

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590233

研究課題名(和文) 神経堤細胞発生をモデルとした上皮-間葉系転換(EMT)メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) mechanism by utilizing neural crest cell generation model.

研究代表者

本橋 力(MOTOHASHI, Tsutomu)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40334932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮-間葉系転換(EMT)で発現する転写因子Sox10を蛍光タンパク質で標識した遺伝子改変ES細胞とマウスを利用して、EMT現象が起こる際に発現が上昇する遺伝子を明らかにした。これらの遺伝子のうち、EMTを亢進させる転写因子を見出した。また、糖タンパク質Galectin-1が神経堤細胞発生を亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified the up-regulated genes in epithelial-mesenchymal transition (EMT) by utilizing the embryonic stem cells and mice, where the expression of Sox10 can be visualized with a fluorescent protein. Among these genes, we found the transcription factors that enhanced EMT. In addition, we found that glycoprotein Galectin-1 enhanced neural crest cell generation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般

キーワード：上皮-間葉系転換 神経堤細胞 転写因子Sox10 ES細胞 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

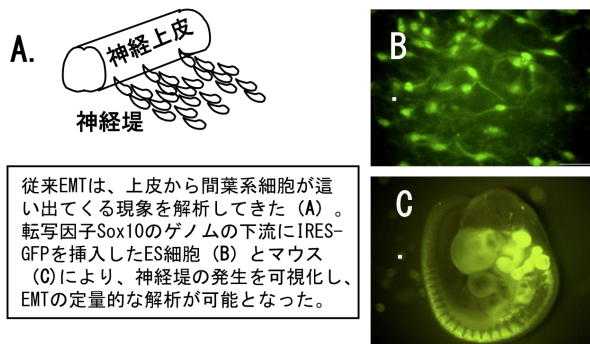
上皮-間葉系転換 (EMT) は上皮細胞が間葉系細胞に転換する現象であり、生物の組織や臓器の形成に非常に重要なプロセスである。また、細胞が幹細胞性を獲得する際に EMT が非常に重要な働きをしていることも報告されている。EMT に関しては現在まで様々な解析が行われているが、それらは現象の観察にとどまり、しかも EMT を起こした細胞の単離は非常に難しく、機能的な解析が行われてきたとは言い難い。私たちは、EMT 現象を蛍光発光によって観察できる遺伝子改変 ES 細胞、遺伝子改変マウスを独自に開発し、これらを駆使すれば、EMT 現象を定量的かつ機能的に解析することが可能となり、その詳細なメカニズムを明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

私たちは、EMT 現象を試験管内で観察できる実験系として、マウス ES 細胞を神経堤細胞に誘導できる培養系を開発した。また、生体内で EMT を観察できる実験系として、Sox10-IRES-GFP マウスを作成した (図 1)。このマウスでは、神経堤細胞に発現する転写因子 Sox10 が蛍光タンパク質で標識されているため、神経堤細胞を生体内で観察することができる。これらの実験系によって、最も典型的な EMT 現象である神経堤細胞発生を生体の内外から研究する事が可能となった。この実験系を利用し、以下の二つの面から EMT を明らかにしようと考えた。

1. 生体から神経堤細胞を純化し、EMT 発生時の分子を明らかにする。
2. 試験管内、生体内の両面から EMT のメカニズムを検証する。

図 1

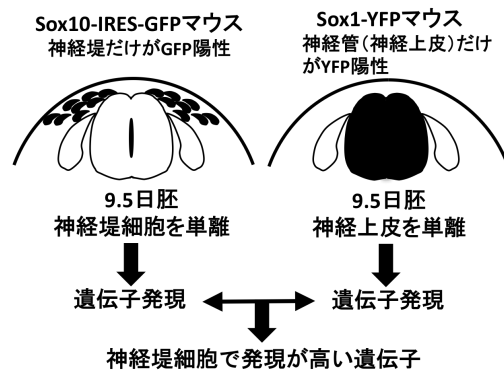


3. 研究の方法

(1) 神経堤細胞に発現する分子の探索

Sox10-IRES-GFP ES 細胞の神経堤細胞への分化誘導系及び同 ES 細胞より作成した遺伝子改変マウス胚から、発生時の神経堤細胞をセルソーターで分離し、発現する遺伝子の網羅的解析を行う。解析では、神経堤細胞で発現する遺伝子とその起源である神経管で発現する遺伝子とを比較することで、神経堤細胞での発現上昇がみられる遺伝子を抽出する (図 2)。

図 2



(2) 神経堤細胞分化誘導系を用いた遺伝子導入・障害実験

明らかにした遺伝子に関して、ES 細胞の神経堤細胞分化誘導系で遺伝子導入・障害実験を行い、EMT 現象の亢進あるいは障害を観察する。遺伝子導入実験ではウイルスシステムによる過剰発現を行い、遺伝子障害実験では shRNA を用いた遺伝子発現阻害を行う。解析には、Sox10-IRES-GFP ES 細胞と神経堤細胞分化誘導系を用い、Sox10 (GFP) 陽性細胞の増加・減少をフローサイトメーターで解析する事により、EMT の発生を定量的かつ精密に解析する。

4. 研究成果

(1) 神経堤細胞に発現する分子の探索

Sox10-IRES-GFP ES 細胞と遺伝子改変マウス胚を利用して、神経堤細胞で発現上昇がみられる遺伝子の抽出を行った。この解析によって転写因子、成長因子、レセプター型分子など様々な遺伝子が明らかにできた。これら遺伝子群の中から転写因子に注目し、その発現パターンや文献調査により 33 個の転写因子を選び出した。

(2) 神経堤細胞分化誘導系を用いた遺伝子導入・障害実験

研究 (1) で明らかにした転写因子全てを試験管内での EMT 誘導系にレトロウイルスを用いて発現させると、コントロールに比べて

Sox10 (GFP) の発現が上昇することが観察された。さらに、転写因子を個々に試験管内の EMT 誘導系で過剰発現させることで EMT 現象を制御している転写因子の同定を試みたところ、これらの転写因子のうち少なくとも 3 種類で、Sox10(GFP) の発現を有意に上昇させることが確認できた。さらに、これらの転写因子をマウスから単離した上皮細胞に導入しても、Sox10 (GFP) の発現を有意に上昇させることが確認でき、EMT 現象を亢進させている可能性を見出した。これらの転写因子の EMT 現象内での詳細な働きは今後解析を計画している。

一方、研究(1)の結果から、糖タンパク質 Galectin-1 が神経堤細胞発生時に高発現していることも見出した。Galectin-1 をマウス Sox10-IRES-GFP ES 細胞の神経堤細胞への分化誘導系に添加すると、神経堤細胞の誘導効率 (Sox10 陽性細胞率) が有意に上昇していることが明らかになった (図 3)。経時的な Galectin-1 添加実験により、分化誘導の初期と後期に神経堤細胞の誘導を亢進させていることが明らかになり、RT-PCR の結果により、分化初期では ES 細胞から神経系への誘導を亢進し、分化後期では神経系から神経堤細胞の誘導を亢進していることがわかった。マウス胎仔から採取した神経管の培養系に Galectin-1 を添加した場合でも、神経堤細胞の誘導が亢進されることが明らかになった (図 4)。以上より、Galectin-1 が神経堤細胞発生を正に制御していることを明らかにした。

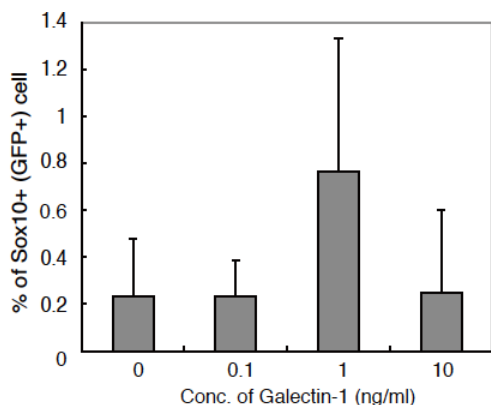


図 3: マウス Sox10-IRES-GFP ES 細胞の神経堤細胞分化誘導系に Galectin-1 添加し、フローサイトメーターで Sox10 陽性細胞の割合を解析した。1 ng/mL 添加で有意に上昇がみられた。

