

PRESS RELEASE (2024/02/06)

## 手足をつくる四肢前駆細胞を産むリプログラミング法の開発に成功 四肢欠損治療技術開発への光明となる可能性大

### ポイント

- ① 非四肢細胞に四肢前駆細胞の性質を付与できるリプログラミング因子群を同定
- ② これらの因子群は四肢発生過程においても、四肢前駆細胞特定化の役割を担う可能性が高い
- ③ 非四肢細胞から四肢前駆細胞様の細胞を生み出せるため、四肢再生医療への応用も見通せる

### 概要

私たちの手足（四肢）は胚発生期において側板中胚葉という組織に由来します。側板中胚葉の一部が四肢前駆細胞（Limb Progenitor Cell, 以下「LPC」）と呼ばれる細胞となり、そのLPCは胚発生後期に骨、軟骨、腱などの結合組織といった四肢の主要組織を形成します。四肢原基である肢芽は発生生物学研究の実験モデルとして長らく用いられてきたため、これまで多数の肢芽形成関連遺伝子が見出されてきましたが、側板中胚葉に初めに“LPCらしさ”をもたらす遺伝子の実体は未だ明らかではありません。

九州大学大学院理学研究院の熱田勇士講師（元・ハーバード医科大学研究員）、ハーバード医科大学遺伝学研究所のClifford Tabin教授らの研究グループは、LPCを産み出すリプログラミング法の確立を通して、側板中胚葉でLPCを特定化する因子の同定を試みました。まず初期肢芽形成領域でのみ働く遺伝子群をリプログラム因子の候補としてリスト化しました。その後、それらの遺伝子の中で、四肢由来ではない細胞にLPCに特徴的なマーカー遺伝子の発現を促すものが含まれるかを調べたところ、転写因子Prdm16、Zbtb16とRNA結合因子であるLin28aを組み合わせて使用すると、LPCマーカー遺伝子群の発現が誘導されることがわかりました。このコンビネーションをそれぞれの頭文字からPZLとし、マーカー遺伝子の発現が誘導された細胞をrLPC（reprogrammed Limb Progenitor-like Cell）と命名しました。さらにrLPCはその遺伝子発現プロファイルのみならず、内在性のLPCと同様の分化能（骨や軟骨の形成能）を持つことが明らかになりました。これらに加え、E3ユビキチンリガーゼの一種であるLin41をPZLに追加すると、rLPCのリプログラミング効率が上昇することも示されました。以上の結果は、本来の四肢発生過程においても、これらリプログラミング因子群が、側板中胚葉に四肢前駆細胞性を与える特定化因子として働くことを強く示唆します。また、リプログラミングによりLPC様の細胞をつくることに世界に先駆けて成功しました。

本研究成果は国際学術誌「Developmental Cell」に2024年2月5日（現地時間）にオンライン掲載されました。

## 【研究の背景と経緯】

私たちの運動を支える手足（四肢）の主要組織は、胎児期（胚発生期）につくられ、側板中胚葉という中胚葉組織に由来します。四肢の元となる肢芽の形成は、一部の側板中胚葉細胞が四肢前駆細胞(Limb Progenitor Cell, 以下「LPC」)と呼ばれる細胞集団へと特定化されることにより開始されます。LPCは発生が進行するにつれ、四肢内の骨や軟骨、靭帯、腱、真皮といった結合組織へと分化します。側板中胚葉は、そうして四肢組織をつくる一方で、心臓や体腔壁など四肢以外の臓器や組織を生み出すことでも知られています。四肢の前駆体である肢芽は主にLPCとそれらを覆う表皮細胞から成る単純な構造であり、形態形成の普遍原理を調べるための適切なモデル系として長年用いられてきました。これまでマウス胚やニワトリ胚を用いた研究から、肢芽形成に関わる遺伝子や、肢芽の成長を促すFGFなどの分泌因子が数多く見出されてきました。それにも関わらず、側板中胚葉内でLPCをはじめに特定化し、LPCと他の側板中胚葉由来組織を区別する細胞内因子は同定されていませんでした。そこで熱田らは、肢芽で発現する遺伝子の中で、非四肢由来の細胞をLPC様細胞へと転換できる因子、すなわちリプログラム因子を同定することを目指しました。なぜならば、予定四肢領域で特異的に発現し、LPCではない細胞にLPCの性質を与えることができる因子は、四肢発生過程においてもLPCを特定化する役割を担う可能性が極めて高いからです。

