

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21241048

研究課題名（和文） 両生類臓器発生ロードマップを応用した哺乳類臓器再生法

研究課題名（英文） Mammalian organ regeneration method using the roadmap for amphibian organogenesis.

## 研究代表者

浅島 誠（ASASHIMA MAKOTO）

東京大学・大学院総合文化研究科・名誉教授

研究者番号：00090564

研究成果の概要（和文）：幹細胞を目的の細胞に効率的に分化させる方法の確立は再生医療にとって重要である。ES細胞やiPS細胞などさまざまな幹細胞が作製されているが、これらの細胞の分化誘導法は完全とは言えない。ツメガエルを用いた試験管内での臓器形成法に基づいて、我々は正常発生に不可欠な多くの「ロードマップ」遺伝子を特定した。両生類の臓器発生ロードマップを哺乳類の幹細胞に応用して、試験管内で効率的に分化させるための方法の開発を試みた。

研究成果の概要（英文）：The establishment of efficient methods for promoting stem cell differentiation into target cells is important in regenerative medicine. Although various stem cells, such as ES and iPS cells, are being described, there remains a lack of protocols for inducing the differentiation of these cells. Based on the *in vitro* organogenesis methods using *Xenopus*, we have identified many “roadmap” genes that are indispensable for normal development in various organs. We have applied the roadmap of the amphibian organogenesis to mammalian stem cells, so as to facilitate the development of efficient methodologies for *in vitro* differentiation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	30,800,000	9,240,000	40,040,000

研究分野：複合新領域・ゲノム科学

科研費の分科・細目： 応用ゲノム科学・機能ゲノミクス

キーワード：臓器、幹細胞、分化、再生、ES細胞、心臓

## 1. 研究開始当初の背景

近年 iPS 細胞などの脱分化細胞作製法が発見され、その多分化能を応用した再生医療研究や創薬研究が盛んに行われている。ところが

多能性幹細胞の分化誘導については、その制御技術が依然として不完全であり、目的細胞を定量的に作製する技術も未だ完全に欠落していることが改めて深刻な問題として浮

上してきた。

我々はツメガエルの初期胚から単離した未分化細胞（アニマルキャップ）を用いて、心臓、膵臓、肝臓、骨格筋をはじめとする22種類の臓器・器官の *in vitro* 分化誘導を実現してきた。この数は、脊椎動物幹細胞を用いた分化誘導系で最多である。しかも我々の方法は、機能的な構造を保持した3次元臓器構築を実現した極めて優れた分化制御系である。我々はツメガエルの既知遺伝子を網羅したマイクロアレイを世界に先駆けて独自に設計し、臓器形成過程で特異的に発現する遺伝子の大規模解析を行い、それらの遺伝子の機能解析を精力的に進めている。これまでの解析から心臓、膵臓、肝臓、腎臓をはじめとする主要臓器について、臓器特異的、かつ、発生段階特異的な遺伝子群を同定し、臓器形成の過程を機能的遺伝子リストで説明することのできる「臓器形成ロードマップ」というべき臓器別の設計図を構築しつつある。

## 2. 研究の目的

我々は、ツメガエル未分化細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系で得られた臓器形成制御因子群についての知見を、「臓器形成ロードマップ」という形でデータベース化してきた。本研究では、これらの知見を哺乳類幹細胞へと応用し、独自の臓器形成技術と新規な制御因子群を駆使した臓器形成・分化制御法を適用する。具体的には特に心臓、膵臓、肝臓に焦点を絞り、臓器形成ロードマップで得られた遺伝子を発現制御することにより、独自の革新的分化誘導技術の構築に挑戦する。それによって、これまでマウスやヒト幹細胞などの極めて限定的な実験系で限られた可能性しか検討してこなかった閉塞的状况を打ち破る、極めて独創的な器官形成の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、特に心臓と膵臓に焦点を絞り、マウス ES 細胞分化誘導系を基本モデル系にして、ツメガエル臓器形成ロードマップを応用したこれまでにない高効率哺乳類分化誘導技術を実現する。本研究は以下のストラテジーに従って進められた。

