

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09313

研究課題名(和文) ヒトGastruloid(人工擬似胚)を用いたMSCの発生機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Developmental Mechanism of MSCs Using Human Gastruloids

研究代表者

竹原 俊幸 (Takehara, Toshiyuki)

近畿大学・大学病院・助教

研究者番号：60580561

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)：間葉系幹細胞(MSC)は、その高い汎用性から再生医療で期待されているが、供給源のドナーに依存し、品質が不安定である問題を抱えている。多能性幹細胞からMSCを誘導する技術が模索されているが、確立には至っていない。本研究は、多能性幹細胞と初期胚発生を模倣するGastruloidを構築し、MSCの獲得と発生機序の解明を試みた。本研究では、マウスおよびヒト多能性幹細胞を用いてGastruloidの大量誘導法を確立し、幼若なMSCの出現を捉えた。それらは、LRRC15を発現する高品質なMSCであることが示された。この成果は、ヒトMSCの供給に関する問題を解決し、再生医療の発展に寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMSCの発生過程はブラックボックスとして覆われていた。本研究結果は、ヒト胚モデルを用いることでMSCの詳細な発生過程を知ることが可能となる。また、ヒトMSCの供給に関する根本的な問題を解決し、再生医療のさらなる発展に貢献する。また、本技術で用いられたヒト多能性幹細胞によるGastruloidの構築は、生命現象の理解を深めるための重要な知見を提供し、ヒト多能性幹細胞の多分化能の証明にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have shown promise in regenerative medicine due to their high versatility, but they are dependent on donor sources and have the problem of unstable quality. Techniques to induce MSCs from human pluripotent stem cells have been explored, but have yet to be established. In this study, we constructed a Gastruloid that mimics early embryogenesis, and attempted to elucidate the mechanisms of MSC acquisition and development. In this study, we established a method for mass induction of Gastruloid using mouse and human pluripotent stem cells and captured the emergence of juvenile MSCs. They were shown to be high-quality MSCs expressing LRRC15. This achievement is expected to solve problems related to the supply of human MSCs and contribute to the development of regenerative medicine.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 多能性幹細胞 Gastruloid 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療における間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) は、運動器再生や抗炎症治療、臓器・組織再生など幅広い分野で期待されている。本邦では、ドナー細胞として患者本人が主に選ばれるため、患者自身の年齢や疾患に依存して、MSC の品質が不安定であることが知られている。特に整形外科領域では、対象とする疾患も多く、高品質な MSC を安定供給する技術開発が急務である。患者組織から採取する方法以外に、多能性幹細胞 (iPS や ES 細胞) から MSC を誘導する技術開発が進められているが、未だに確立されたとは言えず、普及には至っていない。

新たなアプローチとして、2つの新技術: ヒト Naïve 型多能性幹細胞 と Gastruloid 技術 が注目されています。Gastruloid は初期胚発生を模倣し、極性と多層構造を持ち、複雑な細胞集団へと分化することが可能なオルガノイドである。また、初期胚と似た分化を示すことから、より幼弱な MSC を得ることができると期待できる。これまでの研究では、既存の ES/iPS 細胞を用いたため成功率が低く、不安定であったが、新型ヒト Naïve 型多能性幹細胞を用いることで、よりヒト発生を模した Gastruloid の作製が可能となり、安定した MSC の生産の可能性が示唆される。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) を用いた再生医療は急速に進展しているが、MSC の供給には根本的な課題が存在する。新たな MSC 供給源としてヒト多能性幹細胞からの分化誘導が試みられているが、その普及には至っていない。主な理由として、ヒト MSC の発生機序、詳細な性質と正確な分類、由来組織や培養方法による性質の変化など、基本的理解が未だ不十分である点が挙げられる。また、ヒトの発生解析は倫理のおよび技術的な制約により困難を伴う。

