

令和元年6月11日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20074

研究課題名(和文) Neurogenin1による知覚神経前駆細胞への分化誘導法の確立とその応用研究

研究課題名(英文) Study for induction of sensory precursor neuron differentiation with Neurogenin1

研究代表者

下山 哲生 (Shimoyama, Tetsuo)

藤田医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：30748447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我が国における慢性疼痛の罹患者は2000万人以上存在しており、慢性疼痛の病態解明は重要な医学的・社会的課題である。慢性疼痛の病態研究には知覚神経細胞培養系が極めて有用であり、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)から知覚神経細胞への分化誘導を確実に行うことが出来れば、病態研究や薬剤スクリーニングに必要な知覚神経細胞を十分量得ることが出来る。そこで、ES細胞にEGFPを組み込み、Ngn1およびNgn2の発現を指標として、知覚神経細胞をFACSによって選択的に回収できる系の確立を目指した。また、複数の細胞増殖因子を細胞培養液に添加することで、知覚神経細胞の分化誘導を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛は多くの国民が罹患している疾病であり、重篤な場合には就学や就労に影響が出ることもある。本研究は、慢性疼痛の作用機序を解明するための研究を行う上で有用となる基盤を確立することを目的とする。本研究では、慢性疼痛の起こる仕組みを細胞レベルで解明するための方法の研究に取り組んだ。胚性幹細胞から知覚神経細胞を分化させ、効率的に集める方法の基盤を開発した。また、知覚神経細胞をより効率的に分化させる培養条件の検討を行い、複数の細胞増殖因子の組み合わせにより知覚神経細胞を分化誘導した。これらは慢性疼痛の発症機構の解明へとつながっていく成果である。

研究成果の概要(英文)：There are more than 20 million patients with chronic pain in Japan. It is really crucial to overcome chronic pain for healthy life. Culture system of sensory neurons should be useful for investigation into the mechanisms of chronic pain and drug screenings. To establish the culture system, constant provision of the sensory cells is needed. In the present study, to developed the method for selecting sensory neuron progenitor cells exclusively by fluorescence activating cell sorting, we have integrated EGFP genes as a reporter into allele of Ngn1 or Ngn2 genes in mouse embryonic stem cells using genome editing technique. We also induced the differentiation of sensory neurons from embryonic stem cells efficiently by addition of some growth factors.

研究分野：整形外科学

キーワード：疼痛 ES細胞 知覚神経細胞 neurogenin1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みとは、国際疼痛学会によると「組織の実質的あるいは潜在的な傷害に結びつくか、このような傷害を表す言葉を使って述べられる不快な感覚・情動体験」と定義される。本来は生体の異常や損傷を認識するための感覚であり、生物として生存する上で不可欠な仕組みである。しかし、この痛みが長期にわたって持続する場合(概ね3ヶ月以上)「慢性疼痛」として捉えられ、苦痛の大きな原因となる。

我が国における慢性疼痛の罹患者は、疫学調査によると全人口の15%以上(2000万人以上)であることが明らかとなっている。重度の場合では精神的ストレスの原因ともなりうるため、就学や就労に支障を来すという報告もある。そのような場合、社会活動性の低下や経済的問題などを引き起こし、その結果生活の質の低下を招くこととなる。したがって慢性疼痛の病態機構の解明およびその治療法の開発は、医学的にも社会的にも極めて重要な課題である。

慢性疼痛はその病態により分類がなされている。ひとつは「侵害受容性疼痛」であり、侵害刺激が長期にわたって加わり続けることに起因する。ふたつは「神経障害性疼痛」であり、中枢神経系や末梢神経系での疼痛に関わる機能の変化によると考えられている。さらには心理的要因などが関わる「心理社会的疼痛」も存在する。いずれにしても、神経系の何らかの異常や変動が慢性疼痛の原因と考えられる。しかし、慢性疼痛の詳細な病態機序についての理解は進んでいない。したがって慢性疼痛の発生する細胞学的分子生物学的な機構について解明することは、慢性疼痛を克服する上で極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

慢性疼痛は上述のように、神経系に見られるなんらかの異常・変異が原因と考えられる。そのため、体性感覚神経(知覚神経)細胞を培養し、さまざまな操作を加えることにより起こる変化を詳細に解析することができれば、慢性疼痛の病態を解析する上では有用な手段であると考えられる。しかしながら、知覚神経細胞を生体から採取することは、その採取量が制限されるため、培養系を用いて病態解析を継続的に行うことや、あるいは薬剤のスクリーニングを行うことは容易ではない。

胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、多分化能を保ちつつ、未分化状態を維持したまま自己複製することの出来る多能性幹細胞である。現在では、さまざまな方法でこれら多能性幹細胞から種々の細胞を分化誘導することが可能となりつつある。したがって、これら多能性幹細胞から知覚神経細胞を継続的に分化誘導できれば、慢性疼痛の病態解明の研究に用いることが可能となる。しかし、一般的にどのような分化誘導方法であっても、目的とする細胞種のみを分化誘導させることは容易ではなく、多くの場合は目的以外の細胞種が混在する。