## 【研究の内容と成果】

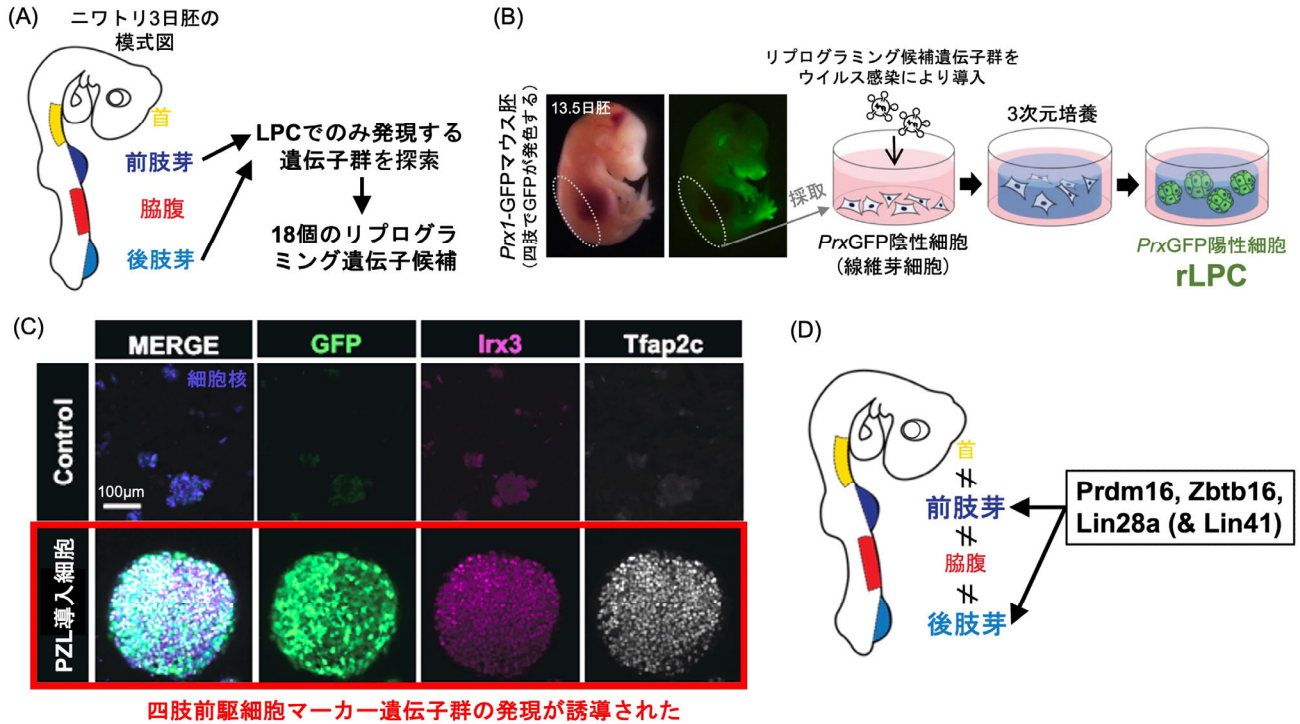
まず、RNAシーケンス（細胞内に存在するメッセンジャーRNAの発現量を計測する技術）を用いて、肢芽で発現が高く、首や脇腹の側板中胚葉領域では発現が低い遺伝子を網羅的に探索し、18個の候補遺伝子を洗い出しました（参考図A）。続いて、これら因子の中にリプログラム能を持つものが含まれるか調べるために、肢芽由来ではないマウス胚性線維芽細胞に18因子すべてを導入したところ、LPCをラベルするマーカー遺伝子の発現が認められました（参考図B）。さらにドロップアウトアッセイ（それぞれ1遺伝子ずつ省いて導入実験を行う）によりリプログラム因子を絞り込んだところ、転写因子Prdm16、転写因子Zbtb16、RNA結合因子Lin28a（以下「PZL」）の導入がLPCマーカー遺伝子を発現させるのに十分であることがわかりました（参考図C）。単一細胞RNAシーケンスを使い、LPCマーカー陽性となったリプログラム細胞rLPC（reprogrammed Limb Progenitor Cell）の遺伝子発現プロファイルの詳細に調べたところ、一部のrLPCは内在性のLPCと酷似したプロファイルを持つことが明らかとなりました。また、リプログラミング過程における遺伝子発現パターンの変化を解析した結果、リプログラミングに成功した細胞では、初期段階でE3ユビキチンリガーゼLin41の発現が上昇すること示されました。そこで、PZLに加えLin41も組み合わせることで線維芽細胞へ導入したところ（PZLLコンビネーション）、リプログラミング効率の上昇が見られました。最後に、rLPCが本来LPCが形成すべき細胞種へと分化するかを調べたところ、rLPCもLPCと同様に軟骨や腱前駆細胞へと分化することがわかりました。

