

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06201

研究課題名（和文）発生現象を模倣し四肢復元再生技術の基盤を構築する

研究課題名（英文）Establishment for the foundation of limb regeneration technique by mimicking limb developmental processes

研究代表者

熱田 勇士（Atsuta, Yuji）

九州大学・理学研究院・講師

研究者番号：80874685

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）：PZL（Prdm16, Zbtb16, Lin28a）あるいはPZLL（PZL + Lin41）の強制発現で、マウス線維芽細胞が四肢前駆細胞様細胞へと転換されることが分かったため、研究成果を取りまとめ公表した（Atsuta et al., Dev Cell, 2024）。また、同じリプログラミング因子群を用いてヒト線維芽細胞のリプログラミングを試みたところ、四肢前駆細胞の代表的なマーカー遺伝子であるSALL4、NMYC、LHX2、MEIS1の発現上昇が認められた。さらに、AER細胞培養条件の最適化やレポーターニワトク系統作出を行い、報告書にて述べるように、それぞれ一定の成功を収めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

四肢に由来しない細胞に四肢前駆細胞の性質を与え得るリプログラミング因子の同定は、四肢発生研究分野のブレークスルーである。これらの因子群（PZLL）は本来の四肢発生においても、それを開始する能力を持つと考えられるが、これまで四肢形成に関わることが知られていなかったため新たな発見となった。また、大量培養が可能な線維芽細胞を、手足の元となる四肢前駆細胞のような細胞へと転換することが可能となったため、そのリプログラム細胞を利用した四肢再生医療技術の開発も進めることができるかも知れない。これらのことから本研究を通して、四肢発生の理解の深化や再生技術開発の発展にわずかながら貢献できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：The forced expression of PZL (Prdm16, Zbtb16, Lin28a) or PZLL (PZL + Lin41) has been found to convert mouse fibroblasts into limb progenitor-like cells, and the research results have been compiled and published (Atsuta et al., Dev Cell, 2024). Furthermore, when the same reprogramming factors were used to reprogram human fibroblasts, an increase in the expression of SALL4, NMYC, LHX2, and MEIS1, which are representative marker genes of limb progenitor cells, was observed. Additionally, we attempted to optimize AER (Apical Ectodermal Ridge) cell culture conditions and to generate a transgenic limb bud reporter chicken line. As described in the report, we achieved certain successes in each study.

研究分野：発生生物学

キーワード：四肢発生 四肢前駆細胞 リプログラミング 3次元培養 AER トランスジェニックニワトリ

1. 研究開始当初の背景

ヒトの切断四肢再生技術確立に向けこれまで、四肢再生可能動物の再生原理を明らかとし、ヒトに対してその原理の適用を試みるという方策が主に講じられてきた。しかしながら、遺伝的あるいはエピジェネティックなプログラムによって再性能を失った生物に、新たに再性能を付与するための技術的ハードルは極めて高く、その適用の実現は見通せない状況にある。そこで最近では四肢復元の達成に向け、再生原理よりむしろ発生原理を応用する試みが注目を集めている。より具体的には、胚芽内の四肢前駆細胞 (**Limb Progenitor**, 以下「**LP細胞**」) を採取し切断肢へ移植後、さらに四肢発生関連シグナルを付加することで四肢形成を模倣させる、という手立てである。事実、この手段はカエルやマウス切断肢の再生を促進することが証明され、将来性の高いアプローチであることが示唆された。しかし依然として、この方策実現の前には **LP細胞の量的・質的問題** が立ちはだかっている。すなわち、微小な胚から LP細胞を成体四肢再生に十分な量を採取するのは不可能であり(量的問題)、またモルフォジェンをどのように作用させれば、LP細胞を正確にパターン化した四肢構造へと導けるかについて未だ不明な点が多い(質的問題)。

2. 研究の目的

本研究では、上述の両問題を一挙に解決する糸口を掴むことを目指した。まず、内在性の LP細胞に比べ大量に採取可能な線維芽細胞に **ダイレクトリプログラミング** を施し **四肢前駆細胞様細胞 (reprogrammed LP Cells**, 以下「**rLPC**」) を産み出す手法の開発と、rLPCの長期培養系の確立により量的問題を克服する。質的問題については、(1) **マイクロ流路系** を使ってモルフォジェンを様々な濃度・タイミングで加えることで、rLPCスフェロイドをあたかも実際の肢芽のようにパターン化させる最適条件を探る、(2) 四肢パターンニングを制御する **AER (Apical Ectodermal Ridge)** 細胞もリプログラミングによって産み出し (**reprogrammed AER**, 以下「**rAER**」)、それを rLPC と組み合わせることにより rLPC を肢芽様構造へと変貌させる、という 2通りのアプローチで解決を図ることを考案した。