知覚神経細胞が生体内で分化する過程では、遺伝子 Neurogenin1(Ngn1)および Neurogenin2(Ngn2)が知覚神経に分化する細胞で発現している。また、Ngn1 および Ngn2 のノックアウトマウスでは知覚神経細胞の形成が阻害される。これらのことから、Ngn1, および Ngn2 は知覚神経細胞分化過程に必須の遺伝子であると考えられている。したがって、神経細胞分化誘導系において、これら遺伝子を発現している細胞のみをセルソーターなどで回収できれば、ほぼ知覚神経前駆細胞のみを得ることが可能となる。そこで、Ngn1 および Ngn2 の遺伝子座に蛍光タンパク質 EGFP の遺伝子をノックインし、Ngn1/Ngn2 の発現を可視化できる ES 細胞の作成とソーティングによる濃縮化、および知覚神経細胞分化誘導系の開発を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞

理化学研究所バイオリソースセンターから提供されたマウス ES 細胞 EB5 (RBRC-AES0151)を実験に用いた。EB5 は 14tg2a より作成された ES 細胞であり、Pou5f1 遺伝子座に IRES-BSD-pA カセットを導入することにより、抗生物質 BlasticidinS 存在下で未分化細胞のみが維持される。

(2) 細胞培養

神経細胞への分化誘導は基本的に Eiraku et al (2008) によって開発された SFEBq 法に従って行った。分化誘導後の神経幹細胞を細胞分散液(Sumilon)で分散した後、Neurobasal 培地(B-27 添加)で培養した。

(3) ゲノム編集によるノックイン

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集にはベクター-pX330(addgene)を用いた。標的配列はウェブデータベースを使用した。ベクターの導入には Nucleofector 2b(Lonza)と Amaxa Mouse ES Cell Nucleofector Kit(Lonza)を用いた。

(4) 免疫組織化学および免疫細胞化学

胚様体を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、スクロース溶液で置換し、続いて O.C.T. Compound に包埋、凍結切片を作成した。一次抗体として抗 GFP 抗体を、二次抗体として抗ウサギ抗体 Alexa568 を作用させた。

分散培養した神経幹細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、一次抗体、二次抗体を作用させた。観察には蛍光顕微鏡を用いた。

(5) 定量 PCR

定量 PCR は Thunderbird qPCR Master Mix (Toyobo) および 7900HT (ABI) で実施した。

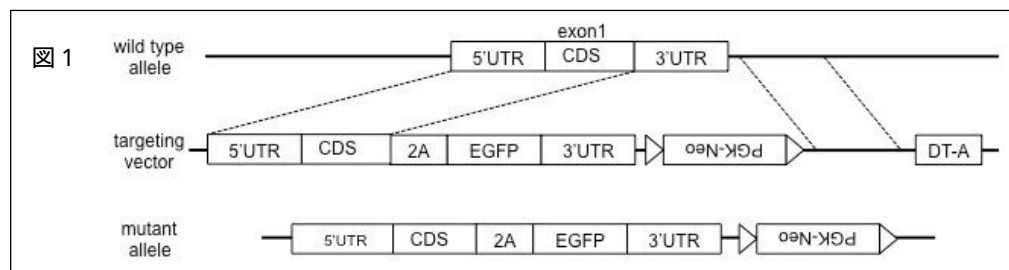
(6) セルソーティング

セルソーティングは Astirios (Beckman Coulter) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) Ngn1, Ngn2 の発現を可視化するための ES 細胞の作成

知覚神経細胞に分化する細胞で Ngn1 と Ngn2 が一過的に発現することが、知覚神経形成に必須であると考えられている。SFEBq 法において Ngn1 と Ngn2 の発現を定量 PCR で調べたところ、Ngn1 は培養開始 8 日目の胚様体で、Ngn2 は 10 日目の胚様体で一過的に発現上昇していることを見出した。そこで、神経分化誘導したのち、Ngn1 を発現している細胞を選別するため、Ngn1 の発現を蛍光で可視化できる ES 細胞の作成に着手した。そのような ES 細胞を作成するため、ゲノム上の Ngn1 遺伝子の下流に 2A-EGFP 配列を導入することとした。このノックインでは以下のようなターゲティングベクターを作成した。

