

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592124

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞を用いた脊索および神経管 Floor plate の発生機序の解明

研究課題名(英文) Modeling the development of notochord and floor plate with human induced pluripotent stem cells.

研究代表者

森實 飛鳥 (Morizane, Asuka)

京都大学・iPS細胞研究所・助教

研究者番号：10528730

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)：脊索は発生初期に神経管近傍に出現し、ShhやNogginといわれる分泌蛋白を産生し、ドパミン神経などの特定の神経の発生を誘導する。これまでにカエルやニワトリらを用いて脊索の役割が研究されてきたが、ヒトでは胎児を使う事が困難なため研究が進んでいない。本研究ではヒトのES細胞、iPS細胞を用いる事でヒトでの脊索および神経管の初期発生におけるモデルを作成した。既知の因子、低分子化合物の組み合わせによりヒトES細胞、iPS細胞から脊索細胞を誘導する条件を検討しShh, Foxa2という脊索で発現しているマーカーを確認する事ができた。本法により従来では困難であったヒト脊索の初期発生の研究の道が開けた。

研究成果の概要(英文)：Notochord appears in the developing embryo close to the neural tube. It secretes Sonic hedgehog (Shh) and Noggin that induce specific of neurons such as dopaminergic neurons. The research of notochord has been proceeded with Xenopus or Chick. Regarding human, as it is difficult to use its embryo, the notochord of human development has not been studied. In this study, human pluripotent stem cells made it possible to generate the in vitro model of development of human notochord and neural tube. Many combinations of known factors and small molecules has been tried to induce human notochord from pluripotent stem cells. Finally the markers expressed in notochord such as Shh and Foxa2 were observed in the induced cells. This invented protocol enables the study of notochord development with human cells that has been difficult without pluripotent stem cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：多能性幹細胞 脊索 神経 分化誘導

### 1. 研究開始当初の背景

脊索は発生初期において神経管や近接する組織の分化に対し大きな役割を果たし、Sonic hedge hog (SHH)や Noggin, Chordin, Follistatin 等の因子をモルフォゲン(morphogen) として分泌する。これまでのカエルやニワトリを用いての研究により、脊索は神経管腹側の floor plate の誘導に密接に関係することが解っている(図1)。ほ乳類、特にヒトの初期発生における脊索の役割などはヒト胎児での研究が困難であるため直接的には示されていない。近年、ヒト多能性幹細胞(ES細胞:胚性幹細胞、iPS細胞:人工多能性幹細胞)の登場によりほ乳類の初期 発生の研究の進歩が見られている。ヒト由来の ES 細胞、iPS 細胞を用いる事で、ヒト脊索および 神経管の初期発生における *in vitro* モデルを作ることが可能と考えられた。

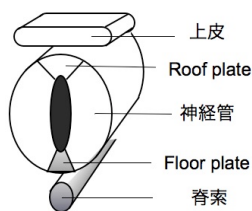


図1

### 2. 研究の目的

ヒト由来の ES 細胞、iPS 細胞から脊索細胞の誘導法を確立する。同幹細胞由来の脊索細胞、初期神経細胞を用いて神経管腹側の floor plate 型の細胞を誘導する。Floor plate の発生で働く遺伝子、蛋白質のスクリーニングを行う。得られた知見によりより生体に近い環境でのドーパミン神経、運動神経の分化誘導法を確立し、再生医療や病態解明に役立てる。

### 3. 研究の方法

マウス ES 細胞からの脊索誘導法が近年報告された (Winzi ら 2011)。このマウス ES 細胞での方法を基にヒト由来の ES 細胞、iPS 細胞用に改変してプロトコールを作成する。アクチビン, Wnt, レチノイン酸, BMP, などのシグナル因子、阻害因子、および bFGF など

の成長因子を分化ステージによって適宜組み合わせる。第1段階として中内胚葉を誘導する。評価系として Brachyury, hGSC, hMIXL1, Foxa2 などの中内胚葉のマーカーの発現上昇を qPCR, 免疫染色で確認する。添加する因子の濃度やタイミング、細胞の培養密度など検討事項は多数あるが、各段階での評価系のマーカーを用いて至適条件を決定していく。中内胚葉から脊索細胞への第2段階の誘導では脊索誘導の指標として Noto, Foxa2, Shh, Noggin, Chordin, Foxj1 等を用いる。浮遊培養した細胞塊 (sphere) を2つ用いて同一の well 内で培養することにより接着培養させる技術を応募者は最近開発した。この方法により脊索細胞の sphere と神経細胞の sphere を用いる事で *in vivo* の異所性移植実験をヒトの細胞で模倣できると考えた。