本研究では、我々が独自に開発したヒト Naïve 型多能性幹細胞を用いて、試験管内での初期胚発生モデルである Gastruloid を構築し、これを用いて MSC の発生機序を解明することを目的とする。Gastruloid は三次元的にヒト初期胚発生を模倣する培養技術であり、現存する発生モデルとして最も *in vivo* に近い特徴を有する。本研究では、ヒト Naïve 型多能性幹細胞から誘導された Gastruloid を活用し、発生初期におけるヒト間葉系原基の発生機序を明らかにし、新たな分化誘導法の確立を試みる。この研究により、MSC 供給の根本的な問題を解決し、再生医療のさらなる発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、マウス多能性幹細胞を材料とし、簡便かつ大量に Gastruloid を誘導する方法を確立、誘導された Gastruloid 中に幼弱な MSC の出現を捉える、および得られた結果を踏まえてヒト多能性幹細胞へ応用を実施した。

従来 Gastruloid は発生モデルとして利用されており、小規模でしか誘導システムは存在していなかった。しかしながら、分化誘導で用いるためには、大量に均一な Gastruloid を準備する必要がある。また、実際の再生医療への応用を見据えて、なるべく簡便な方法を開発する必要がある。そこで、高分子ポリマーと回転台を用いた新規誘導法の検討を行った。

実験では、新規に得られた Gastruloid 中に MSC が出現するか検討した。特に、Gastruloid は初期胚発生を模した分化を示すことから、出現してくる MSC は幼弱な MSC であると想定した。そこで、MSC の高品質性を示す LRRC15 を標的とし、LRRC15 陽性細胞が出現してくるか検証した。実験では、上記研究を踏まえて、ヒト多能性幹細胞を用いて Gastruloid 誘導および LRRC15 を標的とした MSC の新規誘導法の確立を検討した。

4. 研究成果

本研究では主に3つの実験を実施した。

実験では、Gastruloid の大量誘導・培養技術の開発を実施した。マウス多能性幹細胞を用いて、最適な細胞数を検証したところ、 1.0×10^5 cells/ml よりも少ない細胞数では、得られる細胞塊が大きく、得られる Gastruloid の数が少なかった。一方で 8×10^5 cells/ml 以上では、得られる細胞塊は多いが、大きさが小さくなり十分に育つのが困難であった。また、Gastruloid は立体構造を維持した状態で培養する必要があるが、通常の培養皿では、細胞が接着してしまい、立体構造が崩れることが見られた。さらに、複数の細胞塊を1つの培養皿で培養することで細胞塊同士が再凝集することで、歪な形態となることを示した。そこで、これらの問題を解決することを目的に、培養装置及び、培養液を検討した。従来より胚の様な立体的な構造を持つ細胞塊胚

の体外培養において、酸素交換と立体構造の維持のため、チューブ及び回転台を用いた培養システムが使用されており、これらのシステムを用いた。また、再凝集を防ぐために高分子ポリマー

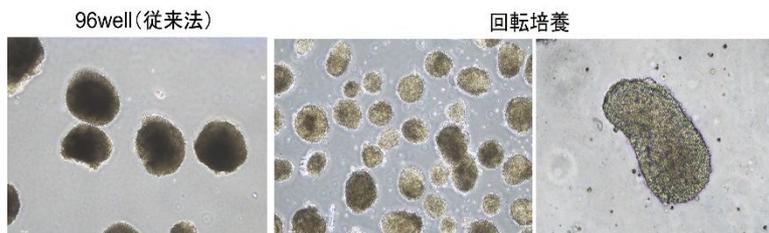


図 1: 均一で効率的な Gastruloid 誘導法の確立

を添加した培養液を検討した。その結果、長期間培養を継続しても立体構造を維持しつつ、また隣接しあう細胞同士の凝集を防ぐことができた。以上の結果から、簡便に均一で大量の Gastruloid の誘導が可能となった。(図 1)