3. 研究の方法

(1) マウス rLPC リプログラミング法の確立と、それを応用したヒト rLPC 作製の試み

採択者らは先行研究にて、マウス線維芽細胞を rLPC へとリプログラムする方法論の確立を試みてきた。再生医療への展開を目指した場合、ヒト細胞での実験が必須となるが、それに先立ち、まずはマウス rLPC リプログラミング法確立の完遂を目指した。具体的には、rLPCの生体内における多分化能検証実験をこれまで十分に実施できていなかったため、マウス rLPC をニワトリ胚肢芽へと移植し数日間孵卵した後、再度単離して単一細胞(sc)RNA-Seq解析により rLPC が然るべき細胞種へと分化したか調べた (図 1)。マウス rLPC の多分化能を証明できれば引き続き、マウスで確立した手法を用いてヒト rLPC の作製、そして、作製した rLPC スフェロイドのパターン化を流路デバイスにより行う。

(2) AER 細胞培養条件の最適化

事前に行ったマウス肢芽表皮の scRNA-Seq データから、*Dlx2/5* や *Trp63*、*Zim1* などの転写因子が AER 特異的に発現することがわかったため、これらの因子を中心に用いてダイレクトリプログラミングを行う予定であった。しかしながら、リプログラミング実験において因子群のスクリーニングよりも肝要とも言われる、**長期安定培養系が AER 細胞に関しては皆無であったため、本研究では培養条件の最適化を試みた**。これまでの四肢発生の研究から、*Fgf10* が AER 細胞維持に必要だと考えられていたため *Fgf10* 添加培地を基礎として、他の上皮細胞系オルガノイド培養の知見を参考にしながら様々な化合物をテストした (図 2; 4. 研究成果にてさらに述べる)。

(3) ニワトリ rLPC と rAER 作製に向けたレポーターニワトリ系統の作出

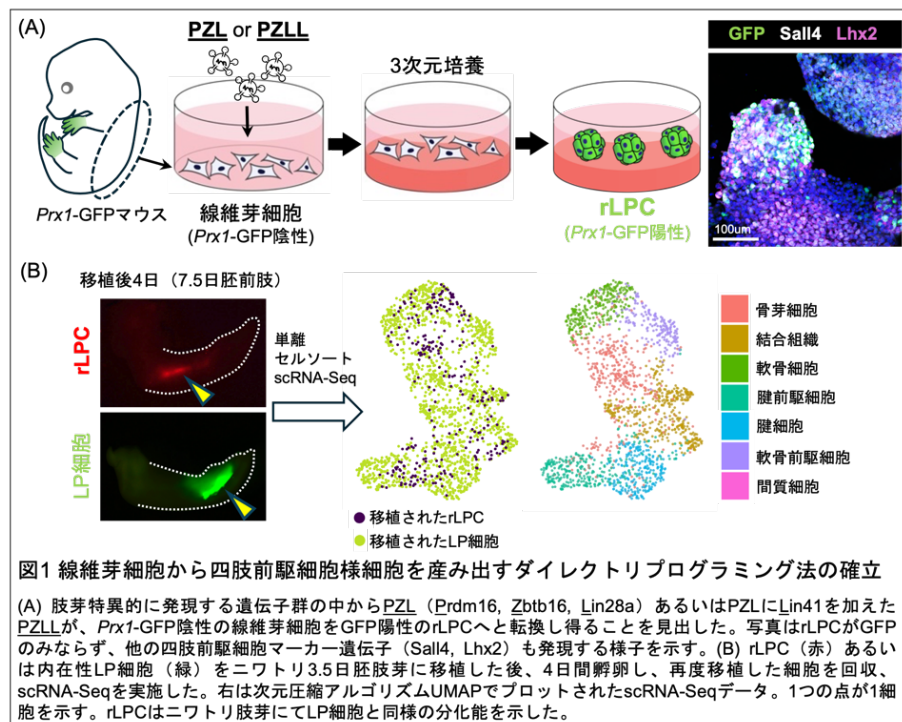
ニワトリ胚では移植操作が他の四足動物モデルと比して極めて容易であり、rLPC と rAER を組み合わせて作製する移植片が適切な分化能・パターン形成能を示すかについて胚内で検証できる唯一のモデルである。しかし、その移植片を作製する際にはリプログラムされた細胞のみを分取する必要があるため、rLPC、rAER をそれぞれ標識する蛍光生体マーカーが必要となるが、トランスジェニック (TG) レポーターニワトリ系統のラインナップは充実しておらず、LP 細胞や AER 細胞で特異的に蛍光を発するような系統は存在しない。そこで本研究ではニワトリ始原生殖細胞を活用し、LP と AER 細胞でそれぞれ緑色、赤色蛍光タンパクを発現する TG 系統の樹立に取り組んだ (図 3A)。これまでの研究にて、ニワトリ LP 細胞と AER 細胞で特異的に活性化するプロモーター (それぞれ *Prx1* と *Msx2* プロモーター) を同定していたため、これらのプロモーターを利用してレポータートランスジーン (*Prx1*-ZsGreen と *Msx2*-DsRed) を作成し、ニワトリ始原生殖細胞へと導入した。引き続き、その始原生殖細胞をニワトリ胚に移植し成鳥まで育て、生殖細胞のジェノタイプングによりトランスジーンを持つ個体を選別した (F0 個体)。F0 個体同士をさらに掛け合わせ、F1 個体を得たのち、F2 胚を産卵させシグナルの有無を検証した。

