

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 7 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592792

研究課題名(和文) 神経の初期発生におけるニッチの解析

研究課題名(英文) Analysis of stem cell niche during early neural development

研究代表者

菅 三佳(岸本三佳)(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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒトES/iPS細胞から神経堤を誘導する方法が複数報告された。しかしながら、それらの方法では複数の因子を高濃度で使用するため、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り、また、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、我々は無血清・無フィーダー・単層培養下における増殖因子、細胞外マトリックス、低分子化合物の効果をスクリーニングし、頭部神経堤誘導に必要なニッチを解析し、さらに、誘導に応用可能な培養面及び培地組成の開発を行った。その結果、ヒト多能性幹細胞から頭部神経堤を特異的に誘導する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Several protocols for derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells in vitro have been reported. However, accurate analysis of factors required for neural crest induction cannot be done in those protocols because of complex formation of the induction medium. Moreover, cranial and trunk neural crest cells cannot be specified by those protocols. Here we analyzed stem cell niche during cranial neural crest induction by screening the effects of growth factors, extracellular matrix, and small molecules under the chemically defined serum free culture condition. Besides, we conducted to research and develop cell culture surface and medium which can be used for neural crest induction. As a result, we developed a new method for directed differentiation of cranial neural crest cells from human ES cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：ヒト多能性幹細胞 神経堤 末梢神経

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経堤 (neural crest) は、脊椎動物の初期発生において神経上皮細胞からなる神経管と表皮外肺葉の境界に生じる領域である。神経管と神経堤は、同じ外肺葉の神経板から生じる。神経堤から上皮-間充織転換 (EMT、脱上皮化ともいう) を起こして移動する細胞を神経堤細胞という。この神経堤細胞からは、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種が分化する。末梢神経系の細胞の系譜は明らかになったが、発生のメカニズムは未だ不明の点も多く、今後の研究データの蓄積が必要であり、ES/iPS 細胞の末梢神経系への誘導方法の確立によって研究が促進されると期待されている。

(2) ヒトやマウスの ES/iPS 細胞から神経系に分化誘導するプロトコルは既にいくつか報告されているが、いずれも胚様体や神経細胞塊 (ニューロスフィア) を経て分化させるものである (文献、)。そのような細胞塊の内部でおこる現象は、生体内でおこる現象と同様、解析をすることが非常に難しいため、脊椎動物の神経の初期発生における細胞運命決定の分子機構についてはほとんど明らかにされていない。神経の初期分化の分子機構を試験管内で解析するためには、ES/iPS 細胞を胚葉体やニューロスフィアを形成せずに神経系へ誘導することが必要である。そこで、古江 (研究分担者) らは、無血清/無フィーダー/単層培養の系で、神経堤への分化誘導に必要な因子を解析し、マウス ES 細胞から神経堤への分化誘導方法を確立した (文献)。

(3) 生体内では細胞の運命はその細胞が存在する領域に支配されている。例えば、神経の初期発生において、神経板が形成される時期 (ヒトでは受精後第3週) には、神経板の細胞は神経上皮細胞と神経堤細胞の両方に分化しうる可塑性の高い細胞ではないかと考えられているが、神経管の形成時 (ヒトでは受精後第4週) に胚の背側末端にくる神経板の一部が神経堤細胞系列に分化し、神経上皮細胞と明瞭に区別できるようになる。このように、細胞の増殖・分化は自律的に決定されるだけでなく、その細胞を取り巻く微小環境 (ニッチ) つまり周囲の細胞から産生されるサイトカイン、接着分子、細胞外基質などの環境分子 (ニッチ因子) によって制御されると考えられる。神経の初期発生における細胞の運命決定機構を解明するには、ニッチの解析は不可欠である。

(4) 以上のことより、古江らがこれまでに開発したヒト ES 細胞用無血清培地 (文献) やヒト間葉系幹細胞用分化誘導培地 (文献) を用い、マウス ES 細胞の分化誘導法 (文献) を応用することにより、ヒト ES/iPS 細胞を神経堤細胞、末梢神経系幹細胞へと分化誘導すれば、ヒトの神経堤から末梢神経への分化に参与するニッチ因子を正確に解析で

きるのではないかとこの着想に至った。また、金 (研究分担者) らが開発中のオリゴデンドリマー提示型培養面 (文献) のようなインテグリンシグナルを介さずに細胞が培養面に接着できる特殊な培養システムを神経堤誘導に応用すれば、より正確なニッチの解析が可能なのではないかとこの着想を得た。このような着想をもとに研究計画を立案し、本研究を実施するに至った。

## 2. 研究の目的

末梢神経の初期発生における細胞運命決定機構を解明するため、ヒト ES/iPS 細胞から神経堤への誘導を行い、神経の初期分化に必要な細胞周囲環境 (ニッチ) 因子を同定することを目的として本研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

(1) 種々の細胞外マトリックスで処理をしたマルチウェルプレート培養面上で、複数株のヒト iPS 細胞 (201B7、iPS-TIG114-4f1、及び Tic) の単層培養をおこない、さらに様々な種類・濃度・組み合わせのサイトカイン・増殖因子を添加し、神経堤細胞・末梢神経への分化誘導をおこなった。細胞培養観察装置による継時的生細胞観察で、分化誘導過程の個々の細胞の形態変化を追った。さらに、分化誘導後3日後、7日後および14日後の細胞における Nestin 等の神経幹細胞マーカー遺伝子、及び神経堤・神経関連遺伝子の発現を免疫染色により検討した。さらに、複数株のヒト ES 細胞 (H9、Shef3、及び Shef6) を用いて、上記の再現性を確認し、細胞株間の神経分化効率の差異を比較した。

