

平成 31 年 4 月 12 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 479

氏 名

熱田 勇士

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ボストン（国名：アメリカ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

繊維芽細胞から手足をつくる：四肢前駆細胞を生み出す細胞リプログラミング法の確立

3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

ハーバード医科大学遺伝学研究科

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入****も可）**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究の目的は、四肢を形成する前駆細胞（Limb bud progenitors、以下 **LP 細胞**）が如何にして特定化されるかを、LP 細胞リプログラミング法の開発を通して明らかにすることである。以下に述べるように、1) リプログラミング候補因子のリスト作成、2) LP 細胞の培養法の確立、3) リプログラミング因子のスクリーニング、4) リプログラムされた細胞（**Repro 細胞**）の遺伝子発現プロファイルの解析、5) **Repro 細胞**の分化能の検証、の 5 点について研究を遂行した。

## 1) リプログラミング候補因子のリスト作成

LP 細胞は側板中胚葉の限定された領域から出現し、軟骨、骨、関節、靱帯や真皮などの組織を産生する。また、遠近、背腹、前後軸に沿ったパターン化された構造を形成するといった特徴も持ち合わせる。例えば腕の場合、手、手首、尺骨・橈骨、肘、上腕骨といった具合に、遠近軸に沿ってパターン化される。しかしながら、もし肢芽以外の側板中胚葉細胞を肢芽に移植しても、それらの細胞はこれらの分化・パターン化能を示さない。この LP 細胞の特性をもたらす遺伝子ネットワークを開始する“イニシエーター”を探り当てるため、我々は細胞リプログラミングによるアプローチを選択した。なぜならば、肢芽特異的に発現する遺伝子群の中で、繊維芽細胞を LP 細胞へと転換させる因子があるとすれば、それらは恐らく発生過程においても LP 細胞を特異化する働きを持つ可能性が大きいためである。例えば、iPS リプログラミングを可能にした山中因子（OSKM）は、そのリプログラミング能のみならず、初期発生においても重要な働きを担うことが後に明らかになった。すなわち OSKM は Inner cell mass や Epiblast の維持および形成をコントロールする遺伝子ネットワークを制御する因子でもある。

候補因子を探索するために、RNAseq により、肢芽予定領域、肢芽、肢芽以外の側板中胚葉組織の遺伝子発現プロファイルを比較した。主成分解析 (PCA) により、転写遺伝子群が、肢芽とそれ以外の領域において、異なるレベルで発現することが明らかになった。それら遺伝子群のうち、肢芽にて有意に発現量が高い 17 遺伝子を候補転写因子とした。また、現在までに知られる iPS リプログラミング因子の中で、肢芽でも発現が認められる遺伝子の有無を RNAseq データを用いてスクリーニングした。その結果、RNA 結合因子である Lin28a/b が肢芽形成初期過程においてのみ発現することがわかった。この結果は以前の報告とも一致する (Yokoyama et al., *GEP*, 2008)。したがって、17 転写因子に Lin28a を加えた 18 因子をリプログラミング候補因子とした。

## 2) LP 細胞の培養法の確立

これまでに確立された各種リプログラミング法は、須く内在性の幹細胞あるいは前駆細胞の初代培養法に裏打ちされている。以前に当研究室の研究結果によって、Fgf8、Wnt3a およびレチノイン酸 (RA) を培地に加えることにより、初代培養 LP 細胞の未分化能を 36 時間にわたり維持できることが示された (Cooper et al., *Science*, 2011)。しかしながら、RA は BMP シグナルの活性化を介し LP 細胞の細胞死を誘導するため、それ以上の培養は困難であった。そこで私は、TGF- $\beta$ /BMP 阻害剤 SB431542 および ES 細胞死を抑制することで知られる Rock 阻害剤 Y-26732 を加えることによって、より長期の培養が可能か否かを調べた。また、肢芽内の環境をできるかぎり模倣するため、ヒアルロン酸 (HA) ベースのハイドロゲルを用いて、LP 細胞を培養することを試みた。図 1 に示したように LP 細胞は HA

