

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390411

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞から顎骨・歯への分化誘導カスケードの解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying craniofacial development from embryonic stem cells

研究代表者

古江 美保 (FURUE, MIHO)

独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・研究リーダー

研究者番号：80257310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：顎顔面の発生・分化機構の解明を目標として、ヒト多能性幹細胞(hPSCs)から外胚葉、神経上皮、神経堤、頭部神経堤へと分化誘導を行った。その結果、hPSCsは自発的に神経細胞へと分化するが、その分化はFGF-2とアクチビンにより複雑な分化制御が行われていることが明らかとなった。さらに、種々の増殖因子やインヒビターを組み合わせることで神経堤、頭部神経堤へと誘導できた。以上の結果から、顎顔面領域の発生過程の分子機構を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanisms underlying craniofacial development, we promoted cell differentiation of human pluripotent stem cells (hPSCs) into ectoderm, neural epithelium, and anterior neural crest. At first, we have provided evidence that fibroblast growth factor-2 and Activin A synergistically regulated the initiation of hPSC differentiation into neural cell lineages even though hPSCs autonomously differentiate into neural cell lineages. Further, we developed a differentiation protocol for anterior neural crest induction using several growth factors and inhibitors, suggesting the mechanisms underlying craniofacial development.

研究分野：幹細胞生物学

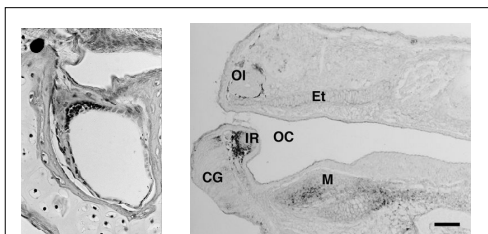
キーワード：幹細胞 神経堤 ヒト多能性幹細胞 ヒト胚性幹細胞 無血清培養 頭部神経堤 発生

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞と iPS 細胞について ヒト胚性幹 (ES) 細胞ならびに人工多能性幹 (iPS) 細胞は体のあらゆる組織の細胞に分化する能力を持っており、*in vitro* で発生のメカニズムを解明するツールとして近年注目を浴びている。

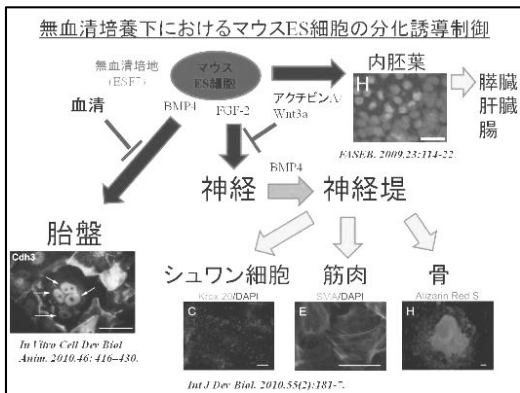
無血清培地について 申請者は、2005 年にマウス ES 細胞用無血清培地を開発し (特許、製品化) 英国・シェフィールド大学幹細胞生物センター・P.W.Andrews 教授らとともに、2008 年にヒト ES 細胞用の無血清培地を開発した (2006 年 特許)。さらに動物由来成分を含まない無血清培地へと改変 (特願) を行い、薬効評価、毒性評価、発生機構解明へ応用するための準備を整えてきた。

顎と歯の誘導について 脊椎動物において歯は外胚葉から生じると考えられていたが、近年、外胚葉と内胚葉の混合したものから発生することが明らかになった。申請者は、アフリカツメガエル・アニマルキャップを高濃度のアクチピンにて処理を行い内胚葉を誘導したものと未処理のものを混合することにより、下顎、歯を誘導することに成功した。



左:アニマルキャップから誘導したアメロジェニン陽性の歯胚 右:幼生において下顎に *goosecoid* の発現が確認された。

マウス ES 細胞からの神経堤誘導について 上記の結果を受けて、無血清・単層培養下、FGF-2 と BMP-4 を適切なタイミングで処理することにより神経堤細胞への分化誘導に成功した。誘導した神経堤細胞群は骨芽細胞ならびに軟骨細胞用分化培地を用いて分化誘導を行うと、それぞれ骨、軟骨に分化することを確認した。



以上のことから、ヒト ES/iPS 細胞を用いてヒト頭部神経堤を分化誘導し、その発生過

程を *in vitro* で再現することにより、分化機構を明らかにすることを目標とした。

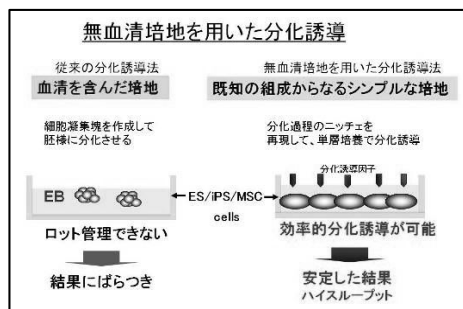
2. 研究の目的

ヒト神経堤由来組織の発生・分化機構を明らかにすることを目標として、ヒト ES/iPS 細胞などの多能性幹細胞から外胚葉、前方神経上皮、頭部神経堤に分化誘導を行い、顎・歯への分化誘導カスケードを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

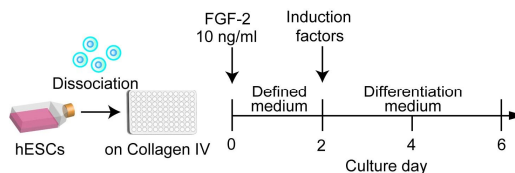
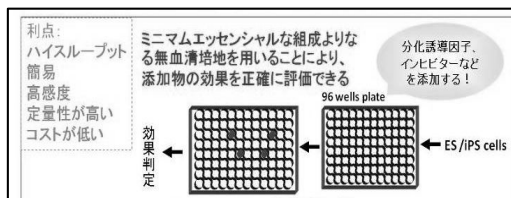
手順として、(i)未分化なヒト ES/iPS 細胞から外胚葉への高効率な分化誘導 (ii) 前方神経上皮の誘導 (iii) 頭部神経堤の誘導を行い、頭部神経堤の分化誘導カスケードの検討を行った。

(i)ヒト ES/iPS 細胞から外胚葉への高効率の分化誘導



ヒト ES/iPS 細胞からの分化誘導は、胚様体 (Embryoid Body; EB) と言われる胚の発生を模倣させる細胞凝集塊を作成するのが一般的な方法である。この方法は確実に分化誘導できるが *in vivo* と同様に内部の解析は困難である。未分化なヒト ES/iPS 細胞から分化する過程ではダイナミックに形態を変化させることから、単層培養での分化誘導により得られる情報は多い。マウス ES 細胞から単層培養下に神経堤誘導に成功している。そこで、まずは、二次元無血清培養法による外胚葉への分化誘導プロトコルの作成を行った。

96 ウェルプレートに種々の細胞外マトリ

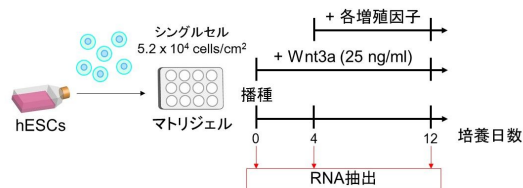


ックスをコートし、hESF8different 培地 (申請者が開発したヒト ES 細胞分化用無血清培地)

にて ES/iPS 細胞を播種。各ウェルに増殖因子(FGF ファミリー、TGF- β ファミリー、EGF, PDGFAA, AB, BB など)、を添加し、外胚葉マーカーに対する抗体を用い反応させスクリーニングを行った。

(ii) 神経堤誘導

Menendez らの分化誘導法を用いて神経堤細胞へ分化誘導を行った(Menendez et al. PNAS. 108:19240-19245(2011))。細胞をシングルセルに分散し、マトリジェルコートしたマルチウェルプラスチックプレートに細胞を播種した。分化誘導培地は、DMEM/F12 培地に、牛血清アルブミン (2%, Life Technologies) L-アラニル-L-グルタミン (2mM, 和光純薬, 大阪) MEM 非必須アミノ酸溶液 (1%) trace elements A (1000X, Cellgro, Mediatech, Herndon, Virginia, USA) trace elements B (1000X, Cellgro) trace elements C (1000X, Cellgro) 2-メルカプトエタノール (0.1 mM) トランスフェリン (10 μ g/ml, Sigma) L(+)-アスコルビン酸ナトリウム塩 (50 μ g/ml, 和光純薬) Heregulin -1 (10 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) LONGR3 IGF-1 (200 ng/ml, Sigma) FGF-2 (8 ng/ml, R&D Systems) SB431542 (20 μ M, Tocris bioscience, Ellisville, MO, USA) Wnt3a (25 ng/ml, R&D Systems) を添加したものをを用いた。5%CO₂/95%気相下、37 $^{\circ}$ C で培養し、毎日培地交換を行った。なお、Menendez らは Wnt3a を使用せず、2 μ M の BIO を用いているが、本研究では、生体内での細胞ニッチを明らかにするため、化合物の BIO ではなく Wnt3a を用いた。また、Menendez らの 2013 年の論文(Menendez et al. 2013)では、未分化維持培地で播種しサブコンフルエントになったときに上記の分化誘導培地で継代を行う方法となっているが、本研究では継代が細胞に与える影響を除くため播種時から分化誘導培地を用いて分化誘導を行った。



(iii) 頭部神経堤誘導

上記の結果を受けて、頭部神経堤へ誘導するため、種々の増殖因子やインヒビターを添加して、位置情報の発現をカスタム PCR アレイならびに Hox ライブラリーアレイを用いて、検討した。

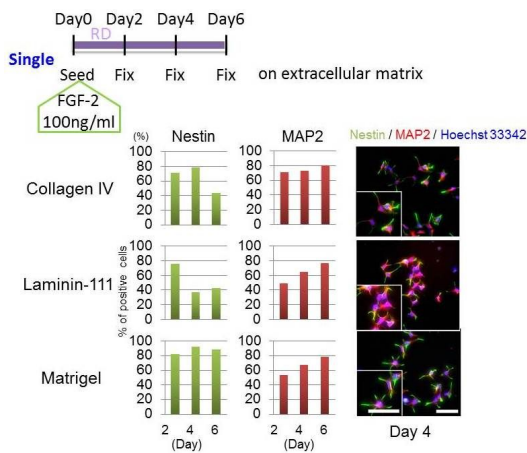
4. 研究成果

二次元無血清培養下における神経上皮細胞への分化誘導

本研究では、申請者の先行研究であるマウス ES 細胞から神経堤細胞への分化誘導法 (Aihara et al. Int. J. Dev. Biol. 54: 1287-1294 (2010))を改良し、ヒト ES 細胞から神経細胞へ分化誘導を行った。マウス ES 細胞から神経上皮細胞への分化誘導の際、マウス ES 細胞の未分化維持用無血清培地 ESF7 から、オレイン酸 脂肪酸不含牛血清アルブミンと LIF を除いた ESF5 培地 (Furue et al. In vitro Cell Dev Biol Anim 41: 19-28. (2005))を用いていた。この先行研究をもとに、hESF9 培地から、未分化維持に關与するオレイン酸 脂肪酸不含牛血清アルブミンやヘパリンを除き、ヒト ES 細胞 H9 細胞株から神経外胚葉へ分化誘導を試みたところ、細胞接着が低下し、また細胞生存率が減少し、効率の良い分化誘導を行えなかった。そのため、播種時から培養 2 日目までは、hESF9 培地を用いて培養し、細胞外マトリックスがヒト ES 細胞から神経外胚葉への分化誘導に与える影響について検討した。

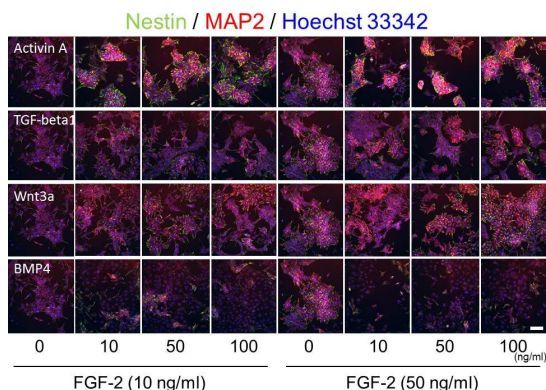
IV 型コラーゲン、マトリジェルまたはラミニンでコートしたプラスチックプレートに、10 ng/ml の FGF-2 を含んだ hESF9 培地を用いて H9 細胞を播種した。培養 2 日目に、100 ng/ml の FGF-2 を添加した分化誘導培地を播種した培地と等量加え、さらに 2 日間培養を行った。培養 0、2、4、6 日目の細胞からトータル RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を用いて、神経分化マーカー Nestin ならびに MAP2 遺伝子の mRNA 発現を測定した。

IV 型コラーゲン上で培養した細胞は培養 4 日目まで Nestin の発現が維持されたがラミニン上では 4 日目には神経幹細胞マーカー Nestin の発現が低下した。また、神経マーカー MAP2 は、マトリジェルならびにラミニン上では徐々に発現が上昇したが、IV 型コラーゲン上では培養 2 日目から発現が高く維持された。さらに、各マトリックス上で 4 日間分化誘導した細胞における Nestin および MAP2 のタンパク発現を蛍光免疫染色により検討した。イメージアナライザーを用いて各マーカー発現の陽性率を解析したところ、IV 型コラーゲン上で分化誘導した細胞は全体の 31.9 \pm 6.2%の細胞が神経幹細胞マーカーである Nestin 陽性となり、ラミニンやマトリジェル上で分化誘導した細胞に比較して最も高い割合となった。また、MAP2 の発現についても、IV 型コラーゲン上での細胞はラミニン上での細胞 (やマトリジェル上での細胞に比較して最も高い割合となった。以上の結果から、全て既知因子で構成される無血清培地 hESF9 培地および分化誘導培地を用いてヒト ES 細胞から神経外胚葉への分化を行う際には、IV 型コラーゲンが有用であることが示された。

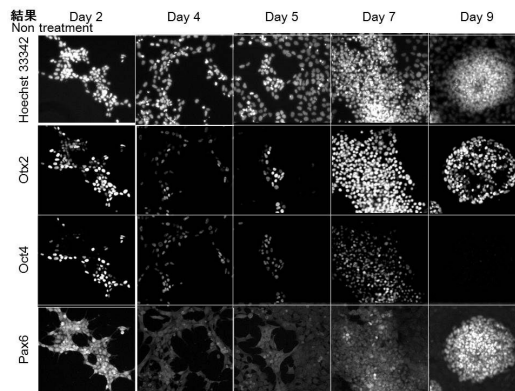


各種増殖因子の神経初期分化マーカーの発現に与える影響

IV型コラーゲンでコートした24ウェルプレートに細胞を播種し、FGF-2およびActivin ATGF-beta, Wnt3a, BMP4を種々の濃度で添加した分化誘導培地で培養し、NestinならびにMAP2に対する抗体を用いて発現を解析した。その結果、TGF-betaやBMP4はNestinやMAP2の発現を抑制した。Wnt3Aは顕著な効果は認められなかった。Nestin陽性細胞の割合はFGF-2の濃度依存的に増加し、Activin Aの濃度依存的に減少した。しかし、50または100 ng/mlのActivin A存在下でNestin陽性細胞の割合がわずかに増加する傾向にあった。また、MAP2陽性細胞の割合は、FGF-2の濃度依存的に増加し、Activin Aの濃度依存的に減少したが、50または100 ng/mlのActivin A存在下ではわずかに増加する傾向にあった。以上の結果から、神経外胚葉への細胞分化に対して、FGF-2は濃度依存的に神経外胚葉分化をわずかに促進し、Activin Aは抑制するが、FGF-2存在下で高濃度のActivin Aを添加することによりわずかに分化を促進した。以上のことからFGF-2とActivin Aは相互作用を行いながら、神経外胚葉分化に対して濃度依存的な影響を与えることが示唆された。

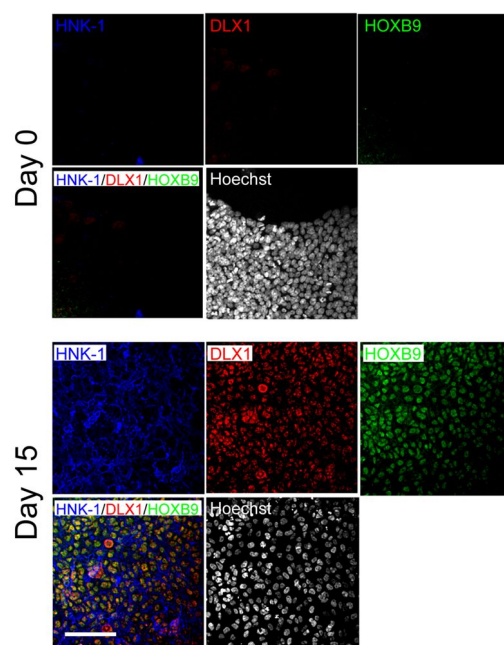


さらに、前方マーカーであるOTX2、神経マーカーであるPAX6に対する抗体を用いて検討を行ったところ、培養7日目に一時的にOTX2の発現が上昇しており、同条件で頭部神経領域が誘導されていることが示唆された。



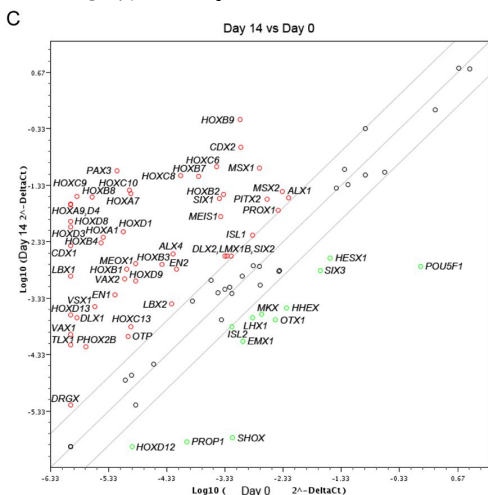
神経堤分化誘導

MenendezらがヒトES細胞からの神経堤分化誘導法(Menendez et al. 2011)を報告している。そこで、彼らの方法を用いて、15日間分化誘導を行い、誘導された細胞が神経堤細胞であるかを検証した。培養0日目の細胞と、培養15日目の細胞について、神経堤細胞で発現するHNK-1、頭部神経堤細胞で発現するDLX1、体幹部神経堤で発現するHOXB9に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、神経堤細胞の表面マーカーであるHNK-1の発現は培養0日目の細胞では認められなかったが、培養15日目の細胞では全体の79.2%の細胞で認められ、神経堤細胞に分化していることが示された。また培養0日目の細胞では、DLX1、HOXB9の発現はともに認められなかった。一方で、培養15日目の細胞においては、95%以上の細胞がDLX1を発現しており、91.0%の細胞がHOXB9を発現し、約70%の細胞がDLX1とHOXB9を共発現していた。これらの結果から、15日間分化誘導した神経堤細胞では位置情報決定に關与する遺伝子が発現しているものの、前方化・後方は制御されていないことが明らかとなった。



HOX遺伝子の発現プロファイル解析

上記で得られた神経堤細胞の位置情報関連遺伝子の発現を見るため、14日間分化誘導を行い、ヒト HOX 遺伝子 PCR アレイを用いて、培養0日目、7日目、14日目の細胞における84個のHOX遺伝子の発現を解析した。この結果から、Menendezらの神経堤誘導法により神経堤細胞へは誘導されるが、特定の位置情報を持つ神経堤細胞を誘導することはできず、頭部神経堤細胞を特異的に誘導するには誘導条件を変更する必要があることが示唆された。



頭部神経堤誘導

MenendezらがヒトES細胞からの神経堤分化誘導法を改良し、頭部神経堤への誘導を試みた。その結果、P75陽性細胞集団はやや減少するもののMSXやDLXが発現する細胞集団は増加し、頭部神経堤が誘導されたことが示唆される。そこで、同細胞の軟骨分化誘導ならびに骨分化誘導を行ったところ、軟骨ならびに骨の誘導が再現できた。以上の結果から、ヒト多能性幹細胞から頭部骨格成分を誘導するポテンシャルを持つ頭部神経堤を誘導することができた。今後さらに、遺伝子発現を詳細に解析する予定である。

尚、本研究は基盤C「神経の初期発生におけるニッチの解析」と連携しながら研究を行なった。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計7件)

原著論文

1. Mimura S, Suga M, Liu Y, Kinehara M, Yanagihara K, Ohnuma K, Nikawa H, Furue MK. (2015) Synergistic effects of FGF-2 and Activin A on early neural differentiation of human pluripotent stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. doi:10.1007/s11626-015-9909-8 査読有
2. Suga M, Kii H, Niikura K, Kiyota Y, Furue MK. (2015) Development of a Monitoring Method for Nonlabeled Human Pluripotent Stem Cell Growth by Time-Lapse Image Analysis. *Stem Cells Transl Med*. doi: 10.5966/sctm.2014-0242 査読有

3. Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Onuma Y, Chan T, Michiue T, Furue MK, Asashima M. (2014) Enzyme-free passage of human pluripotent stem cells by controlling divalent cations. *Sci Rep*. 4:4646. doi: 10.1038/srep04646. 査読有
4. Kinehara M., Kawamura S., Mimura S., Suga M., Hamada A., Wakabayashi M., Nikawa H., Furue MK. (2014) Protein Kinase C-induced Early Growth Response Kinase C-induced Early Growth Response Protein-1 Binding to SNAIL Promoter in Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*.15;23(18): 2180-9. 査読有
5. Kinehara M., Kawamura S., Tateyama D., Suga M., Matsumura H., Mimura S., Hirayama N., Hirata M., Uchio-Yamada K., Kohara A., Yanagihara K., and Furue MK.(2013) Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. *PLoS One*. 8(1): e54122. 査読有

その他

6. 古江 楠田美保. (2015). “本当に知ってる？正しい細胞培養の手法” その2. あなたも細胞を混ぜてませんか？PHARM TECH JAPAN. 31(8): 37-40.
7. 古江 楠田美保. (2015). “本当に知ってる？正しい細胞培養の手法” その1. トリプシン、正しく使ってますか？PHARM TECH JAPAN. 31(6): 89-91.

【学会発表】(計26件)

国際学会シンポジウムなど

1. Furue MK A growth factor defined serum-free culture condition for human pluripotent stem cells toward the development of pharmaceutical application. JAACT2012 名古屋国際会議場 2012年11月27-30日(名古屋)

国内学会特別講演・シンポジウムなど

2. 古江-楠田美保 臨床応用を目指した多能性幹細胞用培地の品質管理 iPS細胞ビジネス協議会 2014年11月26日 京都リサーチパーク(京都)
3. 古江-楠田美保 再生医療に果たす工学の役割 - ヒト多能性細胞の培養において求めてられるマテリアル - 第64回日本歯科理工学会 2014年10月4日-5日 アステールプラザ(広島)
4. 古江-楠田美保 ヒト多能性幹細胞の品質管理と精度管理 第41回日本毒性学会学術年会 2014年7月2日-4日 神戸コンベンションセンター(兵庫)

国際学会：一般講演

5. Suga M, Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, Furue MK. Establishment of a noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. ISSCR 12th Annual Meeting 2014.6.18-21 (Vancouver, Canada)
6. Yanagihara K, Okamura M, Kanie K, Kato R, Furue MK. Prediction of differentiation tendency of human pluripotent stem cells toward endoderm International Society for Stem Cell Reserch (ISSCR) 12th Annual Meeting, 2014.6.18-21 (Vancouver, Canada)
7. Mimura S. Prospect of Neural Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells for Application of in Vitro Developmental Toxicity Test. The 2012 World Congress on In Vitro Biology.2012.6.3-7 The Hyatt Regency (Bellevue Wasington,USA)

国内学会：一般講演

8. 木根原 匡希、河村 卓、二川 浩樹、古江-楠田 美保. "ヒト胚性幹細胞の上皮間葉移行に関する転写因子 EGR1 の同定" 第 85 回日本組織培養学会. 2012年5月17-18日 京都大学百周年時計台記念館 百周年記念ホール(京都)
9. 三村純代. ヒト多能性幹細胞を用いた神経発生毒性評価への応用の可能性 第 12 回日本再生医療学会総会 2013年3月21日-23日 パシフィコ横浜(神奈川)
10. 松本尚悟、中尾広美、野中元裕、川端健二、古江-楠田美保、滝島佑人、豊田英尚、川寄伸子、川寄敏祐 ヒト iPS/ES マーカーとしての新規糖鎖認識抗体第 86 回日本生化学会大会 2013年9月11-13日 パシフィコ横浜(神奈川)
11. 三村純代、菅三佳、二川浩樹、古江-楠田美保 ヒト多能性幹細胞の単層無血清培養下における神経分化誘導法の開発 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会 2013年11月23-24日 日本歯科大学 生命歯学部 九段ホール(東京)
12. 岡村美菜子、柳原佳奈、Shandar Ahmad、劉有容、平田みつひ、水口賢司、二川浩樹、古江-楠田美保 ヒト多能性幹細胞から内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株の選択方法 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会 2013年11月23-24日 (東京)
13. Yanagihara K, Liu Y, Fukumoto K, Banko, H, Takag K, Hatashima, M, Terada S, Furue MK. Ion beam modification of Jellyfish collagen-derived biomaterial as a scaffold for culturing human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013年5月30-31日 産業技術総合研究所(茨城)
14. Okamura M, Yanagihara K, Ahmad S, Liu Y, Hirata M, Nikawa H, Mizuguti K, Furue MK. Prediction of hepatocytic differentiation tendency of human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013年5月30-31日 産業技術総合研究所(茨城)
15. 太刀川彩保子、菅三佳、古江-楠田美保、大沼清. 二次元イメージングサイトメトリは単層培養でのヒト多能性幹細胞コロニーの自己複製解析に適している 第 14 回再生医療学会総会 2015年3月19日-21日 パシフィコ横浜(神奈川)
16. 柳原佳奈、菅三佳、劉有容、浜田彰子、平井雅子、末盛博文、古江-楠田美保 ヒト多能性幹細胞の培養に用いる FGF-2 の生物活性評価法 第 14 回日本再生医療学会総会 2015年3月19日-21日 パシフィコ横浜(神奈川)

【図書】(計 2 件)

1. 古江-楠田美保 (2014) 第 15 章ヒト多能性幹細胞の利用技術開発、生命科学から創薬へのイノベーション 第 部 新たな創薬のための革新的技術開発 南山堂 P105-112
2. 菅-三佳、古江-楠田 美保 (2014) ヒト多能性幹細胞培養用培地の開発の現状と課題 生物工学会誌 第 92 巻 9 号 P487-490

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古江 美保 (FURUE, MIHO)
独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 研究リーダー
研究者番号：80257310

(2)研究分担者

・菅 三佳 (SUGA, MIKA)
独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 特任研究員
研究者番号：00340448

・柳原 佳奈 (YANAGIHARA, KANA)
独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 プロジェクト研究員
研究者番号：10571333

(3)研究協力者

三村 純代 (MIMURA, SUMIYO)
H24 ~ 25 年度：独立行政法人 医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・ヒト幹細胞応用開発室・研修生 (広島大学大学院・医歯薬保健学研究院・統合健康科学部門・大学院生)
H25 ~ 26 年度：同上・協力研究員 (同上・口腔生物工学分野・特任助教)