4. 研究成果

(1) マウス rLPC リプログラミング法の確立と、それを応用したヒト rLPC 作製の試み

すでに同定した因子群 (図 1A 参照; この実験では PZLL を使用) を用いてリプログラミングした rLPC をニワトリ胚へと移植した。その後、移植された rLPC をニワトリ胚前肢より単離し、セルソーターで分取した後、scRNA-Seq を行った (図 1B)。ポジティブコントロールとして未培養の内在性のマウス LP 細胞を用いた。移植されたマウス細胞は異種間移植でありながらホストのトリ胚前肢に取り込まれており、scRNA-Seq の結果、rLPC は、本来

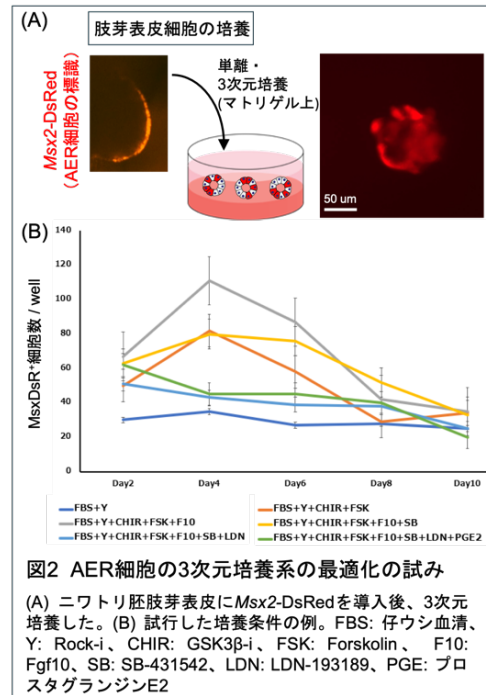
LP 細胞に由来する軟骨、腱、骨芽細胞などの細胞タイプへと分化することが示された (図 1B)。これは作製された rLPC が内在性の LP 細胞に似通った細胞であることを強く示唆することから、これらの成果を取りまとめ論文を作成し、公表した (Atsuta et al., *Dev Cell*, 2024)。



引き続き同じ条件で、ヒト線維芽細胞のリプログラミングを試みた。免疫染色による検証の結果、LP細胞の代表的なマーカー遺伝子である *SALL4*、*NMYC*、*LHX2*、*MEIS1* の発現が認められた。しかしながら、これら細胞を生かしたまま分取でき得るレポーター細胞株の作製が完了していないため、マーカー遺伝子陽性細胞のみを利用した、さらに詳細な解析の進行は滞っている。また、マイクロ流路系の開発については、未だ準備段階であるが、山西陽子博士、和田健一博士ら (共に九州大学) とデバイスのデザイン・成型を進行中である。