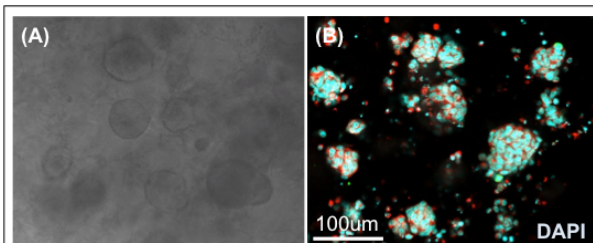


図1 マウス LP細胞の3次元培養  
(A, B) HAハイドロゲルに播種、培養されたLP細胞

ハイドロゲル内で、コロニーを形成する (図 1A, B)。3次元培養された LP 細胞が実際にマーカー遺伝子の発現を維持しつつ、増殖するかを調べるために、肢芽特異的に GFP シグナルが見られる *Prx1GFP* レポーターマウス胚より採取された LP 細胞を培養条件の検証実験に利用した。また、*Lhx2*、*Sall4*

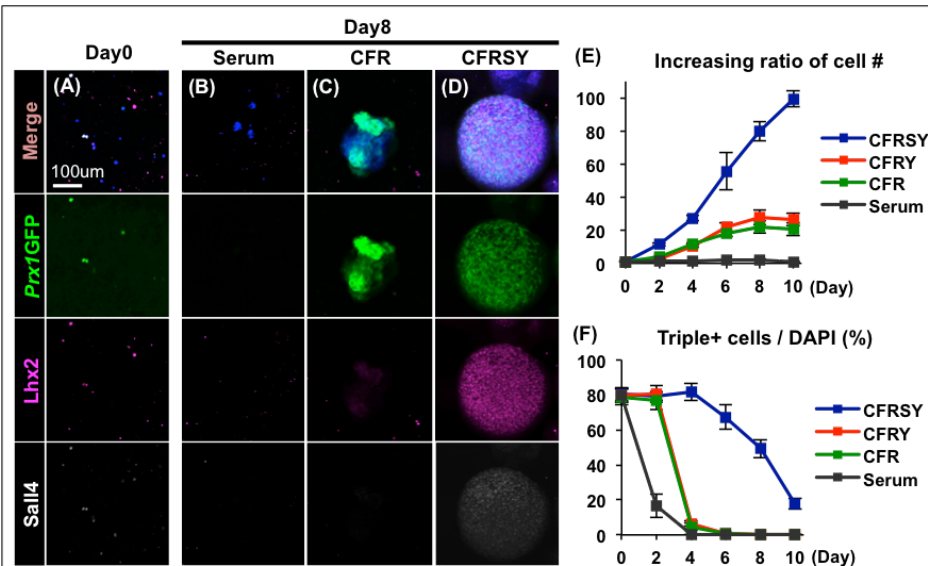


図2 LP細胞の培養条件検討

(A-D) HAハイドロゲル内でLP細胞を10%FBS (Serum)、CFR (Chir99021、Fgf8、RA) あるいは CFRSY (CFR+SB431542、Y26732) 存在下で培養した。(E, F) CFRSYコンディションにおいて、最も高い増殖率および未分化マーカーの維持が見られた。

も未分化肢芽間充織マーカーとして用いられた (図 2)。その結果、CFRSY (C: Chir99021, F: Fgf8, R: RA, S: SB431542, Y: Y26732) 存在下で、LP 細胞は高い増殖率を示し、未分化マーカーの発現も培養 8 日目でも殆どの細胞が陽性であった (図 2D-F)。さらに抗酸化作用を持つことで知られる 2-メルカプトエタノールおよび細胞増殖を補助する非必須アミノ酸を加えることにより、細胞増殖が刺激されることも見出ししており、現在、定量中である。