### (1) ツメガエル *in vitro* 臓器形成系を利用した詳細な臓器形成ロードマップの作製

ツメガエルの未分化細胞を用いた *in vitro* 誘導法は、詳細な肝臓・膵臓形成ロードマップを作製するための強力なツールとして極めて有用であり、多くの臓器特異的遺伝子が同定され始めている。 *in vitro* で誘導された肝臓・膵臓の様々な分化段階にある組織サンプルをさらに集め、それらから抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行うことにより、肝臓・膵臓形成ロードマップの構築をより一層加速させる。一方、心臓形成ロードマップに関しては、すでに幾つかの分化段階でマイクロアレイ解析を行っており、ロードマップの原型が出来上がってきているが、さらにサンプル数を増やして詳細な心臓形成ロードマップを構築する。

### (2) ツメガエル臓器形成ロードマップ遺伝子を活用したマウス ES 細胞分化誘導系の構築

#### ① 臓器形成ロードマップ遺伝子発現系ノックイン ES 細胞の樹立と分化促進効果の解析

ツメガエルの心臓、肝臓および膵臓の形成過程で特異的に発現する数十の遺伝子群のマウス版ホモログを成体及び胎

生期の各臓器 cDNA ライブラリーからクローニングして ES 細胞用発現ベクターに組み込み、我々がこれまで開発してきたマウス ES 細胞の心臓、肝臓、膵臓分化誘導系を用いて、期待される分化制御効果が得られるか検証する。発現系としては我々が独自に Gateway 化した Tet-Off 発現ベクターを活用し、機械的に数十個の上記遺伝子群のサブクローニングを極めて短期間で終了させる。各遺伝子を導入したマウス ES 細胞を樹立し、テトラサイクリンの有無によりこれら遺伝子の時期特異的な発現を制御することで、目的組織への分化に与える影響について各種分化マーカーを駆使して解析する。

② 臓器形成ロードマップ遺伝子ノックダウン ES 細胞の樹立と分化促進効果の解析

過剰発現により分化を促進するアクセル型の制御因子もあるが、一方で臓器形成時に特異的に分化を抑制し制御しているブレーキ型制御因子も存在する。これらについても分化誘導法に活用できるか、Tet-off 制御の miRNA 発現ベクターを利用し、臓器形成ロードマップ遺伝子をマウス ES 細胞で時期特異的にノックダウンするシステムを駆使したスクリーニングを行う。

(3) ツメガエル初期胚を用いた臓器形成制御因子の作用メカニズムの解析

マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導法で効果が見られた因子について、臓器形成過程に及ぼす影響を *in vivo* で容易に解析できるツメガエル初期胚を利用して、作用メカニズムを詳細に明らかにする。具体的には、候補因子の mRNA

を作製し、ツメガエル初期胚に異所的にマイクロインジェクションする過剰発現実験とアンチセンスモルフォリノオリゴ RNA を作製し、マイクロインジェクションする翻訳阻害実験を行う。

- (4) 分化促進因子カクテルによる完全分化誘導と 3 次元臓器・器官構築への応用  
複数遺伝子を導入可能なレトロウイルスベクター pMYs を Gateway 化し、これを利用して目的細胞への定量的分化誘導法を構築する。更に、分化誘導を生分解性 3D スキャフォールド上で行うことで、移植可能な 3 次元組織構築へさらに発展させる。

4. 研究成果

(1) ツメガエル臓器形成ロードマップの整備

ツメガエル未分化細胞から肝臓・膵臓組織を *in vitro* で誘導し、誘導開始後 18 時間で発現する遺伝子を、独自に設計したツメガエル 44K マイクロアレイを用いて網羅的にスクリーニングした。その結果、得られた新規遺伝子の発現部位を WISH 法で解析したところ、肝臓及び膵臓領域で発現する遺伝子が多数同定された。

一方、ツメガエル *in vitro* 心臓誘導系からは新規の心臓形成ロードマップ遺伝子候補である Claudin5a、Claudin5b を同定した。両遺伝子はツメガエル尾芽胚期から、心臓原基及び血管系で強く発現している。また、dominant negative 型の Claudin5 mRNA やアンチセンスモルフォリノオリゴを *in vitro* 心臓誘導系に導入したところ、心臓形成が阻害され

た。また、初期胚において同様の処理をしたところ、心臓の矮小化及びループ形成の阻害が観察された。以上から、Claudin5a、Claudin5b 遺伝子は、心臓形成過程において重要な役割を果たす「心臓形成ロードマップ遺伝子」であることが判明した。