実験 1 では、実験 2 で得られた Gastruloid の詳細な検証を実施した。誘導された Gastruloid の遺伝子発現解析を行ったところ、FOXA2 をはじめとした初期胚のマーカーの発現が認められた。さらに、中胚葉の発生に重要な Tbx6, Mesp1, Mixl1 の発現が有意に上昇した。これらのことから、正常に分化が行われていると考えた(図 2)。誘導された MSC を特定するためには、高品質な MSC であることを示す良質なマーカーが必要である。これまでの我々の研究より、LRRC15+となる未分化な MSC は生体組織中には少なく(ヒト初代培養 1.1%、成体マウス初代培養 1.5%) 今後の培養で増殖させることも困難であることがわかっている。一方、13.5 日齢胎児マウス肢の初代培養では 17.1%が LRRC15+となり、胎児期に増加することから幼若な MSC のマーカーとして使用した。FCM 解析を実施したところ、誘導された Gastruloid 中に LRRC15 陽性 MSC 分画は約 0.1%存在した。また、LRRC15 陽性細胞集団は CD106/CXCR4 の発現がモザイクであり、MSC を含むうるヘテロな集団であることが明らかになった。次に遺伝子発現解析の結果、LRRC15+分画は TWIST1, Bmi1 をはじめとする MSC の未分化性に関するマーカーを発現していた。更に CFU-f Assay を行ったところ、LRRC15+の分画のみから MSC の初代コロニーが得られた。以上のことから、Gastruloid から幼弱な MSC を得ることができた(図 3)。

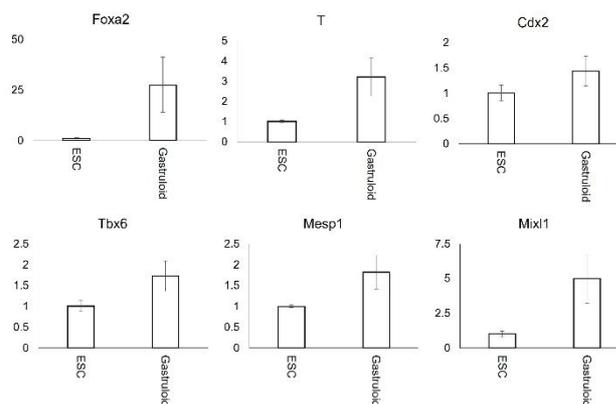


図 2: Gastruloid における初期中胚葉分化に関わる遺伝子発現解析

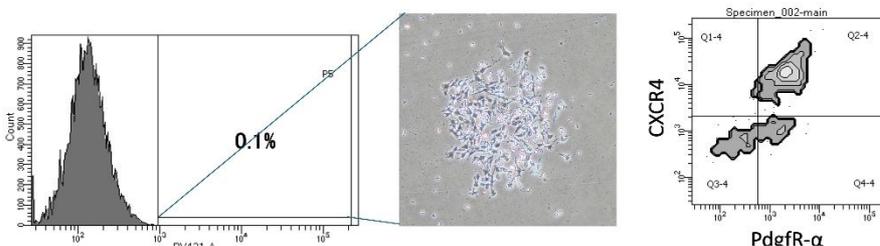


図 3: マウス Gastruloid 内に生じた MSC(LRRC15 陽性細胞)

実験 2 では、マウスと同様に、ヒト多能性幹細胞から Gastruloid および幼弱な MSC を誘導できるか検証した。その結果、ヒト iPS 細胞からも Gastruloid は容易に誘導することが可能であった。さらに、得られた Gastruloid 中には LRRC15 陽性細胞が存在しており、幼弱な MSC の獲得が可能であった(図 4)。

間葉系幹細胞(MSC)はその高い汎用性から再生医療での臨床応用が進展しているが、ドナー依存による性能制限のため、安定供給システムの確立が求められている。近年、ヒト多能性幹細胞(PSC)から MSC を誘導する方法が模索されているが、ヒト MSC の発生機序に関する理解不足が原因で確立には至っていない。既存の研究では、マウス初期胚を用いて MSC の発生機序が示されているが(Takashima Y et al., Cell. 2007)、ヒトにおける研究は倫理的・技術的制約が多い。最近の PSC 技術の進展により、Gastruloid と呼ばれる三次元構造体モデルが開発され、ヒ