### 3) リプログラミング因子のスクリーニング

次に上記の培養条件を利用して、リプログラミング因子のスクリーニングを行った。前述の *Prx1*GFP レポーターマウス胚から、今度は GFP 陰性の線維芽細胞を採取し、候補因子の強制発現（ウィルス感染）によって GFP 陰性細胞から陽性細胞を生み出すことが可能か、そして、そのプロセスにはどの因子が重要かについて調べた（図 3）。図 1B に示されたように、全 18 候補因子の強制発現によって、GFP 陽性細胞が出現した。また、各因子の重要度を検証するため、-1 アッセイ（各因子をウィルスプールから除く）を行った結果、Lin28a, Tfap2a, Etv4, Prdm16, Lhx2, Plzf (ZBTB16), Hoxd10 の 7 因子が GFP 誘導に必要であることがわかった。さらに、2nd -1 アッセイ（7 因子から各 1 因子を除く）、-2 アッセイ（7 因子から 2 因子を除く）、single アッセイ（1 因子のみを各ハイドロゲルに使用する）を行った結果、Lin28a が GFP 誘導に最も重要であることが明らかとなった。

続いて Lin28+1 アッセイ（Lin28 に 1 因子を加える）を実施し、Lin28 に Plzf か Prdm16 を加えると GFP 誘導の効率が上昇することが示された（図 3D）。最後にそれら 3 因子（以下 LZP）が更に GFP 誘導効率を促進することがわかったため、LZP が有望なリプログラミング因子のコンビネーションであると考えられた（図 3D）。

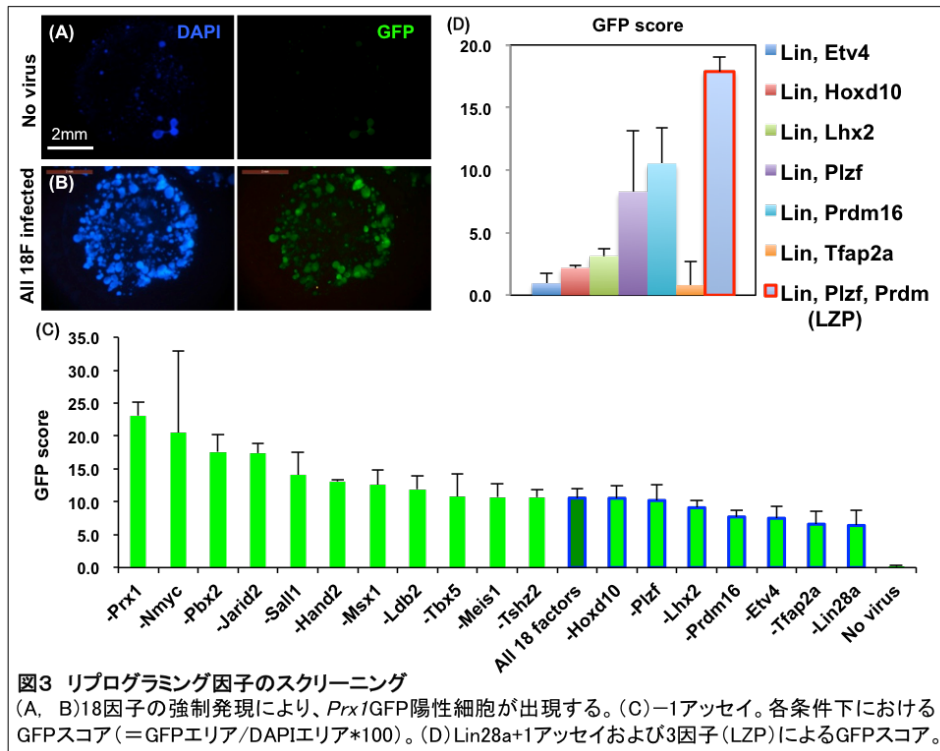


図3 リプログラミング因子のスクリーニング

(A, B)18因子の強制発現により、*Prx1*GFP陽性細胞が出現する。(C)-1アッセイ。各条件下における GFPスコア(=GFPエリア/DAPIエリア\*100)。(D) Lin28a+1アッセイおよび3因子(LZP)によるGFPスコア。

