

ヒト胚での 3D 体節形成モデルを iPS 細胞から確立

—ヒトの初期発生や先天性脊椎疾患の機序解明に期待—

概要

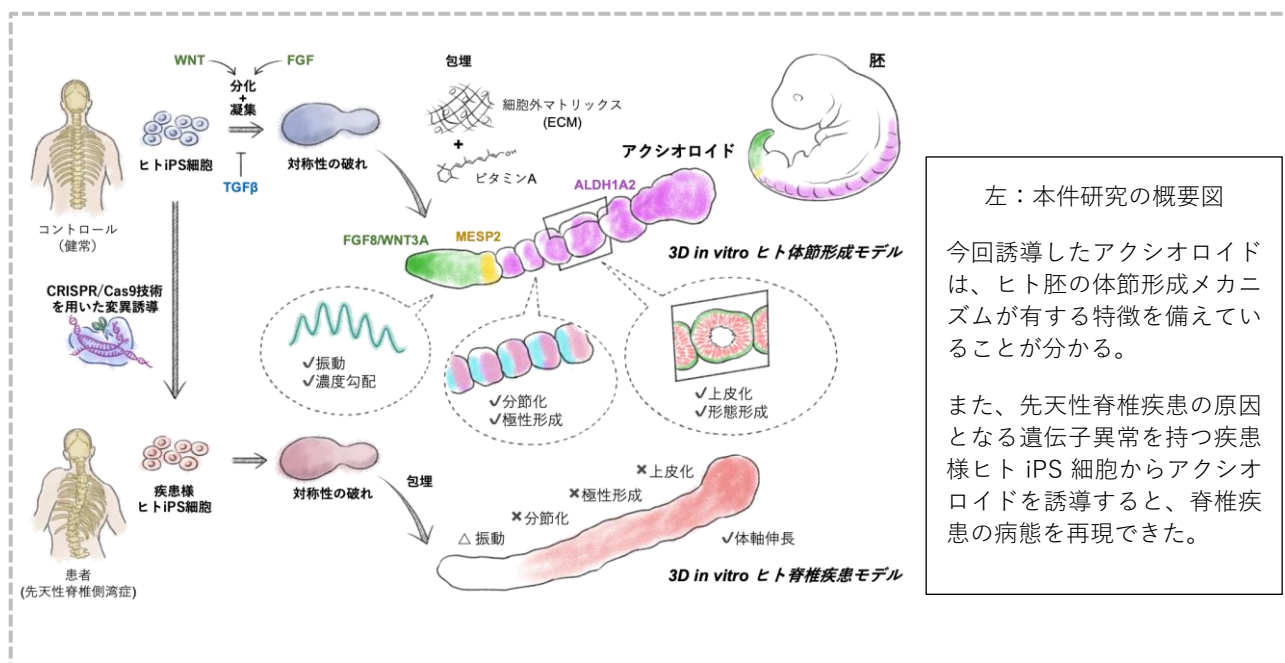
ヒトをはじめとした脊椎動物において、初期胚の一部である中胚葉から、骨格や筋肉などへとつながる体節を形成する過程は、初期発生における重要な現象です。しかしながら、体節形成メカニズムをはじめとしたヒト初期発生の研究を生体内で行うことは、技術的、倫理的な制約などから極めて困難であり、初期発生の理解につながる試験管内モデルの確立に向けた研究が世界的なトレンドとなっています。

京都大学高等研究院ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi) Cantas ALEV (アレヴ・ジャンタシュ) 特定拠点准教授が率いる研究グループは、ヒト iPS 細胞¹を用いて、ヒトの初期発生における体節形成を再現する 3 次元細胞培養モデル (Axioloid: アクシオロイド) を確立しました。このアクシオロイドは、実際のヒト胚における体節構造の形態的な再現だけでなく、遺伝子の発現パターンなどの分子的特徴も備えており、これまで困難であったヒトの初期発生プロセスや、先天性脊椎疾患などの疾患形成メカニズムなどの理解に貢献することが期待されます。

本研究で、Alev 研究室所属の山中良裕特定研究員ならびに Sofiane HAMIDI (ハミディ・ソフィアン) 同特定研究員は、京都大学や海外の他の研究者らの協力のもと、iPS 細胞を用いて、初期発生におけるヒト胚と同様な 3 次元的な尾と軸を持つ体節様構造物の誘導に成功、アクシオロイドと命名しました。そのアクシオロイドの 1) 上皮化された体節様構造物の周期的な形成において、レチノイン酸 (RA)²と細胞外マトリックス (ECM)³分子の相乗作用が不可欠である事を示し、アクシオロイドが 2) 実際のヒト胚との形態的な相同性に加えて、遺伝子の発現パターンなどの分子的特徴の類似性も備えていることを示しました。さらに、3) 体節形成における重要な遺伝子 (*HES7*, *MESP2*) に変異を持つ iPS 細胞 (疾患様 iPS 細胞) から試験管内で先天性脊椎疾患を再現するアクシオロイドモデルの確立にも成功しました。

Alev 研究室では、本研究で確立したアクシオロイド及びその関連研究を今後更に進めていくことで、ヒト胚との類似性をさらに高め、ヒトの初期発生プロセス解明に貢献していくことを目指します。

本成果は、2022 年 12 月 21 日午後 4 時(GMT)に英国の国際学術誌「Nature」にオンライン掲載されます。



1. 背景

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します。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⁴から形成されます。体節は後に椎骨、肋骨、骨格筋や真皮に分化⁵します。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研究されてきましたが、ヒトではまだよく分かっておりません。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ましたが、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ませんでした。過去に特定拠点准教授 Cantas ALEV（アレヴ・ジャンタシュ）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⁶の振動活性を再構成し、定量化することに成功していました（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には至りませんでした。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次的に再現することを試みました。

2. 研究手法・成果

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ました。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おります。またアクシオロイドは、尾芽、未分節中胚葉（沿軸中胚葉）、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りました。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ました。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と一致しました。

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おりました。本研究グループは、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ました。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ました。アクシオロイドでは、遺伝子発現のパターンや、極性（頂底軸・頭尾軸）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ました。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ました。さらに、シングルセル RNA シーケンシング解析や空間的遺伝子発現解析を用い、全ての *HOX* 遺伝子⁷の発現を可視化することに成功しました。

また本研究では、in vitro における3次的先天性脊椎疾患モデルを確立しました。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* 遺伝子に着目しました。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ます。本研究グループは、*HES7* と *MESP2* に変異を持つ iPS 細胞（疾患様 iPS 細胞）とアクシオロイドモデルとを組み合わせることで、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や治療法の確立につなげられる有用なモデルとなる事を示しました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究では、ヒトの初期発生 of 1 つの重要な側面である、体節形成を再現できる新しい *in vitro* モデルを確立することができました。このモデルは、非ヒト霊長類などの他の種にも適用可能であり、初期発生における脊椎の進化およびその他のヒト特異的な特徴を解明するために用いることができます。

本研究グループは、今後、アクシオロイドモデルを拡張し、ヒト胚との類似性をさらに高めることを目指しています。例えば、体節から椎骨や肋骨を形成する硬節と、骨格筋や真皮を形成する皮筋節への分化誘導の実現を目標としています。それにより、硬節と皮筋節の分化に重要な遺伝子の変異が関連する先天性脊椎疾患の研究に役立てられると考えられます。これらの研究により、アクシオロイドを活用した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ます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は Cantas ALEV（アレヴ・ジャンタシュ）に対する内藤記念科学振興財団、武田科学振興財団、日本医療研究開発機構（AMED）、京都大学リサーチ・ディベロップメントプログラム【いしずえ】、および、その他の著者に対する科学技術振興機構（JST）・創発的研究支援事業、戦略的創造研究推進事業、日本医療研究開発機構（AMED）・革新的先端研究開発支援事業、京都大学ヒト生物学高等研究拠点（ASHBi）フュージョンリサーチプログラム、Cancer Research UK、UK Medical Research Council、Wellcome Trust、Royal Society research grant 等の助成を受けて行われました。

<用語解説>

1. 人工多能性幹細胞（iPS 細胞）：様々な細胞に分化できる多能性を持つ細胞
2. レチノイン酸：ビタミン A 誘導体の 1 種。
3. 細胞外マトリックス（ECM）：細胞外に存在する物質で、物理的な足場として働く。
4. 未文節中胚葉：中胚葉は初期発生において、原腸換入後に現れる 3 つの細胞群（外胚葉、中胚葉、内胚葉）の 1 つで、筋肉や骨格を作る。この中胚葉細胞の中で、特に体節を形成する前の未分化な前駆状態にあるものを未分節中胚葉と呼ぶ。
5. 分化：細胞が発生段階で特殊化し、特異性を確立していくこと。
6. 分節時計：未分節中胚葉における分子的振動子に基づく周期的な遺伝子発現。体節形成を制御していると考えられている。
7. HOX 遺伝子：胚発生の初期において前後軸のパターン形成に関わる遺伝子群。

<研究者のコメント>

私たちは、非常に単純な初期構造から複雑な器官や組織がどのように形成され、胚発生中にどのように相互作用するかに興味を持っています。私たちの研究室では、複雑な構造形成を *in vitro* で 1 つずつ再現し、さらにそれらを組み立て上げるボトムアップアプローチを使用して、ヒトおよび他の生物の胚発生を再構成することで、その仕組みの理解に繋がりたいと考えています。また、様々な生物種由来の多能性幹細胞からアクシオロイドを誘導することで、脊椎発生の種間比較をして、その進化プロセスの解明にも貢献したいと考えております。

<論文書誌情報>

タ イ ト ル Reconstituting human somitogenesis in vitro (試験管内でヒト体節形成を再構築)
著 者 Yoshihiro Yamanaka, Sofiane Hamidi, Kumiko Yoshioka-Kobayashi, Sirajam Munira,
Kazunori Sunadome, Yi Zhang, Yuzuru Kurokawa, Rolf Ericsson, Ai Mieda, Jamie L.
Thompson, Janet Kerwin, Steven Lisgo, Takuya Yamamoto, Naomi Moris, Alfonso Martinez-
Arias, Taro Tsujimura, Cantas Alev
掲 載 誌 Nature
D O I 10.1038/s41586-022-05649-2

(URL: <https://www.nature.com/articles/s41586-022-05649-2>)

<お問い合わせ先>

Cantas ALEV (アレヴ・ジャンタシュ)
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
TEL : 075-753-9899
E-mail : alev.cantas.8m@kyoto-u.ac.jp Twitter : @alevlab

<拠点並びにプレスリリースについてのお問い合わせ先>

ASHBi リサーチアクセレーションユニット
京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi) 事務室
TEL: 075-753-9878
Email: ashbi-acceleration@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp