

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08666

研究課題名(和文)ミニ小腸を利用したヒト多能性幹細胞由来神経堤細胞の細胞治療への応用

研究課題名(英文)Application of human pluripotent stem cell-derived neural crest cells for cell therapy in mini-gut

研究代表者

菅原 亨 (Sugawara, Tohru)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・上級研究員

研究者番号：70553460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤細胞(Neural crest、NC)は脊椎動物の胚発生過程で神経管と表皮外胚葉との間に形

成され、そこから全身に遊走し様々な細胞に分化する。NCの機能不全は神経堤症(Neurocristopathy)と呼ばれ、腫瘍の他に心臓・腸管の機能不全や発達障害・先天奇形など様々な疾患の原因となる。本研究では、神経堤症に対する細胞治療の材料としてヒト多能性幹細胞(hPSC)由来のNC作製を目的とした。さらにhPSC由来の三次元小腸オルガノイド疾患モデルを作製し、hPSC由来のNCの機能を評価する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hirschsprung病も神経堤症の一つで、腸管の動きを制御する腸の神経節細胞の形成不全により、生後数日の間に機能性の腸閉塞症状がみられる。また、Hirschsprung類縁疾患は同様の症状を示すが発症原因は不明であり、治療方法も確立されていない。機能的な三次元小腸オルガノイドを作製することに成功したのは今のところ世界中で本研究のみであり、細胞治療の原材料としての神経堤細胞の評価を生体内に近い状況おこなうことでヒトに対する細胞治療の実現を加速させることが期待される点で大きな意義のある研究となる。

研究成果の概要(英文)：The neural crest cells (NCCs) originate at the dorsalmost region of the neural tube during the embryonic development of vertebrates. The dysfunction of NCCs is called neurocristopathy. It causes various diseases such as cardiac and intestinal dysfunction, developmental disorders, and congenital malformations as well as tumors.

In this study, we aimed to produce human pluripotent stem cell (hPSC)-derived NCCs as materials for cell therapy against neurocristopathy. In addition, we will generate hPSC-derived three-dimensional small intestinal organoid disease modelings and evaluate the function of hPSC-derived NCs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経堤細胞 神経堤症 ヒト多能性幹細胞 microRNA 小腸オルガノイド Hirschsprung病 RET遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞 (Neural crest cells : NCCs) は、外胚葉由来の細胞ながら末梢神経やシュワン細胞などの神経系の細胞のみならず筋肉や軟骨、さらには甲状腺や副腎など様々な組織形成に貢献する多分化能を持った細胞群である。神経堤細胞の異常は腫瘍や Waardenburg 症候群、Charcot-Marie-Tooth 病、CHARGE 症候群などさまざまな疾患に関与することが知られている。Hirschsprung 病も神経堤症の一つで、腸管の動きを制御する腸の神経節細胞の形成不全により、生後数日の間に機能性の腸閉塞症状がみられる。腸管の自律神経系は、胎生初期に口側から遊走した神経堤細胞が肛門にかけて分布することで形成されるが、その過程に異常が生じることで発症すると考えられている。無神経節腸管が広い範囲に及んでいるケースでは死亡率が高い。また、Hirschsprung 類縁疾患は同様の症状を示すが発症原因は不明であり、治療方法も確立されていない。

人工多能性幹細胞 (iPSC) や胚性幹細胞 (ESC) などの hPSC は、ヒトの初期発生・器官形成の分子機序解明の有用なツールとなる。また細胞治療のリソースとしてとしての利用が期待されている。最近、hPSC から上皮や神経細胞さらに筋組織を含む機能的な三次元小腸オルガノイド(「ミニ小腸」)の簡易な作製方法が開発された。そこで本研究では、三次元小腸オルガノイド Hirschsprung 疾患モデルを用いて、hPSC 由来の神経堤細胞による機能不全の改善、細胞治療法の開発を目的とする。細胞治療研究において、動物モデルではなくヒトの機能的な三次元疾患モデルへ hPSC から作製した細胞を「移植」することに大きな意義がある。