### 4) Repro 細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

引き続き、3) で同定された LZP によりリプログラムされた細胞（以下 **Repro 細胞**）が、本来の LP 細胞と同様の遺伝子発現プロファイルを示すかについて、肢芽マーカーに対する免疫染色および定量 PCR (qPCR) を用いて検証した（図 4, 5）。その結果、興味深いことに、Repro 細胞では *Prx1*GFP のみならず、*Lhx2*, *Sall4*, *Irx3*, *Tfap2c* といった肢芽特異的マーカーの発現が認められた（図 4A, C）。また、qPCR の結果、他のマーカー遺伝子についても発現上昇が認められた（図 5A-C）。具体的には、Repro 細胞では前肢芽マーカーである *Tbx5* が発現し（図 5A）、*FgfR2c*, *Dusp6* は LP 細胞と同様の発現レベルであった（図 5C）。しかしながら、*Msx2*, *Meis2*, *Lhx9*, *Axin2* は LP

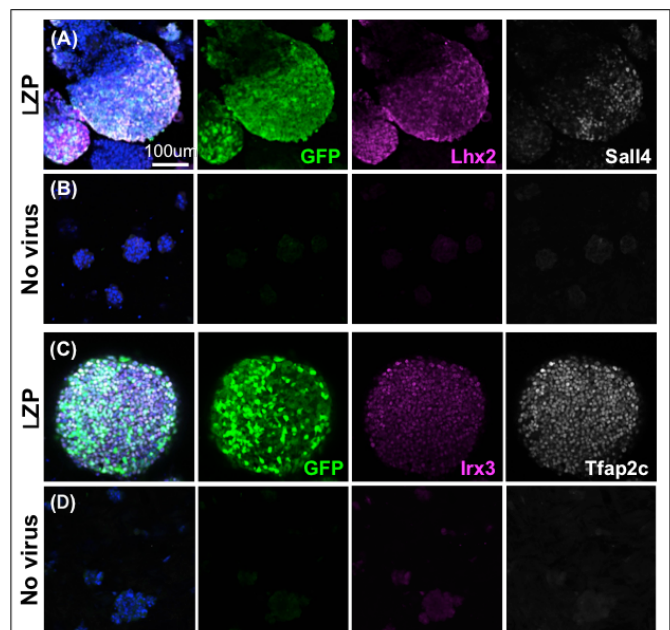


図4 LZPは肢芽マーカーの発現を誘導する(免疫染色結果) LZP(Lin28a, Plzf, Prdm16)の強制発現は*Prx1*GFPに加え、*Lhx2*, *Sall4* (A), *Irx3*, *Tfap2c* (C)の発現を誘導する。

細胞より高い発現上昇が見られ、反対に *PrxGFP*、*Fgf10*、*Hoxd9* は、未リプログラム細胞よりは高いレベルにあるものの、内在性の LP 細胞よりは低かった (図 5C)。これらのことから、一部の *Repro* 細胞は恐らく期待通りに、LP 細胞にかなり近い遺伝子発現プロファイルを持つと予想されるものの (特に前肢芽細胞)、全ての *Prx1GFP* 陽性の *Repro* 細胞が完全にリプログラムしているわけではなく、*Repro* 細胞の状態は heterogeneous であると考えられる。

引き続き、*Repro* 細胞が実際に内在性の LP 細胞と同様の遺伝子発現プロファイルを持つかについて、単一細胞 RNAseq 解析 (scRNAseq) を用いて調べた。GFP シグナルを基準に、セルソーターで *Repro* 細胞を分取し、最近開発された Drop-seq 法 (Macosko et al., *Cell*, 2105) を用いて scRNAseq を行なった。次元圧縮アルゴリズムの 1 つである UMAP を用いて、細胞集団のクラスタリングを行なったところ、*PrxGFP* 陽性である *Repro* 細胞は MEF とは全く異なった遺伝子発現プロファイルを示すことがわかった (図 6)。一方、内在性の LP 細胞とは、一部の *Repro* 細胞が同じクラスター内に分布したことから、それらの *Repro* 細胞は LP 細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを持つと考えられた (図 6、矢印)。個々の遺伝子発現レベルについては、詳細を現在解析中である。