(2) 神経誘導に応用可能であると見込まれる数種のオリゴデンドリマー提示型培養面について、これらを用いて、未分化の ES/iPS 細胞から神経系細胞への誘導が可能か検討した。

(3) 本研究の実施途中に Menendez らにより無血清・無フィーダー・単層培養下に「神経堤幹細胞」を誘導する方法が報告された (文献)。この方法により誘導される神経堤幹細胞の遺伝子発現についてフローサイトメトリー、免疫染色、及び PCR アレイ解析により検討した。

(4) 位置情報を有する特定の神経堤細胞を特異的に誘導するために必要なニッチを解析するために、増殖因子、細胞外マトリックス、低分子化合物の効果をスクリーニングし、さらに、Menendez らの方法において用いられたプロトコルを改変し、特定の位置情報をもつ神経堤細胞を誘導するための培地組成及び誘導培養時間について検討し、新規のプロトコルを開発した。フローサイトメトリー、免疫染色、および PCR アレイ解析により、本研究で開発したプロトコルにより誘導された神経堤細胞について、Menendez らの方法により誘導される神経堤幹細胞と比較して遺伝子発現変動解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 無血清・無フィーダー・単層培養下のヒトiPS細胞及びヒトES細胞から神経幹細胞、神経堤・末梢神経への分化誘導に適した培養面の条件、及び添加因子(サイトカイン・増殖因子の種類・濃度・組み合わせ)の条件が明らかになった。また、検討したヒトES/iPS細胞株の中から、増殖因子、細胞外マトリックス、低分子化合物ライブラリーの効果をスクリーニングし、神経堤及び末梢神経への分化への影響を検討するために適した細胞株を選択した。

(2) 金が開発、作製した神経誘導に応用可能と見込まれる数種のオリゴデンドリマー提示型培養面を用いて神経の初期分化誘導が可能か検討したところ、培養面及び培地の組成の両方に依存して誘導効率(未分化維持効率および神経系細胞分化効率)、及び生存率に有意差があることが明らかとなった。

(3) Menendezらの方法により誘導される神経堤幹細胞は、遺伝子発現の詳細な解析により、特定の位置情報を有しない細胞集団であることが明らかとなった。

(4) 無血清・無フィーダー・単層培養下における増殖因子、細胞外マトリックス、低分子化合物の効果のスクリーニングし、特定の位置情報を有する神経堤細胞の誘導に必要なニッチを解析し、特定した。殊にBMP4活性の制御は神経堤誘導に重要であり、BMP4を誘導用培地に添加する濃度とタイミングが誘導される細胞のサブタイプ及び位置情報の決定に重要な要素となることを見出した。この解析結果をもとに、特定の位置情報をもつ神経堤細胞を誘導するための培地組成及び誘導培養時間を決定し、位置情報を有する頭部神経堤細胞を誘導する方法を開発し、本法により誘導された細胞が神経堤細胞であることを複数の試験方法により確認した。さらに、遺伝子発現解析により、特定の位置情報を有する頭部神経堤であることが確認された(発表論文)。

本研究において、末梢神経の初期分化、つまり神経堤分化に必要なニッチ因子を同定し、位置情報を有する頭部神経堤細胞を特異的に誘導する方法を確立した。今後は、本研究の成果を踏まえ、位置情報を持った神経堤細胞から末梢神経への最終分化に必要なニッチについて検討を行う。

#### <引用文献>

Cordero, D.R. et al. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A.*, 155, 2011, pp270-279

Kikuchi, M. et al. Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes to Cells*, 16, 2011, pp273-381

Lee G. et al. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nature*

*Protocols*, 5, 2010, pp688-701

Aihara, Y. et al. Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 2010, pp1287-1294

Furue MK. et al. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 2008, pp13409-13414

Mimura S. et al. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol.*, 55(2), 2011, pp181-187

Menendez, L. et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells. *Nature Protocols*, 8, 2013, pp203-212

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

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.* 2016; 60(1-2-3): pp21-28. 査読有

DOI: 10.1387/ijdb.160040mk

Mimura S, Suga M, Liu Y, Kinehara M, Yanagihara K, Ohnuma K, Nikawa H, Furue MK. Synergistic effects of FGF-2 and Activin A on early neural differentiation of human pluripotent stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* in press, 2015 査読有

DOI: 10.1007/s11626-015-9909-8

Kinehara M., Kawamura S., Mimura S., Suga M., Hamada A., Wakabayashi M., Nikawa H., and Furue MK. Protein 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), 2014, pp2180-9. 査読有

DOI: 10.1089/scd.2013.0424.

[学会発表](計7件)

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

Kim Mee-Hae, et al. Controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells on a dendrimer-immobilized surface. *ISSCR 12th Annual Meeting* 2014.6.18-21 Vancouver, Canada

三村純代、菅三佳、二川裕樹、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創立 50 周年  
記念学術大会・総会、2013 年 11 月 23 日  
～ 11 月 24 日、日本歯科大学生命科学部  
九段ホール（東京）

〔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

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研  
究所

医薬基盤研究所

<http://www.nibio.go.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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・ヒト幹細胞応用開発室・特任  
研究員

研究者番号：00340448

### (2) 研究分担者

金 美海 (KIM, Mee-Hae)

大阪大学大学院・工学研究科・助教

研究者番号：30506449

古江 美保 (FURUE, Miho K)

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・研究  
リーダー

研究者番号：80257310

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

三村 純代 (MIMURA, Sumiyo)

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 (H24～25 年度)・協力研究員 (H25～26  
年度)

広島大学大学院・医歯薬保健学研究院・統  
合健康科学部門・口腔生物工学分野・特任  
助教