

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) In vitro における 3 次元ヒト胚体軸形成モデルの確立
(英語) 3D Human Axial Development In Vitro: using novel human in vitro somitogenesis models to study birth defects with patient-relevant iPS cell lines

研究開発実施期間: 令和 2 年 9 月 16 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) アレヴ ジャンタシュ
(英語) ALEV Cantas

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学 高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi) 特定拠点准教授
(英語) Kyoto University, KUIAS ASHBi Program Specific Associate Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

(Japanese)

先天性側弯症 (congenital scoliosis: 以下 CS) や脊椎肋骨異形成症 (spondylo costal dysostosis: 以下 SCD) とは脊椎の奇形や肋骨の融合などの骨形成障害が生じる先天性疾患である。この疾患は初期発生における体節形成が阻害されることで生じることが知られている。CS/SCD の生じる原因として、Notch signaling 遺伝子の LFNG、HES7、DLL3、MESP2 における変異が報告されている (Sparrow et al. 2006, 2008, 2010, Whittock et al. 2004, Turnpenny et al., 2007)。しかしながら、その正確な発症メカニズムは未だ解明されていない。また、これらの疾患を研究する適切なモデルも未だ存在しない。本研究では脊椎に生じる先天性疾患のメカニズムを解明するため、さらに薬物スクリーニングなどの治療戦略へとつなげるため、新規のモデルシステムの確立を目的とした。

本プロジェクトはイギリス、Cambridge University の Alfonso Martinez Arias (現: Universitat Pompeu Fabra) と Naomi Moris (現: Francis Crick Institute) との共同研究から始まり、達成された。

胚発生は、内外様々なシグナル因子の作用を受けながら、多数の細胞同士が三次元的に複雑に相互作用して進展する。その主要なプロセスの1つは体節形成であり、対になっている構造体である体節が、未分節中胚葉から形成される。体節は後に椎骨、肋骨、骨格筋や真皮に分化する。体節形成は、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどのモデル生物を用いてこれまで研究されてきたが、ヒトではまだよく分かっていなかった。ヒトをはじめとした脊椎動物において、初期胚の一部である中胚葉から、骨格や筋肉などへとつながる体節を形成する過程は、初期発生における重要な現象である。当然ながら、ヒトの初期発生に生じる疾患のメカニズムを正しく理解するためには、まずヒトの正常な初期発生の理解が不可欠である。しかし、体節形成メカニズムをはじめとしたヒト初期発生の研究を生体内で行うことは、技術的、倫理的な制約などから極めて困難であり、初期発生の理解につながる試験管内モデルの確立に向けた研究が世界的なトレンドとなっている。倫理的問題の1つの解決策として、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などを用いて、試験管内 (in vitro) で器官形成や胚発生が研究されてきた。しかしながら体節形成の主要な特徴を確実に再現できるモデルは十分には確立されていなかった。本研究では CS/SCD を研究するため、ヒトの体節形成に焦点を当て、はじめにヒトの体節形成モデルの確立を目指した。

過去に我々のグループは、iPS 細胞由来の未分節中胚葉を用いて、体節形成で重要な現象である分節時計の振動活性を再構成し、定量化することに成功していた (Matsuda, Yamanaka, et al., Nature (2020))。しかし、この当初のモデルでは *HES7* などの時計遺伝子の振動活性は再現できても、分節化や上皮化された体節の形成を再現するまでには至っていなかった。本研究では以前の発見を拡張して、分節時計の再現だけでなく、体節形成の実際のプロセスを in vitro で3次元的に再現することを試みた。

本研究では、3次元培養技術を用いて、ヒト iPS 細胞から、上皮化されて極性を備えた体節様の構造物を誘導することに成功し、この in vitro 体節形成モデルをアクシオロイドと命名した。アクシオロイドは体軸伸長や分節化など、ヒトの初期胚の形態的特徴を備えていた。またアクシオロイドは、SOX2+/T+の尾芽、TBX6+/MSGN1+の未分節中胚葉 (沿軸中胚葉)、RIPPLY2+/MESP2+ 前方未分節中胚葉、MEOX1+/TCF15+の体節、体節由来の細胞など、ヒトの初期胚の体軸や尾に存在する細胞集団を含んでいることが明らかとなった。さらに、アクシオロイドは体節形成メカニズムの特徴である、分節時計関連遺伝子 *HES7* の周期的な発現や進行波状の発現などを示した。その周期性はヒト胚の解剖学知見やその他の in vitro モデル ((Matsuda, Yamanaka, et al., Nature (2020), Chu et al., Cell Reports (2019), Diaz-Cuadros et al., Nature (2020)) より示唆されている時間 (4-5 時間) と一致した。

モデル生物での知見から、体節形成には FGF、WNT やレチノイン酸 (RA) など様々なシグナル伝達物質の前後軸に沿った濃度勾配の形成が重要であることが知られていた。我々は、このような濃度勾配がアクシオロイドで

自律的に形成されることを示した。そして、RA と細胞外マトリックス (ECM) 分子との相乗作用が、適切な分節化と、上皮化された体節の安定的形成に不可欠である事を示した。アクシオロイドでは、遺伝子発現のパターンや、TBX18 や UNCX の発現により特徴づけられる頭尾軸極性、F-actin、N-cadherin、Fibronectin や Laminin の発現により特徴づけられる頂底軸極性などについて、モデル生物の研究により明らかとなっている体節の特徴を有することも確認した。また、アクシオロイドとヒト胚を遺伝子発現レベル及び形態学的に比較したところ、カーネギー発生段階 9-12 の胚と類似性を示した。さらに、シングルセル RNA シーケンシング、Cut&Tag 法や空間的遺伝子発現解析を用い、アクシオロイドの HOX コードを検証することに成功した。

本研究では、in vitro における 3 次元的先天性脊椎疾患モデルを確立した。体節形成において重要な働きをすることが知られており、先天性脊椎疾患を持つ患者において変異が報告されている *HES7* と *MESP2* 遺伝子に着目した。これらの遺伝子に変異が生じると先天的な脊椎の奇形や肋骨の融合など、重篤な障害が生じることが知られている。*HES7* と *MESP2* 遺伝子に変異を持つ疾患様 iPS 細胞由来のアクシオロイドにおいて、上皮化された体節の喪失、体節内のパターンニングの欠損が明らかとなった。さらに *HES7* 遺伝子に変異を持つ疾患様 iPS 細胞由来のアクシオロイドモデルにおいて分節時計遺伝子の発現振動の喪失が明らかとなった。確立したアクシオロイドモデルを用いて、これまで研究することが困難であったヒトの体節形成メカニズムを解明するとともに、先天性脊椎疾患の病態を再現し、この複雑な疾患の病因の解明に有用である事を示した。アクシオロイドは人の発生や疾患の研究に強力なプラットフォームであることが示された。

新しいアクシオロイドモデルを用いた“正しい”ヒト発生の理解は、発生メカニズムにおける異常により惹き起こされる疾患の理解に貢献できると考えられる。これらの研究により、アクシオロイドを活用したよりヒトの胚発生に近い疾患モデルの作成や薬物スクリーニングを実現し、新しい治療戦略につなげたいと考えている。

(English)

Somitogenesis is a core developmental event during which the metameric body plan is laid out in vertebrates. It is well studied in model organisms such as mouse, zebrafish or chick but remains poorly understood in human and other primates. Despite recent progress with pluripotent stem cell (PSC)-based in vitro models of organogenesis and embryonic development, an experimental model system that can robustly recapitulate core features of somitogenesis in vitro remains largely elusive. Using in vitro-derived presomitic mesoderm (PSM), we and others have previously succeeded to reconstitute and quantify oscillatory activity of the segmentation clock, a molecular oscillator believed to control somite formation. Interestingly, these in vitro models of the segmentation clock did not show any sign of segmentation or somitogenesis despite the presence of oscillatory activity of clock genes such as HES7. Extending on these earlier findings we then asked whether we could recapitulate not only the segmentation clock but also the actual process of segmentation and epithelial somite formation in vitro. We established a PSC-derived mesoderm-based in vitro 3D model of human segmentation and somitogenesis which we termed axioloid, that accurately captures the sequential formation of epithelial somites and recapitulates the segmentation clock associated oscillatory expression dynamics of HES7.

Our self-organizing “axioloids” shared morphological and molecular features of the emerging vertebrate embryonic tail and axis including presence of somitogenesis associated major cell populations and opposing morphogen gradients and signaling activities. We further demonstrated a critical albeit unexpected function of retinoic acid (RA) signaling in the stabilization of segments, suggesting a synergistic role for RA and extracellular matrix (ECM) components in the formation and epithelialization of somites. Importantly, comparative analysis of axioloids to human embryos revealed striking similarities in terms of gene expression signatures and morphometric parameters, further validated by the presence of a HOX code, i.e. the spatiotemporally controlled expression of HOX genes along the antero-posterior axis of axioloids.

Lastly, we applied our bottom-up model system to study the pathogenesis of human congenital diseases of the spine, using patient-like iPSCs with mutations in HES7 and MESP2, which revealed disease-associated phenotypes. For example, axioloids derived from patient-like iPSCs with mutations in HES7 and MESP2 showed loss of epithelialized somite like structures and lack of rostral-caudal polarity. Axioloids derived from patient like cells with mutation in HES7 also showed loss of oscillatory expression of HES7. These results suggest that axioloids represent a promising novel platform to study early embryonic development and disease in humans.