### 4. 研究成果

ヒト ES 細胞、iPS 細胞を用い、分化誘導の至適条件を検討した。中内胚葉を誘導する第1段階としては Activin 100ng/mL, CHIR99021 3  $\mu$ M を添加する事により 48 時間の誘導で Brachyury, hGSC, hMIXL1 などのマーカーの発現が認められた。これらの発現は qPCR, 免疫染色にて確認した(図 2:qPCR による中内胚葉マーカーの推移、図 3:RT-PCR による中内胚葉マーカーの発現、図 4:分化 48 時間後の免疫染色像)。

図2

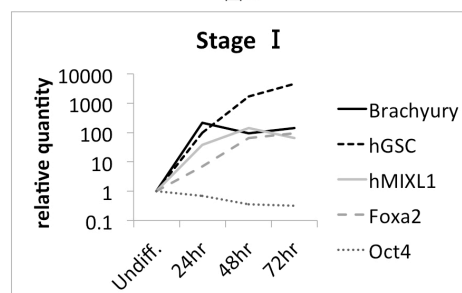


図3

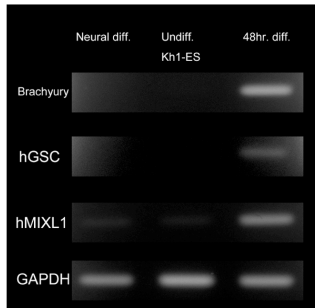
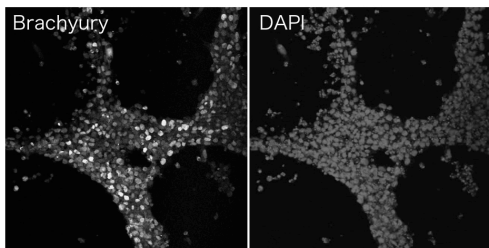


図4



次に中内胚葉から脊索細胞への第2段階の誘導条件を検討では BMP 系の阻害、Wnt 系の阻害、アクチビンの濃度、bFGF の濃度などを検討した。その結果、第2段階の最適条件は Wnt-C59 10nM, Activin 100ng/mL, LDN 100nM, bFGF 5ng/mL となった。この細胞は SHH, Brachyury, Foxa2, Noggin を発現している事が PCR 等で確認できた(図5:脊索様細胞の位相差像、図6:qPCRによる脊索マーカーの推移)。

図5

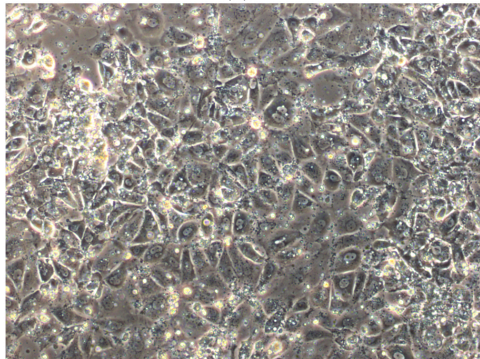
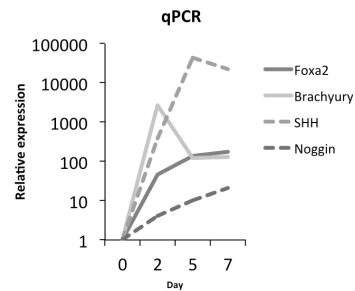


図6



上記の分化誘導法で決定した脊索の分化誘導培地で接着培養から浮遊培養に変更し、細胞塊を作らせた。第2段階(分化7日目)の浮遊 sphere と SFEBq 方で誘導した神経細胞の浮遊 sphere (こちらは分化12日目)を1つずつ同一 well に入れて sphere 同士を接着させた。さらにその状態で7日培養した。免疫染色を行うと神経 sphere には神経マーカー TuJ1 が、脊索 sphere には Foxa2 が弱く発現していることが確認された。しかし、期待されるような神経管腹側のドパミン神経の誘導効果は認められなかった。分化誘導日数のタイミング、脊索型細胞の sphere による誘導効率を上げる事が今後の課題と考えられた。

<引用文献>

Winzi MK, Hyttel P, Dale JK, Serup P: Isolation and Characterization of Node/Notochord-Like Cells from Mouse Embryonic Stem Cells. Stem Cells Dev (2011).

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 6 件)

- Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, Sekiguchi K, Nakagawa M, Parmer M, Takahashi J. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic

progenitors by cell sorting for successful transplantation. Stem Cell Reports、査読あり、2巻、2014、337-350

DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.01.013

2. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J.

Direct Comparison of Autologous and Allogeneic Transplantation of iPSC-Derived Neural Cells in the Brain

of a Non-human Primate. Stem Cell Reports、査読あり、1巻、2013、283-92

DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.08.007

3. Morizane A, Doi D, Takahashi J. Neural induction with dopaminergic phenotype from human pluripotent stem cells

through a feeder-free floating aggregation culture. Methods Mol. Biol、査読なし、108巻、2013、11-19

DOI: 10.1007/978-1-62703-444-9\_2

4. Doi D, Morizane A, Kikuchi T, et al. Prolonged Maturation Culture Favors a Reduction in the Tumorigenicity and the Dopaminergic Function of Human

ESC-Derived Neural Cells in a Primate Model of Parkinson's Disease. Stem Cells 査読あり、30巻、2012、935-945

DOI: 10.1002/stem.1060

5. Gomi M, Takagi Y, Morizane A, et al. Functional recovery of the murine brain ischemia model using human induced

pluripotent stem cell-derived telencephalic progenitors. Brain Research、査読あり、1459巻、2012、52-60

DOI:10.1016/j.brainres.2012.03.049

6. Ogura A, Morizane A, Nakajima Y, et al.  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Prevent

Overgrowth of Transplanted Neural Progenitors Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Dev.、

査読あり、22巻、2013、374-382

DOI:10.1089/scd.2012.0198

[学会発表] (計 10 件)

1. 森実飛鳥、パーキンソン病に対するiPS細胞を用いた細胞移植治療、第32回日本こども病院神経科医会、2014.11.22、静岡

2. 森実飛鳥、パーキンソン病に対する細胞移植治療～iPS細胞の臨床応用～、「細胞を創る」研究会7.0、2014.11.14、東京

3. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Takahashi J, Autologous transplantation of iPS cell-derived neurons to the brain of non-human primate, The 12th Stem Cell Research Symposium、2014.5.30、福岡

4. Morizane A, Immune response in the brain after transplantation of the neural cells derived from induced pluripotent stem cells. The 10th Annual Meeting of Korean Society of Stem Cell Research, 2014.8.23、Seoul 韓国

5. 森実飛鳥、合成ラミニンを使用したiPS細胞からのドパミン神経分化誘導、大阪大学蛋白研セミナー、2014年3月28日、大阪

6. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J, Autologous transplantation with iPSC-derived neurons is immunologically beneficial even in the brain. The 7th Takeda Science

Foundation Symposium on PharmaSciences,  
2014.1.16-18、大阪

7. Morizane A. Transplantation of  
autologous neural cells derived from  
induced pluripotent stem cells (iPSCs) to  
the brain of non-human primate. 2013 CABX  
Workshop and International Symposium,  
2013.12.09、Jeju 韓国

8. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K,  
Hotta A, Kawasaki T, Onoe H, Shiina T,  
Takahashi J. Autologous Transplantation of  
Induced Pluripotent Stem Cell-Derived  
Neurons Causes Minimum Immune Reaction in  
the Brain of Non-Human Primate. ISSCR 11th  
Annual Meeting, 2013.06.13、Boston 米国

9. Morizane A, Autologous/Allogenic  
transplantation of neurons derived from  
iPSCs into monkey brain, CiRA  
International Symposium、2013.3.12、京都

10. Morizane A, Okita K, Doi D, et al.  
Differentiation from primate induced  
pluripotent stem cells designed for an  
auto-grafting model system. ISSCR 10th  
Annual Meeting、2012.6.15、横浜

国内外の別：

[その他]  
ホームページ  
[http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/ca01/  
index.html](http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/ca01/index.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森実 飛鳥 (MORIZANE, ASUKA)  
京都大学 iPS 細胞研究所・助教  
研究者番号：10528730