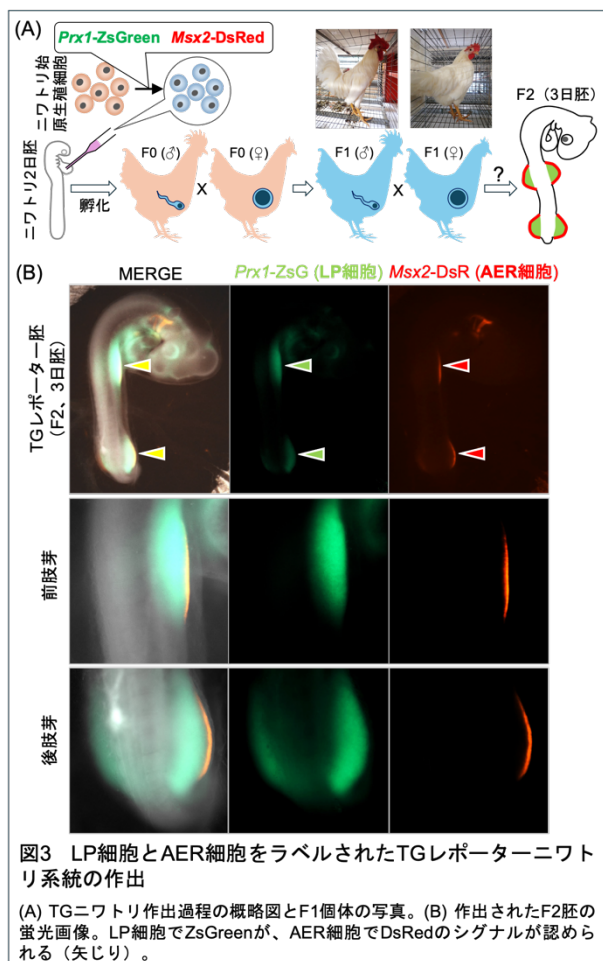
(2) AER 細胞培養条件の最適化

rAER リプログラミング法の礎となる、AER 細胞の長期維持系の確立に向け培養条件の検討を行った。次項で述べるように AER レポーター系統の作出には最終的に成功したものの、条件検討開始時点ではレポーター系統を保持していなかったため、煩雑ではあるが野生型トリ胚の肢芽表皮に *Msx2-DsRed* をエレクトロポレーション法によって予め導入することで AER 細胞をラベルし、その AER を含む肢芽表皮を剥離して培養に用いた (図 2A)。培地成分の調整に関しては、以下の知見などを参考にした。1) Wnt の活性化が AER の成熟に必要である (Kengaku et al., *Science*, 1998)、2) Forskolin は上皮系オルガノイドを肥大化する (Mulwijk et al., *Eur. Respira. J.*, 2022)、3) バルプロ酸はニワトリ腸上皮オルガノイドの成長を促す (Zhao et al., *Poult. Sci.*, 2022)、4) プロスタグランジン E2 がニワトリ腸上皮オルガノイドの生存を延長させる (Pierzchalska et al., *Methods Mol. Biol.*, 2019)。その他の化合物、タンパク質、計 9 種類を単独あるいはコンボで試用したところ、**Fgf10**、**Wnt** シグナル活性化剤 **CHIR99021**、**Forskolin**、**バルプロ酸** の添加が、一過的ではあるものの AER 細胞の増殖にポジティブな影響を与えることがわかった (図 2B 参照)。今後はさらにこれらの使用濃度、タイミングなどを変化させ、培地条件を最適化し、rAER リプログラミング研究に取り掛かりたい。



(3) ニワトリ rLPC と rAER 作製に向けたレポーターニワトリ系統の作出

ニワトリは性成熟に 8 ヶ月程度を要するため、F0 から 2 世代後の F2 胚を入手できたのは最終年度終盤となってしまい、ニワトリ細胞を用いたリプログラミング実験を行うには至らなかった。それでも、F2 胚では *Prx1-ZsGreen* のシグナルが LP 細胞で、*Msx2-DsRed* が AER で認められたことから、期待通り、**TG レポーター系統樹立に成功したことがわかった** (図 3B)。両細胞種を二重で標識する TG ニワトリはおろか、LP、AER 細胞それぞれのレポーター系統すら、これまで作出された報告は無く、**世界初の肢芽組織レポーターニワトリの誕生**である。現在、当該系統について論文を執筆中であり (Atsuta et al., *in prep*)、近日中に公表したい。今後、レポーターニワトリ胚から線維芽細胞を採取し、ニワトリ rLPC および rAER リプログラミング法の開発に活用していく。



研究期間中の主な業績：主要原著論文 3 報、学会発表 3 件

・原著論文

[1] Direct reprogramming of non-limb fibroblasts to cells with properties of limb progenitors

Yuji Atsuta^{*}, ChangHee Lee^{*,#}, Alan R. Rodrigues^{*}, Charlotte Colle, Reiko R. Tomizawa, Ernesto G. Lujan, Patrick Tschopp, Laura Galan, Meng Zhu, Joshua M. Gorham, Jean-Pierre Vannier, Christine E. Seidman, Jonathan G. Seidman, Marian A. Ros, Olivier Pourquié[#], Clifford J. Tabin[#]
Developmental Cell, Vol. 59, p. 415-430, 2024 doi: 10.1016/j.devcel.2023.12.010

[2] LIN28 is essential for the maintenance of chicken primordial germ cells

Katsuya Suzuki^{*}, Seung June Kwon^{*}, Daisuke Saito, Yuji Atsuta[#]
Cells & Development, Vol. 176, p. 203874, 2023 (**Cover article**) doi: 10.1016/j.cdev.2023.203874

[3] Prime editing in chicken fibroblasts and primordial germ cells

Yuji Atsuta[#], Katsuya Suzuki, Hiroko Iikawa, Haruna Yaguchi, Daisuke Saito
Development, Growth & Differentiation, Vol. 64, p. 548-557, 2022 (**DGD Top Downloaded Article in 2022-2023**) doi: 10.1111/dgd.12823

・学会発表

[1] Direct reprogramming of non-limb fibroblasts to cells with properties of limb progenitors

熱田勇士 Invited talk, 第 46 回日本分子生物学会年会、神戸 (2023 年 12 月)

[2] 再現しようとする試みから四肢発生を理解する

熱田勇士 招待講演、2022 年度動物・植物・生態学会三学会合同福岡例会、福岡 (2022 年 12 月)

[3] Direct reprogramming of non-limb fibroblasts to cells with properties of limb progenitors

Yuji Atsuta, ChangHee Lee, Clifford J. Tabin Selected talk, 第 55 回日本発生生物学会、金沢 (2022 年 7 月)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsuta Yuji, Lee ChangHee, Rodrigues Alan R., Colle Charlotte, Tomizawa Reiko R., Lujan Ernesto G., Tschopp Patrick, Galan Laura, Zhu Meng, Gorham Joshua M., Vannier Jean-Pierre, Seidman Christine E., Seidman Jonathan G., Ros Marian A., Pourqui? Olivier, Tabin Clifford J.	4. 巻 59
2. 論文標題 Direct reprogramming of non-limb fibroblasts to cells with properties of limb progenitors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 415 ~ 430.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2023.12.010	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 Suzuki Katsuya, Kwon Seung June, Saito Daisuke, Atsuta Yuji	4. 巻 176
2. 論文標題 LIN28 is essential for the maintenance of chicken primordial germ cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells & Development	6. 最初と最後の頁 203874 ~ 203874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cdev.2023.203874	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 Aldea Daniel, Kokalari Blerina, Atsuta Yuji, Dingwall Heather L., Zheng Ying, Nace Arben, Cotsarelis George, Kamberov Yana G.	4. 巻 19
2. 論文標題 Differential modularity of the mammalian Engrailed 1 enhancer network directs sweat gland development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010614	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 該当する
1. 著者名 Atsuta Yuji, Suzuki Katsuya, Iikawa Hiroko, Yaguchi Haruna, Saito Daisuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Prime editing in chicken fibroblasts and primordial germ cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 548 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12823	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 Tonizawa Reiko Rachel, Tabin Clifford James, Atsuta Yuji	4. 巻 251
2. 論文標題 In ovo electroporation of chicken limb bud ectoderm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1628 ~ 1638
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 Daniel, Atsuta Yuji, Kokalari Blerina, Schaffner Stephen F., Prasasya Rexxi D., Aharoni Adam, Dingwall Heather L., Warder Bailey, Kamberov Yana G.	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 Proceedings of the National Academy of Sciences	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 熱田勇士
2. 発表標題 Direct reprogramming of non-limb fibroblasts to cells with properties of limb progenitors
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熱田勇士
2. 発表標題 再現しようとする試みから四肢発生を理解する
3. 学会等名 2022年度動物・植物・生態学会三学会合同福岡例会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuji Atsuta
2. 発表標題 Direct reprogramming of non-limb fibroblasts to cells with properties of limb progenitors
3. 学会等名 第55回日本発生生物学会（国際学会）
4. 発表年 2022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