

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 10 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11035

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞から末梢神経への分化誘導カスケードの解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying differentiation of human pluripotent stem cells into peripheral neurons

研究代表者

菅 三佳(岸本三佳)(Suga, Mika)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：00340448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経系の細胞の分化メカニズムの解明を目標として、ヒト多能性幹細胞から外肺葉、神経上皮、神経堤、末梢神経への分化誘導を行った。培地添加因子ならびに培養面をコントロールすることにより、すなわち、種々の増殖因子やインヒビター、細胞外マトリックスを組み合わせることで、神経堤細胞、末梢神経細胞へと誘導できた。以上の結果から、末梢神経細胞の発生過程の分子機構を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経細胞は神経堤(Neural Crest)から発生するが、神経堤は、脊椎動物の発生過程で一過性に現れる細胞群であり、解析が困難であるため、末梢神経系の細胞の分化メカニズムは中枢神経系の細胞に比べても不明な部分が多い。培養皿でヒト多能性幹細胞から神経堤、末梢神経への分化を再現することは、末梢神経系の細胞の分化メカニズムの解明をするために有効な方法である。本研究では、種々の増殖因子やインヒビター、細胞外マトリックスを組み合わせて培地添加因子ならびに培養面を精密にコントロールすることにより神経堤細胞、末梢神経細胞へと誘導し、末梢神経細胞の分化メカニズムを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanisms underlying peripheral nerve system development, we conducted in vitro differentiation of human pluripotent stem cells into ectoderm, neural epithelium, neural crest, and peripheral neurons. Neural crest cells and peripheral neurons were induced by controlling medium composition and culture surface, using growth factors, inhibitors, and extracellular matrixes. The results suggest the mechanisms underlying peripheral nerve development.

研究分野：発生学

キーワード：神経堤 末梢神経 ヒト多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

初期発生において神経管と表皮外胚葉の境界に生じる神経堤は、末梢神経系の神経細胞や支持細胞の大部分、色素細胞、内分泌細胞、平滑筋、頭部骨格といった非常に多様な細胞へと分化する。末梢神経系の大部分は体幹部神経堤由来であるが、頭部神経堤からは頭部及び顎顔面領域の末梢神経が発生する。*in vivo* の実験によって哺乳類の神経堤由来細胞の系譜が明らかになってきたが、*in vitro* の解析系は未だ確立されておらず、末梢神経の発生の分子機構の解析は十分には進んでいない。ヒト ES/iPS 細胞からの末梢神経系への分化誘導法を確立できれば、再現性の高い *in vitro* のアッセイ系で分化のプロセスを解析することが可能になる。ヒト多能性幹細胞由来末梢神経細胞の *in vitro* 誘導のためには、ヒトを含む脊椎動物の神経堤初期発生のメカニズムを理解した上で細胞運命を制御し、再現性の高い分化誘導プロトコルを開発することが重要である。

ヒトやマウスの ES 細胞から胚様体 (Embryoid body: EB) と呼ばれる細胞塊を作成させ末梢神経細胞へ分化させる方法が報告されている。しかし、細胞塊の内部で起こる現象は *in vivo* と同様に解析をすることが難しい。単層培養でヒト ES/iPS 細胞から神経堤を経て末梢神経を分化誘導できれば、細胞の形態変化や遊走運動をリアルタイムで観察することが可能になり、末梢神経の初期分化を試験管内で解析できる。近年、ヒト ES/iPS 細胞から無血清・単層培養下で神経堤を分化誘導する方法も報告されたが、ウシ血清アルブミン (BSA) やグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3β) 阻害剤など複数の因子が高濃度に添加されているため、分化誘導に必要な因子を正確に解析することが困難であった。また、同条件では頭部神経堤や体幹部神経堤など位置情報をもった神経堤を選択的に誘導することができない。そこで、研究代表者らは頭部神経堤誘導に必要なニッチを解析し、ヒト ES 細胞から頭部神経堤を誘導する方法の開発に取り組んできた。ES/iPS 細胞由来の頭部神経堤細胞から末梢神経を *in vitro* で誘導できれば、頭部及び顎顔面領域の末梢神経の初期発生に関わる分子メカニズムを詳細に解析することができる。

