

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22658

研究課題名(和文)ダイレクトリプログラミングと3次元培養系を駆使した四肢様オルガノドの創出

研究課題名(英文)Generation of a limb-like organoid by taking advantage of direct reprogramming and 3D-culture techniques

研究代表者

熱田 勇士(Atsuta, Yuji)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：80874685

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)：本研究では、四肢形成を司る四肢前駆細胞(LP細胞)を、非四肢由来の線維芽細胞からダイレクトリプログラミングにより誘導し、さらに誘導された細胞を3次元的に培養することで、肢芽様オルガノドを作製することを目標とした。これまでの先行研究により、LP特異的に発現するいくつかの因子が、非四肢線維芽細胞にLP細胞の特性を与えようことを突き止めていたが、本研究でフォローアップの実験を行い、中でも4因子(Lin28, Zbtb16, Prdm16, Lin41)が、リプログラミングにおいて最も重要な役割を担うことを突き止めた(Atsuta et al., bioRxiv, 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出された成果は、四肢形成開始のメカニズムの理解を深めるとともに、四肢再生医療の発展へと寄与することが期待される。

(1) 四肢形成の理解;見出されたリプログラム因子は、四肢形成過程の最初期段階である、四肢前駆細胞の特定化においても中心的な役割を果たすことが考えられる。

(2) 四肢再生医療への応用;本研究成果により手足以外の細胞から直接、LP細胞を作製できることが示唆された。誘導されたリプログラム細胞は細胞治療へと活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The limb bud consists of mesenchymal progenitors derived from the lateral plate mesoderm (LPM) that produce most of the tissues of the mature limb. The LPM also gives rise to the mesodermal components of the flank and neck. However, the mesenchymal cells generated at these other axial levels cannot produce the variety of cell types found in the limb bud, even when exposed to signals responsible for organizing the limb bud. By taking advantage of a reprogramming approach, we find a set of factors (Prdm16, Zbtb16 and Lin28) that are capable of imparting limb progenitor-like properties to non-limb fibroblasts. The reprogrammed cells show similar gene expression profiles, and can differentiate into similar cell types, as endogenous limb progenitors. The further addition of Lin41 potentiates proliferation of the reprogrammed cells while suppressing differentiation. These results suggest that these same four key factors may play pivotal roles in the formation of endogenous limb progenitors.

研究分野：発生生物学

キーワード：四肢前駆細胞 ダイレクトリプログラミング オルガノイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、器官再生を成し遂げるため、線維芽細胞からダイレクトリプログラミングによって目的器官の前駆細胞を誘導し、体外で3次元構造を再建する試みが、様々な器官に対して行われている。過去にカエル、マウスを用いた研究により、胚から得た**四肢前駆細胞 (Limb Progenitors: LP細胞)**を切断肢に移植すると、不完全ながらも四肢再生を促進できることが示されたことから、LP細胞の活用が四肢再生治療における切り札になる可能性がある。しかしながら、昨今の幹細胞・発生生物学の目覚ましい発展を以ってしても、リプログラミングによりLP細胞様細胞を生み出し、さらにそれを用いて3次元構造体をつくり、切断肢を完全な四肢構造で交換、再生するという究極的な細胞療法の実現には未だ程遠い。

2. 研究の目的

本研究では、非四肢由来の線維芽細胞を、四肢前駆細胞へと転換しうるリプログラミング法の確立、そして、そのリプログラム細胞を3次元培養条件下で増殖・分化・パターン化させることで肢芽様オルガノイドを作製することを目指した。

この方法論を打ち立てることで、四肢再生医療分野にブレークスルーがもたらされる公算が大きい。また、線維芽細胞に四肢前駆細胞の性質をもたらすリプログラミング因子は、通常の四肢発生過程、特に四肢前駆細胞の特定化に重要な役割を担っている可能性が高いため、リプログラミング因子の同定は、四肢発生の理解の深化に直結する。

3. 研究の方法

1) 四肢前駆細胞(LP細胞)を生み出すリプログラミング法の確立

研究開始以前に、採択者独自の先行研究によって、マウス線維芽細胞を**四肢前駆細胞様細胞 (induced Limb Progenitor Cell: iLPC)**に転換しうるリプログラミング因子を絞り込むことに成功した(**Prdm16, Zbtb16, Lin28a, Lin41: PZLL**)。誘導されたiLPCは内在のLP細胞と類似した遺伝子発現プロファイル、*in vitro*での分化能を持つ。しかしながら、作製されたiLPCがLP細胞と同質の細胞集団であることを示すには、さらに*in vivo*における分化・パターン形成能を検証する必要がある。