以上の結果は、PZLおよびPZLLが四肢形成初期過程において、LPCをLPCたらしめる遺伝子ネットワークを側板中胚葉細胞内で起動する働きを果たす可能性を強く示唆するものです（参考図D）。

## 【今後の展開】

今回同定したリプログラム因子PZLLのうちZbtb16については、過去の研究から四肢形成に必要なことが示唆されていましたが、その他の3因子の四肢形成における役割は報告されていませんでした。今後ノックアウトマウスを作製するなどして、同定したリプログラム因子がLPCの特定化に実際に必要か否かを検証していく予定です。また、本研究ではマウス細胞を用いましたが、今後は同様の手法で、ヒト線維芽細胞からrLPCをつくることにも挑戦します。マウスやカエルの研究から、LPCの切断肢への移植が四肢再生を促進することが示されているため、大量培養が容易な線維芽細胞からヒトrLPCを作製する手段を確立できれば、四肢再生医療技術開発に貢献する公算が大きいと考えられます。

【参考図】



研究成果の概要：線維芽細胞をLPC様細胞へと転換するリプログラム因子の同定

- (A) 候補遺伝子のスクリーニング。同じ側板中胚葉由来組織（首、脇腹、肢芽）の中で、肢芽で特異的に発現する遺伝子を探索し、18個の遺伝子をリプログラム因子の候補とした。
- (B) 肢芽でGFP（緑色蛍光タンパク質）を発現するマウス胚（Prx1-GFPマウス）から、GFP陰性の非四肢細胞を採取した。18個の候補遺伝子をまとめて導入するとGFP陰性の細胞が陽性のrLPCへと変化した。
- (C) PZLにより作られたrLPCクラスターの免疫染色。rLPCではPrxGFP（緑）に加え、Irx3（マゼンタ）、Tfp2c（白）といったLPCマーカー遺伝子が発現する。青色は細胞核を示す。
- (D) 研究結果の要約図。

【用語解説】

- (※1) 側板中胚葉・・・脊椎動物の初期胚において体軸中心部からやや側方に存在する中胚葉。
- (※2) 転写因子・・・DNAの特定の配列に結合し、遺伝子の発現を制御するタンパク質。
- (※3) Prdm16, Zbtb16・・・それぞれ転写因子の一種。
- (※4) Lin28a・・・マイクロRNAと呼ばれる小さなRNA分子に結合することで、マイクロRNAの合成を抑制するタンパク質。
- (※5) Lin41・・・E3ユビキチンリガーゼ。分解されるべきタンパク質にユビキチン化修飾を施す。

【謝辞】

本研究は一部、内藤記念海外研究留学助成（内藤記念科学振興財団）、海外特別研究員制度（JSPS）、創発的研究支援事業（JST、JPMJFR214G）の支援を受け行われたものです。

【論文情報】

掲載誌：Developmental Cell

タイトル：Direct Reprogramming of Non-limb Fibroblasts to Cells with Properties of Limb Progenitors

著者名：Yuji Atsuta\*, Changhee Lee\*<sup>#</sup>, Alan R. Rodrigues\*, Charlotte Colle, Reiko R. Tomizawa, Ernesto G. Lujan, Patrick Tschopp, Laura Galan, Meng Zhu, Joshua M. Gorham, Jean-Pierre Vannier, Christine E. Seidman, Jonathan G. Seidman, Marian A. Ros, Olivier Pourquié<sup>#</sup>, Clifford J. Tabin<sup>#</sup>

D O I : 10.1016/j.devcel.2023.12.010

【お問合せ先】

<研究に関すること>

九州大学大学院理学研究院・生物科学部門・動物発生学研究室

講師 熱田 勇士（アツタ ユウジ）

TEL：092-802-6556 FAX：092-802-4270

Mail：atsuta.yuji.360@m.kyushu-u.ac.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報課

TEL：092-802-2130 FAX：092-802-2139

Mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp