

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592086

研究課題名（和文） ES細胞を利用した神経堤症治療モデルの確立・神経堤細胞の分化機構の解析

研究課題名（英文） Establishment of the neurocristopathy treatment model and analysis of the differentiation mechanism of neural crest cells using mouse embryonic stem cells.

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

研究成果の概要（和文）：

神経堤細胞の分化機構の解明や神経堤症治療に応用する目的で、転写因子 Sox10 を蛍光タンパク質で標識して神経堤細胞を可視化した遺伝子改変 ES 細胞とマウスを作成した。ES 細胞から誘導した神経堤細胞は培養した胎仔腸管への生着が認められた。遺伝子改変マウスから神経堤細胞を分離し、神経堤細胞特異的に発現する遺伝子群を明らかにした。また、このマウスを利用して、胎仔皮膚において神経堤様の細胞が維持されていることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

For the purpose of elucidating the mechanism of the neural crest cell differentiation, we generated the embryonic stem cells and mice, where the expression of Sox10 can be visualized with a fluorescent protein. The transplanted neural crest cells derived from the ES cells survived in the embryonic intestinal tract. We separated neural crest cells from the gene modified embryo and analyzed the gene expression by gene arrays. In addition, using the mice, we found that the multipotent neural crest-like cells were maintained in skin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：神経堤細胞、ES細胞、神経堤症、転写因子 Sox10、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

神経堤症は、胚の神経管形成時に発生する外胚葉由来の細胞である神経堤細胞の異常を原因としている。疾患の原因である神経堤細胞は、末梢神経系細胞や色素細胞などに分化する多分化能を有し、さらに体の各所に移動するため、その異常は非常に重篤である。神

経堤症は高い頻度で新生児に生じるが、その治療法は、移植治療に頼るしか方法はない。そのため、神経堤細胞そのものの分化機構の解明を通して、神経堤症発症機構が明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

我々はマウス ES 細胞から試験管内で神経堤細胞を誘導できる培養系を開発し、その培養系から神経堤細胞を純化することに成功した。さらに発生初期の神経堤細胞に発現する転写因子 Sox10 を蛍光タンパク質で標識した遺伝子改変 ES 細胞を作成し、神経堤細胞の純化に成功した (図 1)。これに加え、この ES 細胞から遺伝子改変マウスを作成し、生体内での神経堤細胞の可視化に成功した (図 2)。

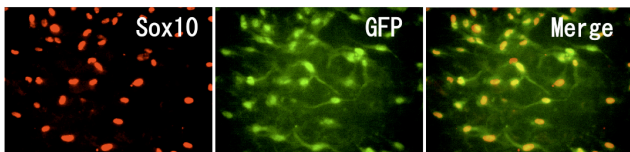


図 1

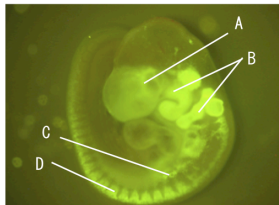


図 2

図 1: Sox10 を GFP で標識した ES 細胞転写因子 Sox10 の発現 (赤) に伴って蛍光タンパク (GFP、緑) も発現する。

図 2: E10.5 マウス胎仔の神経堤細胞の分布さらにこの ES 細胞からマウスを作成し、神経堤細胞 (図 2、緑) を可視化した。顔面 (A)、咽頭弓 (B)、感覚神経節 (C)、交感神経節 (D)

以上より、

(1) 培養によって得られる大量の神経堤細胞が神経堤症治療に利用できないか？

(2) 純化した神経堤細胞を利用すれば、神経堤細胞の精密な解析が可能ではないか？

と着想し、本研究の目的を以下に設定した。

(1) 純化した ES 細胞由来の神経堤細胞を用いた神経堤症治療の検討を行う。

(2) 神経堤細胞の分化機構を解明する。

(3) 神経堤細胞を可視化したマウスを用いて、神経堤症の発症機構を解明する。

(4) マウス ES 細胞の神経堤細胞誘導システムをヒト ES 細胞へ応用する。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞由来の神経堤細胞を利用した神経堤症治療のモデルの構築

神経堤細胞だけが標識される遺伝子改変 ES 細胞 (Sox10-IRES-GFP ES 細胞: 神経堤細胞の発生初期に発現する転写因子 Sox10 と

Internal Ribosomal Entry Site (IRES) の制御下で蛍光タンパク質 GFP が発現するため、GFP 陽性を指標にして Sox10 陽性の神経堤細胞を純化できる) から神経堤細胞を誘導し、フローサイトメトリーでその純化を行う。この純化した神経堤細胞を胎仔腸管に移植し、その生着や神経・グリア細胞への分化を解析する。