1-1) **分化能の検証**・・・以前、米国での他の研究(Aldea*, **Atsuta*** et al., PNAS, 2021)にて使用していた超音波ガイドシステムを用いてマウス胚肢芽へのiLPCの移植へと応用する予定であったが、コロナ禍によって渡米が困難になったため、ニワトリ胚肢芽を代用した。移植された肢芽を用いて免疫染色、RNA-Seqを行いiLPCの分化能を検証した。

1-2) **パターン形成能の検証**・・・ニワトリ胚を使い置換肢作製実験を行う予定であった。置換肢実験はLP細胞の分化・パターン形成能を調べる決定的なアッセイとして用いられ、高いアクセシビリティを持つトリ胚でのみ実行可能である。LP細胞を使った場合、置換肢は遠近軸(指～上腕)、頭尾軸(親指～小指)、背腹軸(手の甲～手のひら)の3軸に沿ってパターン化された四肢構造をつくる。反対にLP細胞以外の細胞種を使用した場合、四肢様の構造は一切作られない。すなわち、もしiLPCがLP細胞と同質であれば、iLPCの置換肢はパターン化された構造を形成するはずであり、それを指標にPZLLによってダイレクトリプログラミングが完遂したか否かを判断できる。置換肢作製のためには、iLPCsを分取して使用する必要があるため、LP細胞特異的に活性を持つ*Prx1*エンハンサーを利用して*Prx1*-GFPレポーターニワトリを作出し、リプログラムされたiLPCsのみを判別できる系を構築する。

また、リプログラミング効率上昇を目論み、リプログラミング因子発現系の改善を試みた。具体的には、前述の4因子を一挙に発現できるベクターの作製も目指した。

2) ヒト四肢前駆細胞(LP細胞)培養系の最適化

リプログラミングによるヒト iLPC 作製に先立ち、ヒト LP 細胞の培養系改善を試みた。ヒト LP 細胞をヒト胚から採取するのは実質不可能であるため、理研(高里グループ)にて iPS 細胞から作られたヒト側板中胚葉から LP 細胞を誘導し、それを用いて培養条件の検討を行う予定を立てた。さらに最適化された培養系を用いてヒト iLPC リプログラミングに取り掛かる。

3) マイクロ流路デバイスの設計・成型

iLPC による肢芽様オルガノイド創出に取り組む前に、比較的容易に採取できるトリ LP 細胞を使い、マイクロ流路系の条件検討を行う予定であった。特に材質、サイズ、形状、培地成分、流量、流速、タンパク拡散濃度などのパラメーターを調整する。培養されたスフェロイドのパターン形成の可否は、各モルフォジェンの下流遺伝子の発現レベルと局在を調べ判断する(例; *Fgf8:Dusp6*, *Wnt7a:Lmx1b*)。トリ LP 細胞でパターン化したリムボイドを形成させることができれば、引き続き同様の条件を用いて、ヒト iLPC でのオルガノイド作製に挑戦する。

4. 研究成果

1) 四肢前駆細胞(LP細胞)を生み出すリプログラミング法の確立

1-1) 分化能の検証・・・作製されたマウス iLPC が胚内で分化能を示すかについて、マウスニワトリキメラ移植により検証した(図1)。ポジティブコントロールとして用いたマウス LP 細胞は移植された四肢に留まり増殖した一方で、ネガティブコントロールのリプログラミング前の線維芽細胞は四肢内でアポトーシスによって積極的に排除された。iLPC は LP 細胞と同様に四肢内に留まる様子が認められた(図1A)。引き続き、軟骨マーカーである *Sox9*、*Collagen2a1* (*Col2*)、靭帯マーカーである *Col1* に対して免疫染色を行なったところ、LP 細胞と同様に、一部の iLPC が各マーカー陽性の細胞となったことから、iLPC が軟骨、靭帯への分化能を獲得したことが示された(図1B)。さらに、宿主四肢から、移植された LP 細胞および iLPC を FACS を用いて単離し、単一細胞 RNA-Seq (scRNA-Seq) によって遺伝子発現プロファイルを解析した(図1C)。その結果、フラクションごとの割合は若干異なるものの、それぞれのグループで、軟骨、骨芽、靭帯、関節軟骨など、本来 LP 細胞が作るべき組織のマーカー遺伝子の発現が見られた(図1C)。これらの結果は、iLPC が LP 細胞と同様の分化能を獲得したことを強く示唆する(Atsuta et al., bioRxiv, 2021)。

なお、当初の計画通り、PZLL 全てを搭載できるウイルスベクターの作製を試みたが成功には至らず、代わりに PZLL のうち PZL を一挙に発現できるレンチウイルスベクターを作製した。しかしながら、PZLL を個別に発現するウイルスを使った場合と比べ、リプログラミング効率は有意に上昇しなかった。

1-2) パターン形成能の検証・・・*Prx1*-GFP トランスジェニック (TG) ニワトリ樹立を目指したが作製には至らなかった。具体的には、遺伝子改変した始原生殖細胞を利用したトランスジェニックニワトリ作製法に倣い、まず *Prx1*-GFP 配列をゲノムに組み込んだ始原生殖細胞を作製した。さらに名古屋大学鳥類リソースセンターにて、その始原生殖細胞をニワトリ宿主胚へと移植する予定であったが、研究期間内に移植操作を行えず、レポーター-TG 系統を樹立するには至らなかった。

しかしながら、前述の移植されたマウス iLPC の scRNA-Seq 解析により、iLPC 内で四肢の遠近軸を規定する *Hox* 遺伝子群の発現が認められたため、一定のパターン形成能は獲得していることが示唆された。

2) ヒト四肢前駆細胞(LP細胞)培養系の最適化

これまでの LP 細胞培養の条件検討の結果から、*Wnt*、*Fgf*、レチノイン酸 (RA) シグナルの活性化と *BMP/TGF β* シグナルの阻害が LP 細胞の維持に必要なことが明らかになっていた。しかしながら、依然、細胞分化を促す血清成分 (FBS) を含有した培地を使用していたため、LP

細胞の未分化状態を 10 日間程度しか維持することができなかつた。そこで、様々な無血清培地を試用し、幹細胞用培地 TeSR6 にアルブミンを加えたものを基礎培地として用いることで、血清を使わずとも LP 細胞の培養が可能となることがわかつた。そして、ヒト側板中胚葉様細胞を、Wnt, Fgf, RA 活性化条件で 6 日間、Wnt, Fgf, RA 活性化、BMP/TGFβ シグナル阻害条件下でさらに 3 日間培養すると、LP 細胞マーカー遺伝子の発現が誘導されることが示された (図 2A-D)。培養後、その細胞を軟骨細胞培養条件下で培養すると、軟骨細胞へと分化することも示されたことから (図 2E)、LP 細胞マーカー陽性の細胞は、LP 細胞に類似した特性を持っていると考えられる。今後、誘導された細胞の特性解析をさらに進め、LP 細胞が誘導されたか否かを検証する。

3) マイクロ流路デバイスの設計・成型

共同研究を行なっている吉野大輔博士 (東京農工大) からプロトタイプを提供を受けたが (図 3)、研究実施期間内に、その流路デバイスを用いてニワトリ LP 細胞の 3 次元培養条件検討を行うには至らなかつた。