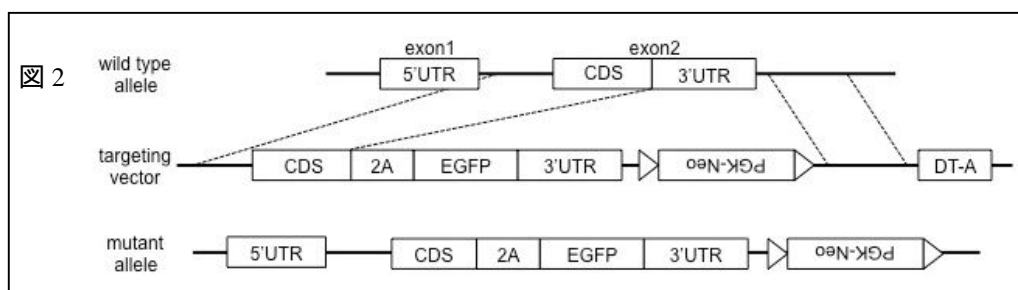


ゲノム編集のための Cas9 標的配列はウェブデータベースを用いて決定した (CRISPRdirect, CRISPOR)。標的配列を pX330 に組み込み、ターゲティングベクターと共に EB5 にトランスフェクトした。G418 の添加によってノックイン細胞を選別し、続いて PCR によって正しいゲノム領域に挿入されていることを確認した。

つづいて SFEBq 法で胚様体を作成し、8 日目およびその前後の時期において EGFP の発現を観察したところ、確認されなかった。定量 PCR で Ngn1 の発現を確認したところ、発現上昇は認められなかった。Ngn1 近傍のゲノム配列に異常は認められなかったため、ゲノム編集時に於けるなんらかの理由により、Ngn1 の発現機構が影響を受けたと考えられる。

したがって、当初の計画から、Ngn2 の発現を可視化することに方法を変更することとした。上述したように、Ngn2 もまた知覚神経細胞分化過程において必須の遺伝子であるため、Ngn1 から Ngn2 への変更は問題ないと判断した。また、胚様体に於ける Ngn2 の発現上昇率は Ngn1 のそれよりも高いことも定量 PCR により確認した。

Ngn2 用のターゲティングベクターの作成、Cas9 標的配列の決定、および pX330 コンストラクトの作成は、Ngn1 の場合と同様の手法を用いて行った。pX330 とターゲティングベクターを EB5 に共トランスフェクトし、G418 によりノックイン細胞を選別した。続いて PCR により、正しい領域に挿入されているクローンを選別し、シーケンス解析により Ngn2 遺伝子座およびその周辺に予期しない変異のないことを確認した。



SFEBq 法を用いて形成した胚様体に於ける遺伝子発現を調べたところ、ノックイン前の EB5 と同様に、Ngn2 は 10 日目に最も発現量が上昇していた。EGFP も Ngn2 と同様の発現変化を示したことから、Ngn2 と EGFP は 2A を挟んで同一プロモーターの制御下で共発現していると考えられた。また、抗 GFP 抗体で免疫染色を行ったところ、胚様体周縁部に EGFP タンパクの分布が確認された。ノックイン細胞で作成した胚様体を用いてセルソーティングを行ったところ、EGFP 陽性の細胞集団が検出された。今後は、作成したノックイン ES 細胞の特性をさらに検証しつつ、知覚神経分化誘導系の確立を目指し疼痛機構の研究につなげていく。

(2) 知覚神経細胞分化誘導系

ES 細胞から知覚神経細胞をより効率的に分化誘導するための培養条件を検討した。知覚神経細胞を含む脊髄神経節は体幹部で形成されるので、SFEBq 法で胚様体を作成する際に後分化因子として機能するレチノイン酸を培地に添加したところ、体幹で発現する Hox 遺伝子の発現が上昇した。さらに、背側化の効果を持つとされる細胞増殖因子を添加して培養を継続したところ、知覚神経細胞の分子マーカーである Pou4f1 と Prph の発現の上昇が定量 PCR で認められた。また、免疫染色によっても両遺伝子産物の存在が観察された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Shimoyama T., Katagiri H., Harada H., Murata H., Wasa J., Hosaka S., Suzuki T., Takahashi M., Asakura H., Nishimura T., Yamada H. Fracture after radiation therapy for femoral metastasis: incidence, timing and clinical features. *Journal of Radiation Research*. 58: 661-668 (2017), doi: 10.1093/jrr/rrx038. (査読有)
- (2) 下山哲生、鈴木拓、辻村俊造、船橋拓哉、志津香苗、鈴木克侍 上肢発生の原発性骨軟部腫瘍の検討 *日本手外科学会雑誌* 33(3):274-277 (2016) (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 下山哲生、石村大輔、林卓馬、山田治基、伊藤正之、伊藤文隆、林真也、外山宏 四肢骨骨転移に対する放射線治療後骨折の臨床的特徴 *日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会* (2018)
- (2) 前田篤志、石村大輔、下山哲生、林卓馬、山本康洋、山田治基 慢性膿胸に合併した胸壁腫瘍の 1 例 第 127 回中部日本整形外科災害外科学会 (2016)
- (3) 石村大輔、山本康洋、下山哲生、林卓馬、山田治基 胸壁再建術を行った胸壁腫瘍 7 例の検討 第 49 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。