

中山人間科学振興財団 2024 年度 活動報告書

研究助成

研究テーマ

霊長類 iPS 細胞由来下肢芽の誘導と
直立二足歩行獲得に関わるエンハンサー進化の解析

氏名

濱崎 裕介

所属

京都大学理学研究科生物科学専攻・大学院生

【背景】

直立二足歩行は、ヒトが進化の過程で獲得した最も特徴的な歩行様式であり、ヒトと他の霊長類とを隔てる根幹的な形質の一つである。直立二足歩行への移行に伴い、ヒトは S 字湾曲した脊柱や横に開いた骨盤、下肢の伸長といった形態を進化させてきた。これらの形態進化は二足歩行の効率化のみならず、脳の大型化や言語獲得にもつながる基盤をもたらしたと考えられている。

直立二足歩行に関連した下肢の特徴的な形態は、肢芽と呼ばれる構造から始まる一連の発生過程を経て形成される。この四肢形態形成は、発生過程における時空間的な遺伝子発現によって制御され、種固有の形態進化の背後には、シス制御領域をはじめとする非コード領域の進化が重要な役割を果たしていると考えられている¹。しかし、ヒト系統において、これらの制御配列がどのように進化し、直立二足歩行に関連した下肢形態進化をもたらしたのかについてはほとんど明らかにされていない。その大きな要因として、ヒトおよび類人猿の胚を用いた発生過程の直接的な解析が倫理的・技術的な制約により著しく困難であることが挙げられる。これまでにヒトにおいては、胚の四肢発生過程におけるエンハンサー候補領域を網羅的に同定した研究が報告されている²が、類人猿に関する同様の知見は存在せず、ヒト系統特異的な進化領域を特定する上での障害となっている。したがって、ヒトの下肢形態進化の分子基盤を明らかにするためには、その解析を実現する新たな方法論の導入が必要である。

そこで本研究では、ヒトおよび類人猿の iPS 細胞から上肢もしくは下肢の特異性を有する肢芽様細胞を選択的に誘導する方法論を開発し、遺伝子発現およびエピゲノムプロファイルの取得と種間比較解析を通じて、直立二足歩行に関連したヒト特異的なエンハンサー進化領域を探索することを目的とした。

【進捗状況】

これまでに我々は、チンパンジーおよびテナガザルを含む複数の類人猿種の iPS 細胞を独自に樹立してきた³⁻⁵。類人猿 iPS 細胞を用いた枝芽分化誘導法の報告例はなかったため、まず初めに、ヒトおよび類人猿 iPS 細胞に共通して適用可能な枝芽分化誘導系の構築を目指した。

枝芽を構成する細胞は、発生学的には原始線条から派生する側板中胚葉に由来し、PRRX1 遺伝子を発現する細胞集団として定義される。既報の研究⁶⁻⁸では、WNT、BMP、TGF β 、FGF といった各種シグナルを段階的に制御することで、ヒト iPS 細胞から原始線条、側板中胚葉、そして PRRX1 陽性の枝芽中胚葉細胞へと効率的に分化させる方法が報告されている。これらの知見に基づき分化条件の検討を行った結果、テナガザル iPS 細胞から効率的に PRRX1+枝芽中胚葉細胞を誘導することに成功した⁵。この分化誘導過程においては、原始線条マーカー、側板中胚葉マーカー、枝芽中胚葉マーカーとなる遺伝子の発現が段階的に上昇しており、発生を模倣できていることが明らかになった。さらに、この分化誘導法をヒトおよびチンパンジーの iPS 細胞に適用したところ、これらの種においても PRRX1+枝芽中胚葉が効率的に誘導されることが確認できた。これにより、ヒトおよび類人猿の iPS 細胞に共通して適用可能な分化誘導法を構築することに成功した。

次に、誘導した枝芽中胚葉細胞が上肢あるいは下肢いずれの特性を有するかを検討するため、ヒトを含む既知の発生学的知見⁶に基づき、上肢特異的遺伝子 (TBX5、HOXC 4 /5) および下肢特異的遺伝子 (TBX 4、PITX1、HOXC9/10/11) の発現解析を実施した。その結果、TBX4 の発現が TBX 5 に対して優勢であるものの、HOXC9/10/11 の発現は低く、上肢/下肢特異性は明瞭には確認することができなかった。