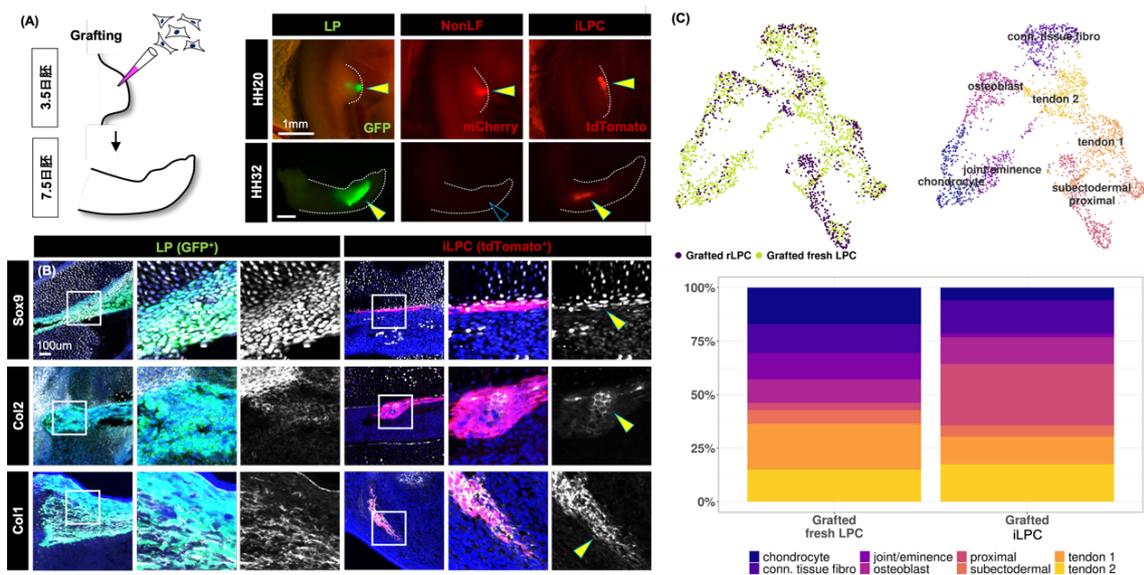


図1 リプログラム細胞 (iLPC) は生体内で四肢前駆細胞と同様の分化能を示す

(A) GFPマウス胚由来の四肢前駆細胞 (LP、緑)、リプログラミング前の線維芽細胞 (NonLF、赤)、リプログラム細胞 (iLPC、赤) をニワトリ胚芽 (3.5日胚) に移植し4日後に観察した。LPおよびiLPCは四肢に留まった一方で、移植されたNonLFは細胞死により排除された。(B) 移植されたLPおよびiLPCは軟骨細胞 (Sox9、Col2陽性) あるいは靭帯細胞 (Col1陽性) へ分化した。(C) 移植された細胞を四肢から単離し、単一細胞RNA-Seqにより解析した。両者ともに軟骨細胞、骨芽細胞、靭帯細胞、結合組織を生み出したことがわかつた。

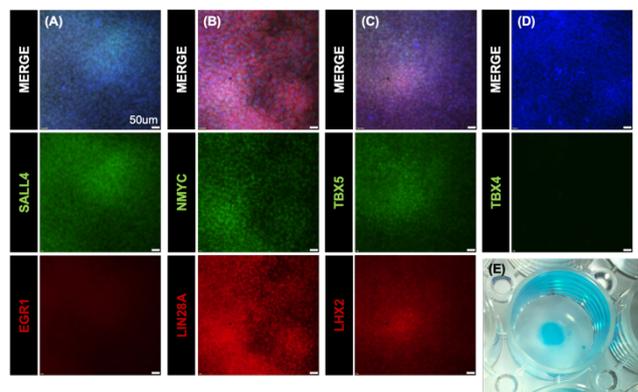


図2 ヒト四肢前駆細胞を誘導・維持する培養系確立の試み

(A-D) iPS細胞から作製されたヒト側板中胚葉をCFRで6日間、さらにCFRSYで3日間培養した後、各種マーカーに対して免疫染色を行った。(A) SALL4 (LPマーカー)、EGR1 (分化マーカー)。(B) NMYC, LIN28A (ともにLPマーカー)。(C) TBX5 (前肢芽マーカー)、LHX2 (LPマーカー)。(D) TBX4 (後肢芽マーカー)。(E) 誘導されたLP様細胞を高密度で培養すると、アルシアンブルー陽性の軟骨細胞へと分化する。

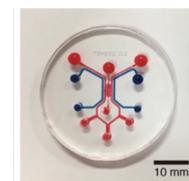


図3 マイクロ流路デバイスの試作品

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomizawa R., Tabin C., Atsuta Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 In ovo electroporation of chicken limb bud ectoderm: Electroporation to chick limb ectoderm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	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） 10.1002/dvdy.352.	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 Aldea D., Atsuta Y., Kokalari B., Schaffner S., Prasasya R., Aharoni A., Dingwall H., Warder B., Kamberov Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Repeated mutation of a developmental enhancer contributed to human thermoregulatory evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2021722118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2021722118.	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 熱田勇士
2. 発表標題 Making vertebrate limbs from non-limb fibroblasts
3. 学会等名 第79回米国発生学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020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			
米国	Harvard Medical School			
スペイン	Universidad de Cantabria			