また、ツメガエルの発生過程で血管特異的に発現するロードマップ遺伝子のひとつである XRASGRP2 について、その血管形成における役割を解析した。XRASGRP2 を過剰発現すると異所的な血管新生が確認され、一方、XRASGRP2 をノックダウンすると血管新生が遅延することが確認された。VEGF との関係についても検証した結果、XRASGRP2 はその上流因子である VEGF の血管内皮細胞の分化を仲介する必須因子であることが判明した。

その他、体節形成に関するロードマップ因子の解析も行った。脊髄神経、血管、筋肉などの組織は分節性をもって発生し、体節構造を生み出す過程の異常が脊椎骨の奇形や神経異常など多くの病気の原因となることが知られている。体節形成に重要な制御因子で、ツメガエルの体節形成時期で発現している bowline, Ledgerline, xRipply3 の3 遺伝子について発現部位や役割の解析を行った。その結果、これらの因子はそれぞれ特異的な発現を示すが、いずれもコリプレッサー Groucho-HDAC 複合体と結合し Tbx6 などの T-box タンパク質の抑制因子として機能することが示唆された。

## (2) ツメガエル 臓器形成ロードマップを応用した哺乳類臓器再生の試み

膵臓の発生過程で特に膵臓前駆細胞の分化に重要な役割を果たすロードマップ因子の一つである転写因子 Pdx1 をマウス脂肪組織由来幹細胞に遺伝子導入したところ、in vitro ではこの幹細胞はインスリン産生能を示さなかったが、ストレプトゾトシン (STZ) を投与した糖尿病モデルマウスに Pdx1 を発現させた脂肪組織由来幹細胞を血中投与したところ、膵臓へ生着し、インスリン分泌細胞へと分化することが示された。さらに、この糖尿病モデルマウスでは、コントロール群と比較して有意に血糖値が改善され、この状態が4ヶ月以上続くことが観察された。つまり、Pdx1 を脂肪組織由来幹細胞で発現させて血中投与するだけで、糖尿病モデルマウスにおいて長期的な治療効果が得られることが実証された。

## (3) 心臓形成ロードマップを用いた効果的心筋再生法の開発

心臓形成ロードマップを用いて効果的に心筋を再生させる方法を開発するため、筋形成転写因子 MEF2c について解析した。MEF2c は  $\delta \cdot \beta \cdot \gamma$  ドメインの有無により8種類のスプライシングバリエーションの存在が知られているにも関わらず、そのドメイン解析は行われていない。RT-PCRを用いたMEF2c各スプライシングバリエーションの判別法を構築し、Whole-mount in situ hybridization法と併用により、ツメガエルにおけるMEF2cスプライシングバリエーションの発現箇所を解析した。その結果、type II ( $\delta + / \beta - / \gamma +$ ) と type VI ( $\delta - / \beta - / \gamma +$ ) が心臓に発現していることを明らかにした。また、MEF2cを用いた心臓誘導系を、ツメガエル胚を用いて新たに構築した。そ

の系を用いて、スプライシングバリエーションごとの心臓誘導活性の差を解析したところ、γドメインが心臓形成に重要である事を明らかになった。今後は、心臓誘導活性の高いスプライシングバリエーションを用いた「効果的心筋再生法」を、哺乳類 ES/iPS 細胞・繊維芽細胞・間葉系幹細胞に適用し、心筋の再生研究を継続して行う。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 46 件)

- ① Yoshiyama-Yanagawa T, Enya S, Shimada-Niwa Y, Yaguchi S, Haramoto Y, Matsuya T, Shiomi K, Sasakura Y, Takahashi S, Asashima M, Kataoka H, Niwa R. The conserved Rieske oxygenase DAF-36/Neverland is a novel cholesterol-metabolizing enzyme. *J Biol Chem*. 査読有. 286. 2011. 25756-25762.
- ② Tateno H., Toyoda M., Saito S., Onuma Y., Ito Y., Hiemori K., Fukumura M., Nakasu A., Nakanishi M., Ohnuma K., Akutsu H., Umezawa A., Horimoto K., Hirabayashi J., Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. 査読有. *J. Biol. Chem*. 286. 2011. 20345-20353.
- ③ Kuwabara T., Kagalwala M.N., Onuma Y., Ito Y., Warashina M., Terashima K., Sanosaka T., Nakashima K., Gage F.H., Asashima, M. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. *EMBO Mol. Med*. 査読有. 3. 2011. 742-754.
- ④ Goto T, Fukui A, Shibuya H, Keller R, Asashima M. *Xenopus* furry contributes to release of microRNA gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有. 107. 2010. 19344-19349.
- ⑤ Seki Y, Kurisaki A, Watanabe-Susaki K, Nakajima Y, Nakanishi M, Arai Y, Shiota K, Sugino H, Asashima M. TIF1beta regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有. 107. 2010. 10926-10931.
- ⑥ Hayashi Y, Chan T-C, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Kusuda Furue M, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PlosOne*. 査読有. 5. 2010. e14099.
- ⑦ Asashima M, Ito Y, Chan T, Michiue T, Nakanishi M, Suzuki K, Hitachi K, Okabayashi K, Kondow A, Ariizumi T. In vitro organogenesis from undifferentiated cells in *Xenopus*. *Dev Dyn*. 査読有. 238. 2009. 1309-1320.
- ⑧ Nakanishi M, Kurisaki A, Hayashi Y, Warashina M, Ishiura S, Kusuda-Furue M, Asashima M. Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium. *FASEB J*. 査読有. 23. 2009. 114-122.

- ⑨ Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC, Moore L, Nakashima K, Asashima M, Gage FH. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*. 査読有. 12. 2009. 1097-1105.
- ⑩ Takada H, Kawana T, Ito Y, Kikuno RF, Mamada H, Araki T, Koga H, Asashima M, Taira M. The RNA-binding protein Mex3b has a fine-tuning system for mRNA regulation in early *Xenopus* development. *Development*. 査読有. 136. 2009. 2413-2422.

[学会発表] (計 40 件)

- ① 伊藤弓弦、幹細胞評価基盤技術開発に向けたアプローチ、第 11 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2012/1/31、つくば
- ② 有泉高史、セン徳川、高橋秀治、浅島 誠、ツメガエル胚のアニマルキャップから分化誘導した膵臓の血糖調節能、日本動物学会第 82 回大会、2011/9/21、旭川
- ③ Asashima, M. “Approaches to Single-Cell Analysis”. The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis. 2011/3/3. Tokyo.
- ④ Ito, Y. “Challenge the establishment of new fundamental technology in the regenerative medicine”. 2nd Symposium on Systems and Synthetic Biology (TriSys), 2010/10/4. Tokyo.
- ⑤ Asashima, M. Organogenesis and control of differentiation in vertebrate development. International Conference on Functional Genomics. 2010/10/2. India.

- ⑥ 浅島 誠、脊椎動物の未分化細胞からの中胚葉誘導と器官形成、日本動物学会第 81 回大会、2010/9/23、東京
- ⑦ 浅島 誠、脊椎動物の未分化細胞からの臓器形成と分化制御、第 99 回日本病理学会総会、2010/4/27、東京
- ⑧ Asashima, M. Organogenesis and control of differentiation in vertebrates. Japan-Israel Workshop on Stem Cells. 2010/2/25. Jerusalem.
- ⑨ Asasahima, M. Complex system and regulation in early animal development. International Symposium on Complex Systems Biology. 2009/10/1. Tokyo.
- ⑩ Asasahima, M. *In vitro* organogenesis in vertebrate development. 16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009. 2009/9/8. Edinburgh.

[図書] (計 4 件)

- ① Asashima M, Michiue T, Ohnuma K, Nakajima Y, Ito Y, Springer, Chapter 3 Mechanobiology During Vertebrate Organ Development, *Mechanosensing Biology*, pp39-49, 2010, 11
- ② 浅島 誠、東京化学同人、生物学辞典 (第 1 版)、2010、1634
- ③ 浅島 誠、道上達男、伊藤弓弦、化学同人、研究をささえるモデル生物 カエルがわかる、2009、11
- ④ 岡林浩嗣、大沼清、浅島 誠、メディカルレビュー社、再生医療、2009、6

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅島 誠 (ASASHIMA MAKOTO)  
 東京大学・大学院総合文化研究科・名誉教授  
 研究者番号：00090564

### (2) 研究分担者

伊藤 弓弦 (ITO YUZURU)  
 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長  
 研究者番号：30500079

有泉 高史 (ARIIZUMI TAKASHI)  
 玉川大学・農学部・教授  
 研究者番号：30286166