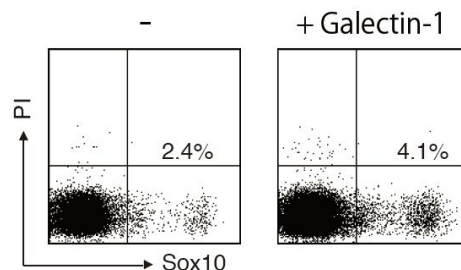


図 4: マウス胎仔から採取した神経管の培養系に Galectin-1 を添加し、フローサイトメーターで Sox10 陽性細胞の割合を解析した。Galectin-1 添加により神経堤細胞の誘導が亢進した。

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)

Tsutomu Motohashi, Daisuke Kitagawa, Natsuki Watanabe, Takanori Wakaoka, Takahiro Kunisada.

Neural crest-derived cells sustain their multipotency even after entry into their target tissues. *Developmental Dynamics*. 243, 368-380, 2014. 査読有

Hitomi Aoki, Akira Hara, Tsutomu Motohashi, Takahiro Kunisada.

Keratinocyte Stem cells but not Melanocyte Stem cells are the primary target for Radiation-induced Hair Graying. *Journal of Investigative Dermatology*. 133, 2143-2151, 2013. 査読有

Takanori Wakaoka, Tsutomu Motohashi, Hisamitsu Hayashi, Mitsuhiro Aoki, Keisuke Mizuta, Takahiro Kunisada, Yatsuji Ito.

Tracing Sox10-expressing cells elucidates the dynamic development of the mouse inner ear. *Hearing Research*. 302, 17-25, 2013. 査読有

Naoko Yoshimura, Tsutomu Motohashi, Hitomi Aoki, Ken-ichi Tezuka, Natsuki Watanabe, Takanori Wakaoka, Takumi Era, Takahiro Kunisada.

Dual origin of melanocytes defined by Sox 1 expression and their region-specific distribution in mammalian skin. *Development, Growth & Differentiation*. 55, 270-281, 2013. 査読有

Tsutomu Motohashi, Katsumasa Yamanaka, Kairi Chiba, Kentaro Miyajima, Hitomi Aoki, Tomohisa Hirobe, Takahiro Kunisada.

Neural crest cells retain their capability for multipotential differentiation even after lineage-restricted stages. *Developmental Dynamics*. 240, 1681-1693, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

西岡 真弘、本橋 力 (2013) Galectin-1 promote the development of Neural crest cells. 日本分子生物学会 第36回年会 12月4日(神戸)

渡邊奈月、本橋 力 (2013) Notch signal play a role in the multipotency of melanoblast. 第25回日本色素細胞学会学術大会 11月16日(大阪)

Tsutomu Motohashi (2013) Neural Crest-Derived Cells sustain the multipotency even after intrusion into the tissues. 日本発生生物学会 第46回大会 5月31日(松江)

Natsuki Watanabe, Tsutomu Motohashi (2013) Notch signal play a role in the multipotency of melanoblast. 日本発生生物学会 第46回大会 5月29日(松江)

渡邊奈月、本橋 力 (2013) 色素芽細胞のもつ多分化能における Notch シグナル. 第12回日本再生医療学会総会, 3月21日(横浜)

若岡敬紀、本橋 力 (2012) 内耳幹細胞の分離及びその分化能の解析 第11回日本再生医療学会総会 6月12日(横浜)

Tsutomu Motohashi (2012) Novel genes of neural crest cells generation elucidated by gene expression analysis. 日本発生生物学会 第45回大会 5月30日(神戸)

若岡 敬紀、本橋 力 (2012) Sox10-IRES-GFP マウスを利用した内耳発生の解析 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会 5月9日~12日(新潟)

Daisuke Kitagawa, Tsutomu Motohashi (2011) Gene expression analysis of Neural crest cells in their early developmental stage. 日本分子生物学会 第34回年会 12月13日(横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/saisei/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 力 (MOTOHASHI, Tsutomu)

岐阜大学・医学系研究科・講師

研究者番号：40334932

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

若岡 敬紀 (WAKAOKA, Takanori)

岐阜大学・大学院医学系研究科・大学院生

研究者番号：なし

北川 大祐 (KITAGAWA, Daisuke)

岐阜大学・大学院医学系研究科・大学院生

研究者番号：なし