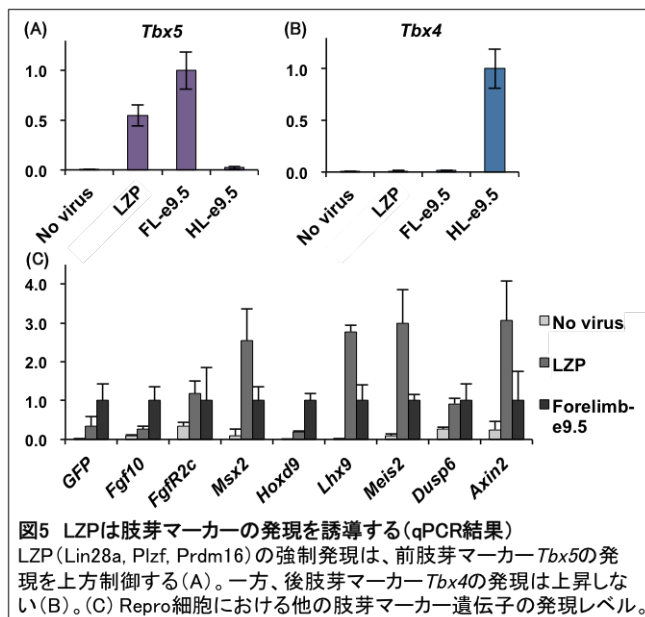


図5 LZIPは肢芽マーカーの発現を誘導する (qPCR結果)  
LZIP (Lin28a, Plzf, Prdm16) の強制発現は、前肢芽マーカー *Tbx5* の発現を上昇制御する (A)。一方、後肢芽マーカー *Tbx4* の発現は上昇しない (B)。 (C) *Repro* 細胞における他の肢芽マーカー遺伝子の発現レベル。

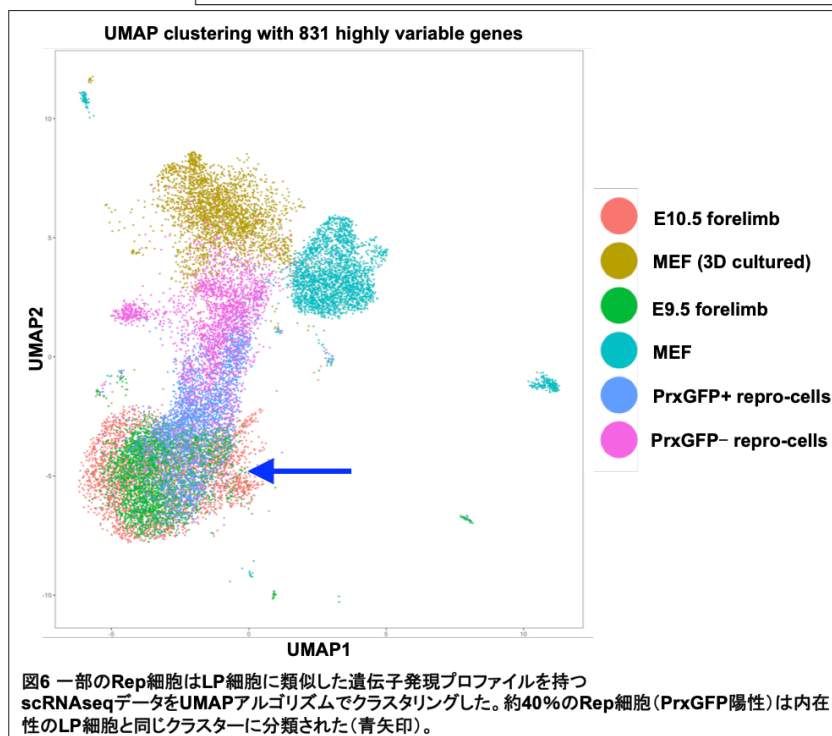


図6 一部のRep細胞はLP細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを持つ  
scRNAseqデータをUMAPアルゴリズムでクラスタリングした。約40%のRep細胞 (PrxGFP陽性) は内在性のLP細胞と同じクラスターに分類された (青矢印)。

