性幹細胞から肢間充織を分化

当研究室ですでに、マウス胚性幹細胞から肢芽間充織を分化させる方法を報告した³。ヒト胚性幹細胞から肢芽間充織を分化させる方法を確立するため、ヒト胚性幹細胞を二次元培養、三次元培養にて分化させた。肢芽への分化は、肢芽で発現する遺伝子の免疫染色や、qPCR、Bulk RNA-seq で解析した。

さらに、分化した肢芽間充織から再び、(1)で報告したモルフォゲンの存在下で培養することで、その形態変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 肢間充織に対して位置情報を付加し、三次元での形態形成

モルフォゲンの存在下でマウス胚由来の肢芽間充織細胞を培養することで、過去にニワトリ胚で行われた実験結果⁴と同様に、基部・先端部の位置情報のマーカーである Meis1, Hoxa10, Hoxa13 の発現が変化することを確認した。

そのうえで肢芽間充織細胞から細胞塊を作り、三次元培養を行うことで、マウス胚の基部(上腕骨・大腿骨)や先端部(手・足)の軟骨形態を想起させるような形態形成が起こった。すなわち、基部側のモルフォゲンを与えた場合、できる軟骨は丸い形をとどめたのに対し、先端側のモルフォゲンを与えた場合、棒状の軟骨が成長していく様子を観察することができた。また、

培養を開始する際の細胞数を増やしていくと、細胞塊はそのまま相似形を保って大きくなるのではなく、分岐の数を増やした。このことは、肢間充織細胞には軟骨の太さを決める性質があることを示唆している。一方で、肢間充織を回収する発生ステージや、前肢、後肢といった条件を変えて培養を行ったが、これらの間では大きな違いは見られなかった。

このように、自己組織化的に形態形成を行う仕組みを細胞挙動の観点から説明するため、エレクトロポレーションで一部の細胞をラベルする条件検討を行い、ライブイメージングを行った。その結果、軟骨が伸びていくとき、伸びている部分の細胞は先端に向かって移動するのに対し、それ以外の部分ではランダムな方向に移動していることがわかった。一方、Fgfの下流で活性化するリン酸化 ERK の染色は細胞塊全体の表面でみられたことから、シグナルは細胞塊全体で受け取ることができるものの、その下流で応答する細胞集団は一部に限局し、その細胞群が伸長に寄与することが示唆された。今後は、この細胞群で特異的に発現する遺伝子を同定することで、伸長する細胞が一部に限局する仕組みを明らかにしたいと考えている。

また、複数の軟骨が分岐して伸長するとき、それぞれの軟骨はランダムな方向に伸長していくが、これは先端側のモルフォゲンを培地全体に加えているためであることが考えられる。一方、実際の胚発生においては、モルフォゲンが表皮の先端に形成される、AER と呼ばれる線上の領域から放出されることから、培養条件においても同様の方向性をもってモルフォゲンを与えることで、より生体の肢形態に近いものを作ることができると考え、条件検討を進めている。

(2) ヒト全能性幹細胞から肢間充織を分化

先行研究にて報告されている方法を参考に、ヒト胚性幹細胞を二次元培養で途中まで分化させ、その後三次元培養に切り替えてさらに肢芽間充織に分化させた。その結果、細胞塊からいくつもの出芽構造がでてきた。免疫染色により、これらの出芽物では肢芽間充織のマーカー遺伝子である SALL4 が特異的に発現しており、一方、本体部分では側板中胚葉のマーカー遺伝子である FOXF1 が特異的に発現しており、側板中胚葉から上皮間充織転換を経て肢芽間充織が発生する過程を再現していると考えられた⁵。また、Fgf シグナルに応答して活性化するリン酸化 ERK のシグナルを確認すると、三次元培養の開始時には細胞塊の表面全体で活性化していたシグナルが、出芽物の部分に限局することがわかった。

出芽した構造体が肢芽間充織であることをさらに確認するため、出芽物と本体部分を手で分けてそれぞれ RNA 抽出を行い、qPCR と Bulk RNA-seq を行った。その結果、肢芽間充織のマーカー遺伝子である PRRX1, SALL4, 肢芽基部のマーカーである MEIS1, 肢芽先端部のマーカーである HOXA13, HOXD13 の発現上昇を qPCR で確認した。さらに、Bulk RNA-seq を行ったうえで、ヒト胚の single cell RNA-seq によって同定されたマーカー遺伝子のリストに対して Gene Enrichment analysis を行うことで、出芽物が全身 170 の組織の中で肢芽に最も近く、本体部が側板中胚葉に最も近いことを示した。

次に、これらのヒト肢芽様の細胞を解離・再集合させることで、マウス胚由来の肢芽細胞と同様の培養条件で軟骨の形態形成を引き起こすことができるかを検証している。

本研究は、当初の目的にあったような成長板の作用に基づく軟骨の成長を再現するには至らず、発生初期の肢芽の成長と、軟骨分化過程を再現しているものと考えられる。今後、さらに長期培養することで、より後期の骨成長を再現するモデル系の確立を目指したい。

本研究は、以下 4 点の発展の可能性を切り開くものであったと考えている。

- (1) 四肢発生に関わる分子が、どのような細胞挙動を制御し、それが組織レベルの形態変化に影響を及ぼすのかを明らかにする発生生物学的知見の解明。
- (2) 四肢形態の種ごとの違いを細胞レベルで理解する進化発生学的知見の解明。
- (3) ヒトの四肢先天異常の原因となる遺伝変異や薬剤の検証モデルの確立。
- (4) ヒト四肢の欠損に対する移植治療の確立。

1. Breur, G. J. *et al. Journal of Orthopaedic Research* **9**, 348-359 (1991).
2. Cooper, K. L. *et al. Nature* **495**, 375-378 (2013).
3. Mori, S. *et al. Nature Communications* **10**, 1-13 (2019).
4. Cooper, K. L. *et al. Science* **332**, 1083-1086 (2011).
5. Gros, J. *et al. Science* **343**, 1253-1256 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tsutsumi R, Eiraku M
2. 発表標題 Modeling limb morphogenesis based on positional information in organoids culture in mouse and human
3. 学会等名 ISSCR 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsutsumi R, Eiraku M
2. 発表標題 Modeling limb morphogenesis in 3D culture derived from mouse embryonic limb bud and human ES cells
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsutsumi R, Eiraku M
2. 発表標題 Modeling limb skeletogenesis in organoid culture derived from mouse embryonic Limb bud and human ES cells
3. 学会等名 ISSCR 2021 Virtual Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsutsumi R, Eiraku M
2. 発表標題 Modeling limb skeletogenesis in 3D culture derived from mouse embryonic limb bud and human ES cells
3. 学会等名 The 54th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsutsumi R, Eiraku M
2. 発表標題 Modeling limb skeletogenesis in 3D culture derived from mouse embryonic limb bud and human ES cells
3. 学会等名 Society for Developmental Biology 80th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐久間 一郎、秋吉 一成、津本 浩平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 544
3. 書名 医用工学ハンドブック	

〔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
---------	---------