(2) ヒト ES 細胞の神経堤細胞への誘導

マウス ES 細胞の神経堤細胞誘導系を基にして、ヒト ES 細胞の神経堤細胞への誘導を試みる。まず、培養系に加える因子、加える時期・濃度、ストローマ細胞の検討を行い、神経堤細胞の最終分化細胞である色素細胞への誘導を試みる。次いで、その分化段階を RT-PCR、免疫染色などより経時的に解析し、神経堤細胞が生じている段階を確定する。

(3) 神経堤細胞を可視化したマウスを用いて、成体組織に存在する神経堤細胞を分離する

Sox10-IRES-GFP ES 細胞より作成した神経堤細胞を可視化したマウスを用いて、組織中に維持されている神経堤細胞の分離を試みる。方法としては、成体マウスの各組織 (皮膚や腸) をディスペーゼで解離後、フローサイトメトリーで GFP 陽性細胞の分離を試みる。ついで分離した細胞の幹細胞性、分化能の解析を行う。

(4) 神経堤細胞に発現する分子の探索

ES 細胞由来の純化した神経堤細胞、及び神経堤細胞を可視化したマウスから分離した神経堤細胞に関して、RT-PCR、マイクロアレイなどにより、神経堤細胞に発現する分子のレパートリーを調べあげ、神経堤細胞に特異的に発現する分子の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) ES 細胞由来の神経堤細胞を利用した神経堤症治療のモデルの構築

ES 細胞から誘導した神経堤細胞の移植モデルを構築する目的で、Sox10-IRES-GFP ES 細胞から誘導した神経堤細胞をセルソーターで純化し、器官培養している胎仔腸管への移植を試みた。移植一週間後、ES 細胞由来の神経堤細胞は胎仔腸管へ生着していたが (図 3)、末梢神経系細胞への分化は認められなかった。今後、ES 細胞由来の神経堤細胞のより細分化した分離方法や移植方法及び細胞採集後の移植時期の検討が必要である。



図 3: Sox10-IRES-GFP ES 細胞から誘導した神経堤細胞を胎仔腸管へ移植した。(左図) 胎仔腸管 (右図、緑) 移植した神経堤細胞

(2) ヒト ES 細胞の神経堤細胞への誘導

マウス ES 細胞の神経堤細胞への分化誘導系を応用して、ヒト ES 細胞から神経堤細胞の最終分化細胞である色素細胞の誘導に成功した。さらに、その分化段階の詳細な解析より、ヒト ES 細胞由来の神経堤細胞が発生している可能性を見いだした (図 4)。しかし、その誘導効率が非常に低かったため、ヒト ES 細胞由来の神経堤細胞を単離して、さらなる研究に供するには不十分であった。引き続き、効率よい誘導法の検討を行っている。

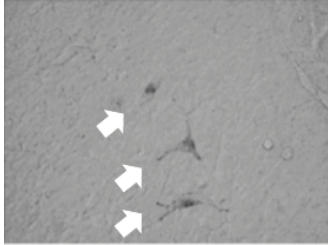


図 4: ヒト ES 細胞から誘導した色素細胞 (矢印)

(3) 神経堤細胞を可視化したマウスを用いて、成体組織に存在する神経堤細胞を分離する

神経堤細胞を可視化したマウスを利用して、生体内の各組織に多分化能を持つ神経堤細胞が維持されていることを明らかにした。本来、神経堤細胞は発生後に多分化能を失ってしまうと考えられてきたが、発生後でしかも各組織に移動した後でさえ、多分化能を維持しているということは、驚くべきことであっ

た。特に胎仔皮膚に維持されている神経堤様の細胞に関しては、STEM CELLS 誌にその成果を発表した (STEM CELLS. 27, 888-897, 2009.)。皮膚という利用しやすい組織に存在する神経堤様細胞は再生医療への応用の可能性を秘めていると思われる。さらに内耳、後根神経節などにおいても神経堤様の細胞が維持されていることを見いだしている。現在その幹細胞性、多分化能を解析している。

(4) 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った。解析にあたっては、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の抽出を試みた (図 5)。この解析により、神経堤細胞で特異的に発現上昇がみられる遺伝子群 (転写因子、成長因子、レセプター型分子など) を明らかにし、さらにこれら遺伝子群から、神経堤細胞の発生と関連する遺伝子を見出している。本研究は未だ発展段階であるが、神経堤細胞関連遺伝子の全貌が明らかにでき、神経堤細胞発生に関与する可能性のある遺伝子を同定できたことは、今後の神経堤細胞研究の新たな展開につながると思われる。引き続き、これら遺伝子の神経堤細胞の発生との関連性を中心とした機能解析を行っている。

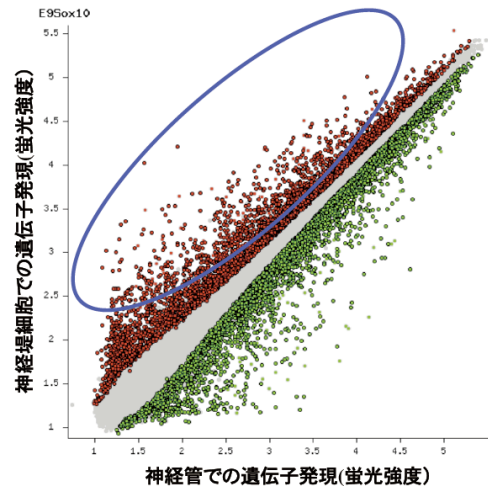


図 5: 神経堤細胞と神経管での遺伝子発現の比較。神経堤細胞で発現上昇がみられる遺伝子群を青丸で示している。

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 7 件)

① 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*. 2011. in press. 査読有

② Hitomi Aoki, Akira Hara, Tsutomu Motohashi, Masataka Osawa, Takahiro Kunisada. Functionally distinct melanocyte populations revealed by reconstitution of hair follicles in mice. *Pigment cell & melanoma Research*. 24, 125-135, 2010. 査読有

③ Tsutomu Motohashi, Katsumasa Yamanaka, Kairi Chiba, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada. Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin. *STEM CELLS*. 27, 888-897, 2009. 査読有

④ Atsushi Suetsugu, Masahito Nagaki, Hitomi Aoki, Tsutomu Motohashi, Takahiro Kunisada, Hisataka Moriwaki. Differentiation of mouse hepatic progenitor cells induced by hepatocyte nuclear factor-4 and cell transplantation in mice with liver fibrosis. *Transplantation*. 86, 1178-1186, 2008. 査読有

⑤ Hitomi Aoki, Akira Hara, Tsutomu Motohashi, Huayue Chen, Takahiro Kunisada. Iris as a recipient tissue for pigment cells: Organized in vivo differentiation of melanocytes and pigmented epithelium derived from embryonic stem cells in vitro. *Developmental Dynamics*. 237, 2394-2404, 2008. 査読有

⑥ Akiko Tsuji, Naoko Yoshimura, Hitomi Aoki, Alexei A. Sharov, Minoru S.H. Ko, Tsutomu Motohashi, Takahiro Kunisada. Maintenance of Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells in Suspension by the Serum- and Feeder-free Defined Culture Condition. *Developmental Dynamics*. 237, 2129-2138, 2008. 査読有

⑦ Atsushi Kawaguchi, Kairi Chiba, Yu Tanimura, Tsutomu Motohashi, Hitomi Aoki, Tomoko Takeda, Shinichi Hayashi, Katsuji Shimizu, Takahiro Kunisada. Isolation and characterization of Kit-independent melanocyte precursors induced in the skin of Steel factor transgenic mice. *development growth & differentiation*. 50, 63-69, 2008. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 日本分子生物学会 第 32 回年会 「Analysis of multipotency of neural crest cells using mice that transcriptional factor Sox10 is genetically modified.」、2009 12/9-12、横浜、発表者 本橋力

② 42th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biology, Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from embryonic and neonatal skin., 2009 5/28-31 Niigata、発表者 本橋力

③ 第 8 回日本再生医療学会総会「マウス色素芽細胞の持つ多分化能の解析」2009 3/5-6 東京「各種の幹細胞」セッション 座長及び発表 本橋力

④ XXth International Pigment Cell Conference (IPCC) & Vth International Melanoma Research Congress. Concurrent Session 7-5, Multipotent cell fates of melanocyte precursors isolated from embryonic and neonatal skin. May 7-12, 2008, Royton Sapporo, Sapporo, Japan、発表者 本橋力

⑤ 第 7 回日本再生医療学会総会「マウス ES 細胞由来の神経堤細胞の移植応用」、ポスター発表、2008 3/13-14、名古屋、発表者 本橋力

[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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：