2. 研究の目的

ヒトの初期発生における頭部神経堤由来の末梢神経の細胞運命決定機構を解明することを目標として、これまでに開発したヒト/マウス ES 細胞の神経堤分化誘導法を応用して、ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞及び iPS 細胞) から頭部神経堤を経て末梢神経誘導を行い、これらの末梢神経の分化に必要な細胞周囲環境 (niche: ニッチ) を同定することを本研究の目的とする。特に頭部の末梢神経系の細胞を誘導するための外来遺伝子導入によ

らない、培地添加因子や ECM 成分の調製のみによるプロトコルの開発、ならびに誘導細胞の特性解析を目的としている。

3. 研究の方法

まず、(1)未分化のヒト ES 細胞から神経堤幹細胞ならびに頭部神経堤を高効率に誘導する条件を設定した。その分化誘導課程における遺伝子発現変化をリアルタイム PCR により誘導効率の評価を実施した。(2)また、数多いヒト iPS 細胞株 (細胞クローン) の中から、複数の iPS 細胞株を用いて誘導実験を実施し、頭部末梢神経系細胞の誘導法開発に最も有用な細胞株を選択した。次に、(3)選択したヒト iPS 細胞株を用いて、ヒト ES 細胞を用いて設定した誘導培養条件が適用できることを確認した。(4)ヒト iPS 細胞株を用い、頭部神経堤細胞への誘導培養条件の最適化をおこなうため、ヒト iPS 細胞由来頭部神経堤細胞の特性解析として、生細胞位相差顕微鏡観察による形態評価ならびに免疫染色によるマーカー発現解析評価、リアルタイム PCR 解析によるマーカー遺伝子発現評価を実施した。(5)ヒト iPS 細胞由来頭部神経堤細胞から末梢神経を誘導し、生細胞位相差顕微鏡観察による形態評価ならびに免疫染色によるマーカー発現解析評価、リアルタイム PCR 解析によるマーカー遺伝子発現評価実施し、誘導された細胞の特性解析をおこなった。

4. 研究成果

未分化のヒト ES 細胞 (H9) から神経堤幹細胞ならびに頭部神経堤を高効率に誘導し、その分化誘導課程における遺伝子発現について解析を進め、未分化のヒト ES 細胞から頭部神経堤を誘導する課程で BMP4 などの成長因子を添加する濃度と時間を的確に制御することが重要であることを立証した。また、数多いヒト iPS 細胞株 (細胞クローン) の中から、頭部末梢神経系細胞の誘導法開発に最も有用な細胞株 Tic (JCRB1331) と iPS-DF-19-9-7T を選択した。次に、選択したヒト iPS 細胞株を用いて、ヒト ES 細胞を用いて設定した誘導培養条件が適用できることを確認した。ヒト iPS 細胞株 2 株を用い、頭部神経堤細胞への誘導培養条件の最適化をおこなった。生細胞位相差顕微鏡観察による形態評価ならびに免疫染色によるマーカー発現解析評価、リアルタイム PCR 解析によるマーカー遺伝子発現評価によるヒト iPS 細胞由来頭部神経堤細胞の特性解析の結果、最適化した誘導条件で頭部神経堤細胞の特性を示す細胞が再現性良く誘導できることを確認した。さらに、ヒト iPS 細胞由来頭部神経堤細胞から末梢神経を誘導し、生細胞位相差顕微鏡観察による形態評価ならびに免疫染色によるマーカー発現解析評価、リアルタイム PCR 解析によるマーカー遺伝子発現評価実施し、誘導された細胞の特性解析をおこなった。しかしながら末梢神経誘導効率が安

定しないことから、誘導頭脳神経堤細胞の剥離方法、播種方法の検討、末梢神経誘導培地ならびに ECM について再検討を実施した。その結果、FACS 等のフローサイトメーターによるソーティングや外来遺伝子導入発現等の遺伝子操作を必要とせず、ECM と培地添加因子の調製のみで細胞運命をコントロールし、*in vitro* で高効率に外胚葉、神経上皮様細胞、頭脳神経堤細胞、末梢神経細胞をヒト iPS 細胞から誘導できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Suga M, Kii H, Ueda N, Liu YJ, Nakano T, Dan T, Uozumi T, Kiyota Y, Furue MK. A morphology-based assay platform for neuroepithelial-like cells differentiated from human pluripotent stem cells. *Int J. Dev Biol.* accepted, 2018, 査読有. DOI:10.1387/ijdb.180161mf