ト初期胚発生の解析が可能となっている (Beccari L et al., Nature. 2018; van den Brink SC et al., Nature. 2020)。本研究の成果は、マウスおよびヒト多能性幹細胞を用いて簡便で均一で効率的なGastruloid誘導方法の確立を示し、これを利用し幼弱なMSCの獲得が可能であった。このアプローチは、ヒトMSCを獲得するのみならず、MSCの初期発生に関する新たな知見を得るとともに、ヒト多能性幹細胞の多分化能の証明にも寄与することが期待される。以上より、本方法は安定的に高品質なMSCを供給できる新たな培養方法として有望であると考えられる。

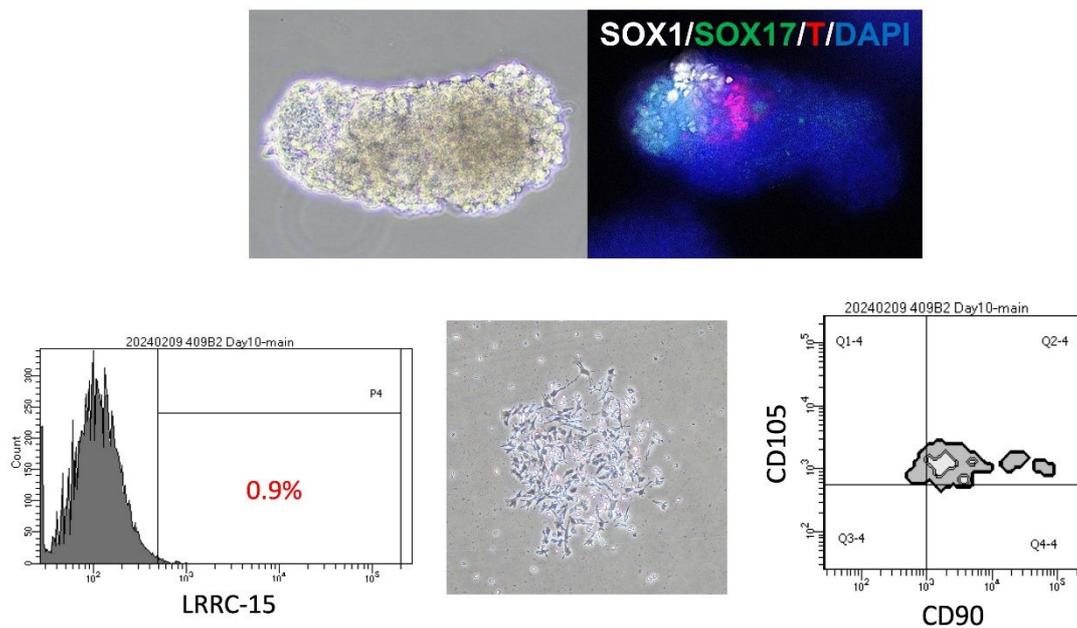


図4: ヒト多能性幹細胞由来ガストロイド中に含まれるMSC(LRRC15陽性細胞)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 竹原俊幸 |
| 2. 発表標題 副甲状腺組織再生を目指した多能性幹細胞由来副甲状腺細胞の誘導の試み |
| 3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 樹史 |
| 2. 発表標題 オルガノイド技術を用いたマウスES細胞由来の間葉系幹細胞の誘導について |
| 3. 学会等名 第36回 日本軟骨代謝学会 |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 近畿大学病院高度先端総合医療センター再生医療部 https://www.med.kindai.ac.jp/stemcell/index.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 |
|-------|--|---------------------------------|----|
| 研究分担者 | 小野寺 勇太 (Onodera Yuta) (30510911) | 近畿大学・大学病院・助教 (34419) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 分 担 者 | 寺村 岳士 (Teramura Takeshi) (40460901) | 近畿大学・大学病院・准教授 (34419) | |

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 |
|---------|---------|
| | |