そこで構築した分化誘導法を改良することで、上肢/下肢特異性を有する枝芽中胚葉細胞を選択的に誘導する方法論を構築することを目指した。発生学研究から、レチノイン酸や GDF11 といった因子が体幹前後軸の位置情報決定におい

て重要な役割を果たすことが知られている。これに基づき各種因子を、テナガザル iPS 細胞を用いた分化誘導過程に添加した。各条件で誘導した肢芽中胚葉細胞の遺伝子発現を調べたところ、条件に応じて、下肢特異的マーカー (TBX4, HOXC9/10/11) もしくは上肢特異的マーカーのいずれかが優勢となる状態を作り出すことに成功した。さらに、このうち下肢芽様細胞の分化誘導条件をヒトおよびチンパンジーの iPS 細胞に適用した結果、PRRX1 に加えて、その他肢芽マーカーとなる SALL4 や下肢特異的マーカーである TBX4 を発現する下肢芽中胚葉細胞を分化誘導できることが確認された (図1)。さらに培養期間を延長したところ、間充織様への形態変化を観察することができ、この段階でも PRRX1/TBX4 陽性であることを確認した。これらの結果から、ヒトやチンパンジー iPS 細胞から下肢芽間充織様の細胞を誘導する系の構築に成功した。

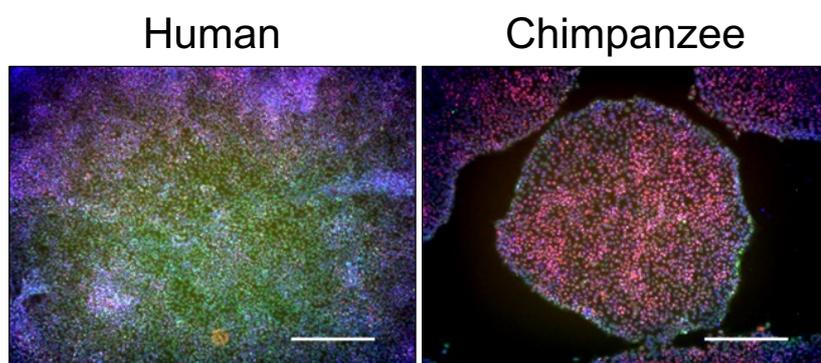


図1) ヒト・チンパンジー iPS 細胞由来肢芽中胚葉細胞の免疫染色
SALL4 (肢芽マーカー・緑) と TBX4 (下肢マーカー・赤) が共発現

【今後の展望】

現在、誘導した上肢・下肢芽様細胞の詳細な分子特性の解析および分化誘導条件のさらなる最適化を進めている。また、これらの肢芽様細胞を軟骨細胞へと分化させる条件検討を行なっている。今後、確立した分化誘導法を基盤として、ヒトおよび類人猿（チンパンジー、テナガザル）の iPS 細胞から誘導した肢芽間充織様細胞および軟骨細胞について、網羅的な遺伝子発現・エピゲノム解析を実施する予定である。これにより、ヒト系統で特異的に活性化されているエンハンサー領域を同定し、下肢の伸長など直立二足歩行に関連する形質の獲得に寄与した遺伝子発現制御機構の進化を明らかにする。

【参考文献】

1. Carroll S. B. Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell*, 134(1), 25–36. (2008).
2. Cotney, J., Leng, J., Yin, J., Reilly, S. K., DeMare, L. E., Emera, D., Ayoub, A. E., Rakic, P., & Noonan, J. P. The evolution of lineage-specific regulatory activities in the human embryonic limb. *Cell*, 154(1), 185–196. (2013)
3. Kitajima, R., Nakai, R., Imamura, T., Kameda, T., Kozuka, D., Hirai, H., Ito, H., Imai, H., & Imamura, M. Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells. *Stem cell research*, 44, 101749. (2020)
4. Imamura, M., Nakai, R., Ohnuki, M., Hamazaki, Y., Tanabe, H., Sato, M., Harishima, Y., Horikawa, M., Watanabe, M., Oota, H., Nakagawa, M., Suzuki, S., & Enard, W. Generation of chimpanzee induced pluripotent stem cell lines for cross-species comparisons. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 60(5), 544–554. (2024)
5. Hamazaki, Y., Akuta, H., Suzuki, H., Tanabe, H., Ichiyanagi, K., Imamura, T., & Imamura, M. Generation and characterization of induced pluripotent stem

cells of small apes. *Frontiers in cell and developmental biology*, 13, 1536947.

(2025)