## 5) *Repro* 細胞の分化能の検証

次に *in vitro* 培養系を用いて、*Repro* 細胞が実際に、四肢内で見られる組織への分化能を獲得しているかを調べた。LP 細胞は、通常の血清入り培地、高細胞密度条件下で培養された際、軟骨や腱などの組織へと細胞自律的に分化することで知られる (図 7)。その条件下で、*Repro* 細胞を培養したところ、初期軟骨細胞のマーカー遺伝子である *Sox9* の発現が開始することが認められた (図 7A)。また、成熟軟骨細胞をラベルするアルシアンブルーでも *Repro* 細胞が染色されたこと、qPCR で成熟軟骨の別のマーカー *Agcl* の発現上昇が見られたことから、リプログラムされた細胞は軟骨組織への分化能を獲得していることがわかった (図 7B, C)。加えて、結合組織のマーカーである *Scx* と *Osr2* (それぞれ腱、関節前駆細胞) の発現上昇も認められたことから、*Repro* 細胞は

複数の細胞へと分化することが可能であることが示唆された(図 7C)。

現在、マウス胚およびニワトリ胚へと **Repro** 細胞を移植することによって、*in vivo* における分化能を検証している。期待通りの結果が得られた際には、これまでの結果を取りまとめ論文へと着手する。

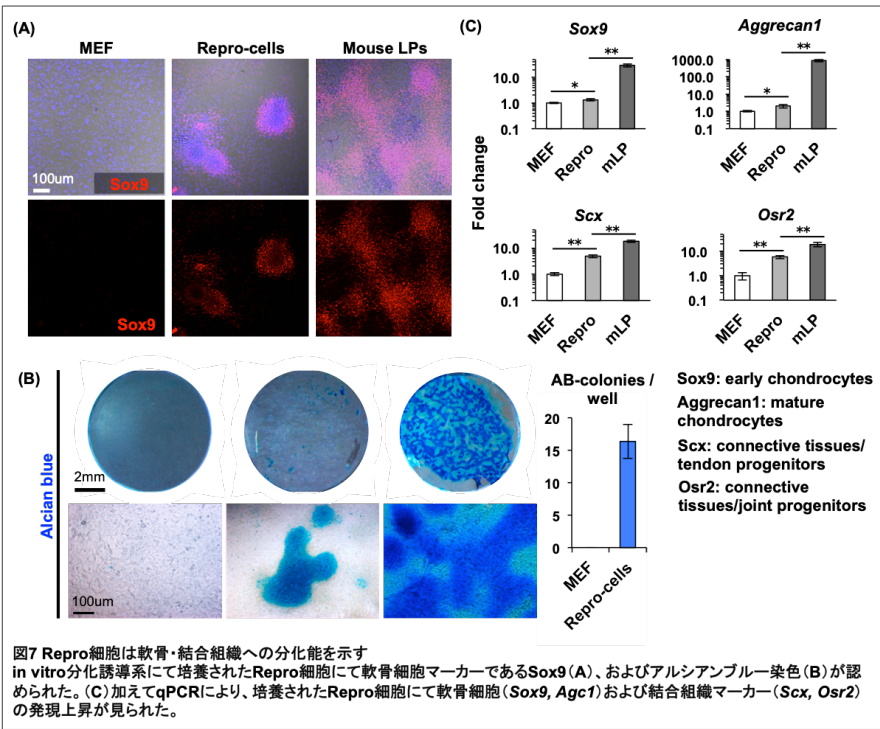


図7 **Repro**細胞は軟骨・結合組織への分化能を示す *in vitro*分化誘導系にて培養された**Repro**細胞にて軟骨細胞マーカーであるSox9(A)、およびアルシアンブルー染色(B)が認められた。(C)加えてqPCRにより、培養された**Repro**細胞にて軟骨細胞(*Sox9*, *Agc1*)および結合組織マーカー(*Scx*, *Osr2*)の発現上昇が見られた。