② Tashiro S, Le MNT, Kusama Y, Nakatani E, Suga M, Furue MK, Satoh T, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K. High cell density suppresses BMP4-induced differentiation of human pluripotent stem cells to produce macroscopic spatial patterning in a unidirectional perfusion culture chamber. *J Biosci Bioeng. Journal of Bioscience and Bioengineering* 126(3) 379-388 2018, 査読有.

DOI:10.1016/j.jbiosc.2018.03.007.

③ Fukuda T, Takayama K, Hirata M, Liu YJ, Yanagihara K, Suga M, Mizuguchi H, Furue MK. Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions. *Exp Cell Res.* 352(2), pp333-345, 2017, 査読有. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.02.022.

④ Yanagihara K, Liu Y, Kanie K, Okamura M, Hirata M, Fukuda T, Suga M, Nikawa H, Kato R, Furue MK. Prediction of differentiation tendency toward hepatocytes from gene expression in undifferentiated human pluripotent stem cells. *Stem cells and development.* 25(24), pp1884-1897, 2016, 査読有. DOI: 10.1089/scd.2016.0099

⑤ Mimura S, Suga M, Okada K, Kinehara M, Nikawa H, Furue MK. Bone morphogenetic protein 4 promotes craniofacial neural crest induction from human pluripotent stem cells. *Int J Dev Biol.* 60, pp21-26,

2016, 査読有.

DOI: 10.1387/ijdb.160040mk

[学会発表] (計 5 件)

① Mika Suga, Hiroaki Kii, Naoko Ueda, Takako Nakano, Yu-Jung Liu, Takayuki Uozumi, Tomoro Dan, Yasujiro Kiyota, and Miho K. Furue. Noninvasive Live Cell Imaging Assays for Toxicity Prediction Using Neuroepithelial-like Stem Cells Derived from Human iPS Cells. SOT2018 (国際学会) 2018 年

② 萱三佳, 三村純代、劉有容、中野貴子、二川浩樹、古江一楠田美保. ヒト iPS 細胞由来頭脳神経堤様細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法の構築に関する基礎的研究. 日本動物代替法学会第 30 回大会. 2017 年

③ Suga M., Mimura S., Okada K., Kinehara M., Nikawa H., and Furue MK. The Role Of The Signaling Factors On Differentiation Of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Crest Stem Cells. ISSCR 2016 ANNUAL MEETING (国際学会) 2016 年

④ Suga M., Kii H., Uozumi T., Kiyota Y, Furue MK. Development of a New Cell-based Assay Using Human ES/iPS Cell-derived Neural Stem Cells for Developmental Neurotoxicity (DNT) Testing. World Congress on In Vitro Biology (国際学会) 2016 年

⑤ Suga M., Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, Furue MK. Development of a new cell-based-assay using human ES/iPS cell derived neural stem cells for developmental neurotoxicity testing. 日本組織培養学会第 89 回大会 2016 年

[図書] (計 2 件)

① iPS 細胞の安全・高品質な作製技術～移植臓器の開発、創薬活用、量産技術など、臨床応用／産業化までのロードマップ～ 2016 年 ISBN : 978-4-86104-629-2

② Suga M and Furue MK. Neural Crest Cell Models of Development and Toxicity: Cytotoxicity Assay Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cranial Neural Crest Cell Model. *Developmental Toxicology* pp 35-48, Part of the Methods in Molecular Biology book series (MIMB, volume 1965) 査読有. DOI:10.1007/978-1-4939-9182-2_4

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅 三佳 (SUGA, Mika)

京都大学・iPS細胞研究所・特任研究員

研究者番号：00340448

(2) 研究分担者

金 美海 (KIM, Mie-Hae)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：30506449

古江 美保 (Furue, Miho)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・ヒト幹細胞応用開発室・研究リーダー

研究者番号：00340448