microRNA (miR) は、messenger RNA (mRNA) 転写後の調整機能を持つ 22 塩基程度の長さを持つ Non-coding RNA で、これまでヒトでは 2000 以上の miR が同定されている。申請者は、4 番染色体上の hsa-miR-302a/b/c/d、-367 クラスターが hPSC の多分化能性維持に重要であることを明らかにしてきた。またその miR クラスターの標的遺伝子の一つ deleted in azoospermia associated protein 2 は、外胚葉、とくに神経の発生に重要であることを明らかにした。また、他のグループから同 miR クラスターが Wnt シグナル経路を抑制することや BMP シグナルの調節に関与していることが報告されている。神経堤細胞の分化には Wnt シグナル経路と BMP シグナル経路が関与していることから、申請者は miR およびその標的遺伝子の発現調節で神経堤細胞の分化効率・分化指向性を操作できると考えた。miR は低分子化合物と並び細胞へ導入が比較的容易であり、RNA であるためゲノムを傷つけることなく多くの遺伝子に影響を与えうる。本研究で安全且つ安定的に高機能的な神経堤細胞の簡易な分化方法を開発できれば、細胞治療のみならず核酸医薬品の開発にもつながることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経堤症に対する細胞治療の原材料としてヒト多能性幹細胞 (hPSC) 由来の神経堤細胞 (NCCs) 作製を目的とした。従来の分化方法と合わせ特に microRNA とその標的遺伝子の発現調節によって安定的且つ簡便に高効率で NCCs を分化する方法の確立を目指す。同時に hPSC にゲノム編集技術を応用し RET 遺伝子に変異が導入された疾患モデル細胞を作製し、その細胞から三次元小腸オルガノイドを分化誘導し、in vitro 神経堤症疾患モデルを構築する。最終的には、作製した NCCs を三次元オルガノイドに「移植」しその機能性を検証する。細胞治療研究において、動物モデルではなくヒトの機能的な三次元疾患モデルへ hPSC から作製した細胞を「移植」することに大きな意義がある。本研究は、Hirschsprung 病の分子機構の解明と新規的細胞移植治療法の開発が期待できる。

### 3. 研究の方法

目的の達成のため、以下の 1) ~ 3) の実験に関し、miR とそのターゲット遺伝子の発現調節による神経堤細胞 (NCCs) 分化方法の確立と Hirschsprung 病の原因遺伝子である RET 遺伝子へ CRISPR/Cas9 を用いて変異を導入し病態を再現できる細胞クローンの作製、さらに疾患モデルの詳細な解析と作製した NCCs との共培養によって「ミニ小腸」で細胞治療の評価を実施する。

#### 1) microRNA の発現調節により hPSC から NCCs を分化誘導

hPSC からの NCCs の分化は Bajpai et al. (2009) もしくは Fukuta et al. (2014) に従う。microRNA 及び標的遺伝子の発現を抑制あるいは亢進し分化誘導実験をおこなうことで、分化誘導効率の向上を目指す。細胞種による分化指向性やフィーダーの状態による細胞の性質の変移を極力避けるために細胞は異種成分を除いた培地およびフィーダーレスで維持したヒト hPSC を用いる必要がある。hPSC を酵素でシングルセルにし、一定量の細胞を細胞低接着性のポリマーでコートされた 96 ウェルプレートに播種し Rock inhibitor 存在下で神経誘導培地 (NIM : DMEM/F12, Neurobasal, N2, B27, Insulin, bFGF, EGF) で EB を作製する。およそ一週間後神経幹細胞塊を接着培養し NCCs が遊走するまで神経誘導培地で培養し、ロゼットを取り除き残った細胞を Fibronectin でコートした培養皿で神経誘導培地を用いて培養し作製する。hPSC を Chemically defined medium に TGF- 阻害剤である SB431542 と Wnt シグナルを活性化する CHIR99021 を加え、マトリゲルもしくは Fibronectin コートした培養皿で 1 週間培養し誘導する方法を用いて作製する。最終的には作製した NCCs のマーカー遺伝子の発現や NCCs が末梢神経、

グリア細胞、メラノサイト、角膜内皮細胞などへの分化能を持つかどうか検証することで NCCs 分化を評価する。

2) ゲノム編集で hPSC の RET 遺伝子に変異を導入し Hirschsprung 病モデル細胞を作製  
Hirschsprung 病で最も一般的な遺伝子的原因は RET 遺伝子にみつかるとなる変異である。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を hPSC に応用することで、RET 遺伝子に点変異や短い挿入や欠失 (Indel) を導入することで遺伝子発現を Knockout もしくは Knockdown し疾患モデル細胞を作製する。また、遺伝的にほぼ同一な健常コントロール細胞としてゲノム編集を施していない hPSC を比較対象とする。また、病態を可視化しリアルタイムで観察するために、神経堤細胞特異的マーカーを導入した hPSC を作製する。神経堤細胞特異的に発現する転写因子 SOX10 がその発生維持の鍵となる。またその下流に位置する PHOX2B は神経堤細胞由来の自律神経系の構築に重要である。PHOX2B のスタートコドン上流およそ 1200 塩基対に発現をコントロールしているプロモーター領域が存在するので、そのプロモーター下流に蛍光タンパク質をコードしたウイルスを作製し細胞に感染させることで PHOX2B レポーター細胞を作製する。また、SOX10 は遺伝子発現調節領域がゲノムの広範囲に及ぶため、部分的なゲノム断片と蛍光タンパク質をつないでも、遺伝子発現の全貌を観察することは出来ない。そこで CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いて SOX10 遺伝子の直下に蛍光タンパク質をつなぐことで遺伝子の機能を損なわずにレポーター細胞を作製する。

### 3) hPSC 由来 NCCs を疾患モデルで評価

小腸オルガノイドの蠕動運動様の動態、NCCs 特異的マーカー遺伝子の発現で病態を評価する。hPSC から分化した NCCs と病態を再現した小腸オルガノイドを共培養することで病態の改善が見られるか顕微鏡下で観察する。はじめに移植細胞の生着や生着後神経細胞への分化傾向を示すか遺伝子発現、免疫染色等で確認する。特に内在性の神経堤細胞と外部から導入した NCCs の動態を比較することで、移植細胞の機能性を評価できる。また、腸管形成の各ステージでの移植の評価、また、未成熟な神経堤細胞から最終分化した神経細胞まで有効な細胞ソースの評価を in vitro でおこなうことが出来る。

## 4. 研究成果

### 1) Hirschsprung 病疾患モデル細胞の作製

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術をヒト人工多能性幹細胞やヒト胚性幹細胞に応用し、Hirschsprung 病の原因遺伝子である RET 遺伝子に点変異や短い挿入や欠失 (Indel) を導入することで遺伝子発現を抑制した疾患モデル細胞を作製した。4 か所に gRNA をデザインし、ベクター (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0) にクローニングした後、ES 細胞もしくは iPS 細胞に NEPA21 electroporator を用いて遺伝子導入した。個々のサブクローンを遺伝子解析し、変異が導入されていることをサンガーシーケンス法で確認した(図1)。これにより、遺伝的にほぼ同一なオリジナルの細胞をコントロール細胞としてゲノム編集を施した細胞と比較することができる。

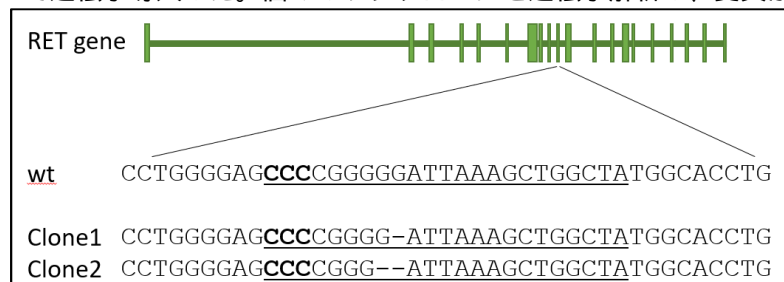


図1: RET 遺伝子への変異導入のために設計した gRNA の位置

### 2) NCCs の分化誘導

NCCs の分化は、Fukuta et al. (2014) に従い、低分子化合物 (SB431542 と CHIR99021) を用いておこない、PAX3、TFAP2A、NGFR、SOX9、SOX10 などの発現を定量 PCR で確認した。1 週間程度で上記マーカー遺伝子が発現した hPSC から NCCs を分化することができた(図2)。またその NCCs から、神経細胞のマーカー遺伝子である MAP2 陽性細胞の分化誘導に成功した。疾患モデルに導入した NCCs の可視化のために PiggyBAC

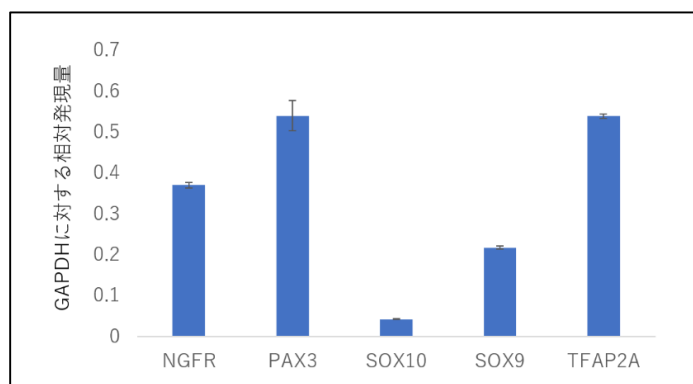


図2: 分化誘導した NCCs におけるマーカー遺伝子の発現

ベクターシステムを用いて、CMV プロモーターで発現誘導される EGFP もしくは TurboRFP 遺伝子をコードした配列を hPSC に導入し、未分化状態、さらには分化誘導後も蛍光蛋白質の発現が陽性であることを確認した (図 3)

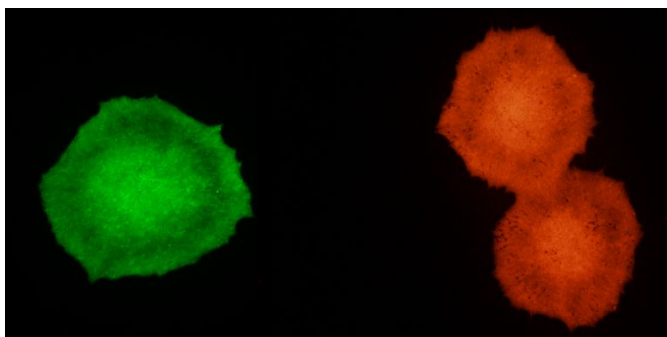


図 3 : 恒常的に GFP (左) あるいは tRFP (右) を発現する細胞

### 3) hsa-miR-302 cluster をノックアウト

microRNA の NCCs の分化誘導における役割を調べるために CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて hsa-miR-302 cluster のノックアウトを試みた。hsa-miR-302 cluster の上流と下流に gRNA を設計し、ノックアウトを可視化するために Cluster の上流と下流の配列の間に蛍光蛋白質遺伝子をコードしたドナーベクターとともにコトランスフェクションした (図 4)。現在位のところ、hsa-miR-302 cluster のヘテロノックアウト細胞の作製に成功している。

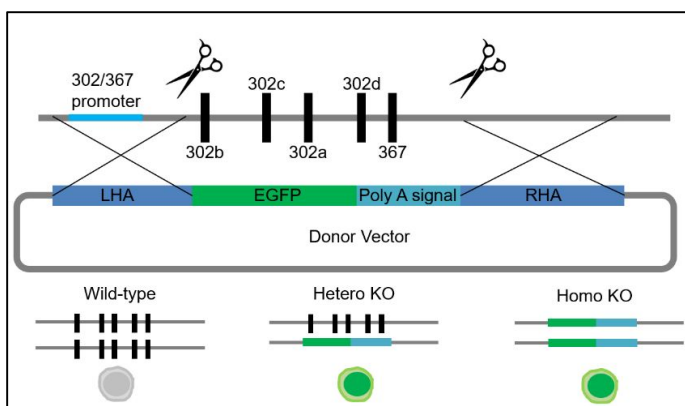


図 4 : hsa-miR-302 cluster のノックアウトの可視化

ヘテロノックアウト細胞の特性解析をおこなった。形態上は野性型の細胞と同様フラットなコロニーを形成した (図 5 左)。未分化マーカーの発現を野性型と比較したところ野性型の遺伝子発現と同様に未分化マーカー遺伝子の発現が確認された。一方、遺伝子操作を加えた hsa-miR-302 cluster 領域から発現する pri-miR-302 の発現は、野性型 (青) と比較してヘテロノックアウト細胞 (赤) は半分程度の発現量であった (図 5 右)。

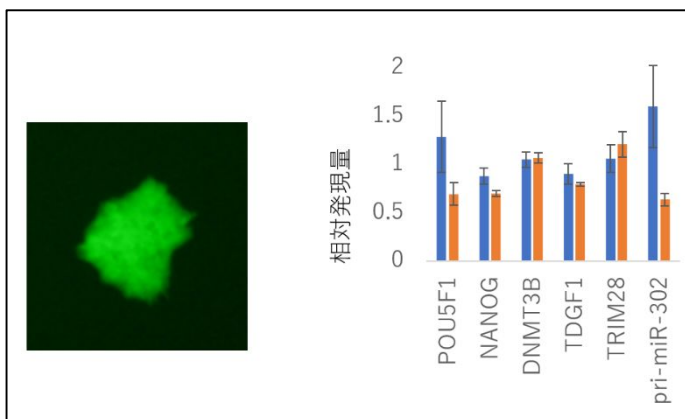


図 5 : ノックアウト細胞における未分化マーカーの発現

今後、RET 遺伝子をノックアウトした細胞を用いて三次元小腸オルガノイドへの分化誘導をおこない、EGFP あるいは tRFP で可視化した細胞から分化誘導した NCCs を共培養することで、導入した細胞が in vitro の疾患モデルの中でどのような動態を示すか詳細に解析を進める予定である。また、hsa-miR-302 cluster をノックアウトした細胞を用いて NCCs の分化誘導を試みることで、NCCs の分化誘導に参与している遺伝子を同定し、分化誘導効率を高める方法を検討することを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tohru Sugawara, Takumi Miura, Tomoyuki Kawasaki, Akihiro Umezawa, Hidenori Akutsu*	4. 巻 15
2. 論文標題 The hsa-miR-302 cluster controls ectodermal differentiation of human pluripotent stem cell via repression of DAZAP2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.03.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shi Y, Hung ST, Rocha G, Lin S, Linares GR, Staats KA, Seah C, Wang Y, Chickering M, Lai J, Sugawara T, Sagare AP, Zlokovic BV, Ichida JK.	4. 巻 4
2. 論文標題 Identification and therapeutic rescue of autophagosome and glutamate receptor defects in C9ORF72 and sporadic ALS neurons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e127736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.127736.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogawa S, Yamada M, Nakamura A, Sugawara T, Nakamura A, Miyajima S, Harada Y, Ooka R, Okawa R, Miyauchi J, Tsumura H, Yoshimura Y, Miyado K, Akutsu H, Tanaka M, Umezawa A, Hamatani T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Zscan5b Deficiency Impairs DNA Damage Response and Causes Chromosomal Aberrations during Mitosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1366-1379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.05.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sugawara T, Miura T, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H.
2. 発表標題 The hsa-miR-302 cluster is essential for self-renewal in human pluripotent stem cell
3. 学会等名 17th Annual meeting of International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原亨、三浦巧、川崎友之、梅澤明弘、阿久津英憲
2. 発表標題 Hsa-miR-302s are essential for self-renew of human pluripotent stem cells
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------