

培養幹細胞から仙椎の細胞への分化誘導法の確立

[1] 組織

代表者：鈴木 孝幸

(大阪公立大学大学院理学研究科)

対応者：松本 健

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

斎藤 成治 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

友岡 俊 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

研究費：物件費 123,280 円，旅費 76,720 円

[2] 研究経過

沿軸中胚葉は、将来の私たちの体幹部分の組織である脊椎骨や結合組織、軟骨細胞といったすべての支持組織の由来となる中胚葉系の幹細胞である。発生過程において、沿軸中胚葉は常に胚の後端に位置し、発生初期には上半身に位置する頸椎や胸椎の脊椎骨の原器を、発生後期には下半身に位置する腰椎や仙椎の脊椎骨の原器を生み出す。すなわち沿軸中胚葉の細胞は、発生が進むにつれて上半身部分から下半身部分の形成へと体の前後軸に沿って正しい位置にそれぞれの支持組織を構築するための何らかの位置情報を認識しているのではないかと考えられて来たが、これまでその位置情報の分子実体は全く不明であった。

体の前後軸に沿った脊椎骨のパターンは、転写因子である Hox 遺伝子群(Hox1~Hox13)の発現パターンによって決められていることが知られている。特に腰椎や仙椎など下半身が形成される部分では、Hox9~Hox13 が順番に発現することで、それぞれ腰椎-仙椎-尾椎の区画化がおこる。したがって、発生中どの場所に下半身の脊椎骨が作られるのかは、沿軸中胚葉の細胞においてどのように Hox9~Hox13 の発現が順番に誘導されるのかを明らかにすることにより解明出来る。

近年我々は、沿軸中胚葉に特定のタイミングで発現する分泌タンパク質である Growth Differentiation Factor-11(GDF11) が、仙椎や後肢など体の下半身に位置する器官の形成位置をまとめて決めている分子実体であることを発見し報告した。この研究の中で、GDF11 を中胚葉の細胞に作用させると下半身を形成する部分に発現する Hox9~Hox13 の発現が特異的

に誘導されることを見出した。さらに Hox9 は低濃度の GDF11 タンパク質の存在下でも誘導されるが、Hox13 は高濃度の GDF11 タンパク質の存在下でないと発現が誘導されないことが判明した。この結果は沿軸中胚葉の細胞に作用する GDF11 タンパク質の時間と濃度に依存して、下半身の中でも体の前側に存在する腰椎は Gdf11 の発現開始直後の低濃度の状態でも Hox9, 10 が発現出来ることにより形成され、その後 GDF11 タンパク質が多く作用した場所に Hox11~Hox13 が発現出来るようになることで、仙椎や尾椎といった下半身の中でもより体の後側の脊椎骨が順番に形成される可能性を示唆している。

脊椎骨は、細菌感染を起こしたり、がんの転移先となることがあり、外科的手術により病床を除去する必要がある。この時予後の QOL を向上させるために、特定の脊椎骨を再生させることが出来れば健康体としての生活を送ることが出来ると考えられる。しかしながら、細胞培養技術により、腰椎や仙椎などの特定の脊椎骨 (又はその原器) を作成する技術は未だに確立されていない。そこで本研究では、我々が発見した下半身の脊椎骨の個性を決定する Hox 遺伝子群の発現を誘導する GDF11 の作用に着目し、ES 細胞の分化誘導系を用いて脊椎骨の中でも仙椎を特異的に分化誘導させる培養系を確立することを目的として研究を行った (図1)。

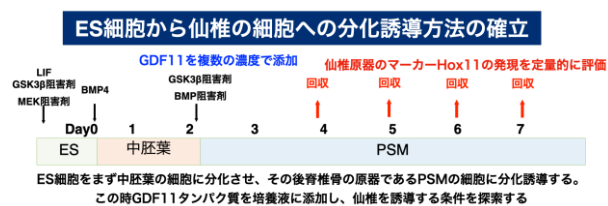


図1. 仙椎の原器の細胞への分化誘導法の概要

以下、研究活動状況の概要を記す。

加齢医学研究所神経機能情報分野講師の松本健博士から ES 細胞の培養方法並びに分化誘導法の技術提供をして頂き、ES 細胞から脊椎骨の原器の細胞へ効率的に分化誘導を行うことが出来るようになった。1 か月に 1 度程度定期的にミーティングを行い進捗状況を報告した。また加齢医学研究所にお伺いし、GO 解析ソフトを用いて遺伝子発現変化の経路解析を共同で行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第一に、マウスの ES 細胞から BMP4 を培養液に添加することにより、中胚葉の細胞に効率的に分化を誘導することに成功した。中胚葉に分化誘導 2 日目に培地を交換し、GSK3 β の阻害剤と BMP の阻害剤を培養液に添加することにより、次に脊椎骨の原器である PSM (沿軸中胚葉) の細胞への分化を誘導した。PSM の細胞へと分化した細胞は体の前側の PSM のマーカーである *Hox1* の発現が誘導されたのを qPCR を用いて確認した (図 2)。その後、培地を交換し PSM の細胞の分化誘導を続けることで、より体の後側の PSM のマーカーである *Hox4*, *Hox9* の発現が分化誘導 4,5 日目に観測され、仙椎の領域となる場所に発現する *Hox11* の発現が分化誘導 7 日目に発現することが判明した (図 2)。これらの結果から、上記に示した培養条件を用いると ES 細胞から中胚葉の細胞を経て、脊椎骨の原器である PSM の細胞に分化誘導が出来ることが判明した。

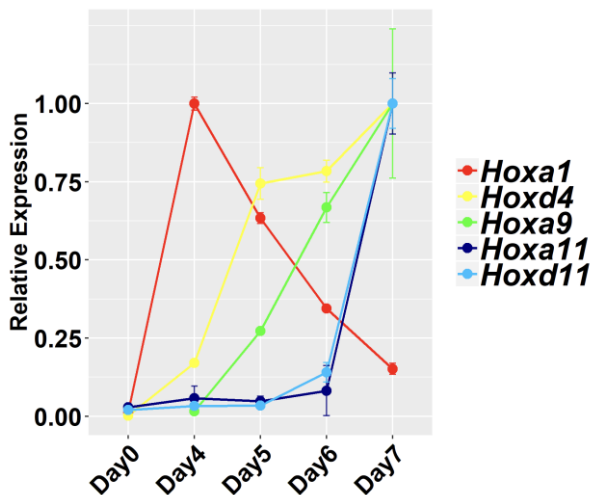


図 2. ES 細胞から PSM の細胞への効率的な分化誘導法の確立

このように分化した PSM の細胞は体の前側から後側まで幅広い領域にわたる脊椎骨の原器のマーカーを発現していた。

そこで次に、GDF11 タンパク質を様々な濃度、時間を降って培養液に添加し、仙椎を形成する遺伝子である *Hox11* の発現を効率的に誘導する分化誘導の培養条件の探索を行った。

GDF11 タンパク質は PSM の細胞へと分化誘導後 6 日目に培養液に添加した。GDF11 を添加後条件検討で様々な時間と濃度を振って仙椎形成に必須である *Hoxa11*, *Hoxc11*, *Hoxd11* の発現を qPCR を用いて検討した結果、GDF11 の濃度を中程度で長時間作

用させたとき、また高濃度で短時間作用させたときに安定して *Hoxa11*, *Hoxc11*, *Hoxd11* の発現を誘導させることが出来ることを見出した。これらの結果は GDF11 タンパク質単体で仙椎の形成に必須な *Hox11* パラログス遺伝子の全てを誘導できることを示している (図 3)。

今後は誘導された *Hox11* 発現細胞が正常胚における *Hox11* 発現細胞と同等な他の遺伝子発現を示すかどうかをシングルセル RNA-seq を用いて解析していきたい。

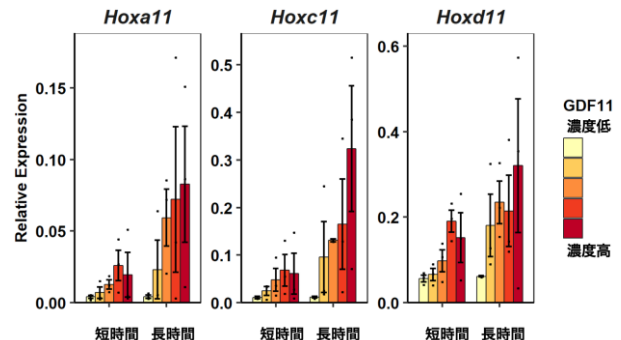


図 3. GDF11 による仙椎の原器の細胞への効率的な分化誘導の条件検討

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究で明らかになった ES 細胞から仙椎の原器の分化誘導条件の発見の成果は、これまで方法論がなかった特定の脊椎骨への分化誘導法を初めて開発した結果となり、今後脊椎骨の再生治療という新しい研究領域の開拓に結びつき、今後の発展が期待される。

今後は、マウスの ES 細胞で得られた分化誘法をヒト iPS 細胞へも適応させることでヒトの脊椎骨の分化誘導法に確立につながることを期待される。

[4] 成果資料

(1) 日本解剖学会招待公演 ”四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出した分子基盤” 2023.3.20(仙台)

(2) 動物学会招待公演 ”四肢動物における後肢の位置の多様性を生み出した分子基盤” 2023.9.8 (東京)