

平成 23 年 5 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20610007

研究課題名（和文） 胚性幹細胞を用いた感覚プラコード形成の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of sensory placode differentiation from ES cells

研究代表者

高崎 真美（TAKASAKI MAMI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：80392009

研究成果の概要（和文）：

哺乳類初期発生の試験管内モデル系としてマウス ES 細胞を用い、非神経外胚葉(プラコード・表皮)への分化を誘導する培養条件の検討と分化機序の解明に取り組んだ。その結果、両生類胚での報告と同様に、BMP4 や Dkk1 といった分泌タンパク質が感覚プラコードへの分化制御を担うことを明らかにした。これより感覚プラコードへの分化機序は、進化の過程で保存されている事が示唆された。表皮への分化には、BMP4 シグナルだけでは不十分で、細胞の増殖や分化に影響を及ぼす細胞外マトリックスとの相互作用が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Compared to the research progress made in the subject of neural ectoderm differentiation using the ES cell approach, progress made in non-neural ectoderm differentiation has been slight. To achieve selective differentiation of non-neural ectoderm such as cranial placode and epidermis, We have applied information gained from *Xenopus* research to SFEB culture (Matsuo-Takasaki et al., 2005; Watanabe et al., 2005) using mouse ES cells. We found that BMP4 and Dkk1 are critical factors to induce placode differentiation as reported in *Xenopus* embryo. This suggests that molecular mechanism of placode differentiation is conserved during evolution. We have also found that one of the extra cellular matrix (ECMs), fibronectin supports efficient cell adhesion and induces epidermal cell differentiation from mouse ES cells. These results suggested that BMP signaling and the interaction with ECMs are both necessary for the development of epidermis in mammalian systems.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：発生学・幹細胞学

科研費の分科・細目：時限／幹細胞医・生物学

キーワード：胚性幹細胞、外胚葉、再生医学、発生、分化、プラコード

1. 研究開始当初の背景

(1) 外界からのバリアとして働く表皮(皮膚とその付属器)や、知覚を可能にする感覚器(嗅上皮・レンズ・内耳)は、それぞれ、非神経外胚葉組織、頭部神経板に隣接する特殊化した非神経外胚葉組織である予定感覚プラコード領域(pre-placodal ectoderm、以後、PPE)から発生する。神経外胚葉の分化機序に比べ、初期分化マーカーの不足等の理由により、表皮及び各感覚プラコードの初期発生に関する研究は立ち後れていた。我々は、PPE の運命決定に重要な役割を担う因子の同定とその機能解析を、アフリカツメガエル胚をモデル系として進め、winged-helix 型転写因子 *Xfoxi1a* が感覚プラコード領域の形成に必須なマスター因子である事、BMP と抗-Wnt シグナルの組み合わせが、*Xfoxi1a* 発現を制御する位置情報である事を示し、報告した(Matsuo-Takasaki *et al.*, *Development* 2005)。

(2) 哺乳類初期発生の分子機構については、遺伝子改変動物の手法を使った解析を除いては、これまでほとんど研究が進んでこなかった。その原因として、胎生であり胚が小さい事に加え、アフリカツメガエルで用いられるアニマルキャップ(未分化な細胞集団の塊)を用いた *in vitro* 実験系が、マウスをはじめとする哺乳類には存在しなかったことが考えられる。しかし近年、哺乳類におけるアニマルキャップ実験に相当する、マウス胚性幹細胞(ES 細胞)を用いた *in vitro* 培養法が確立された(Watanabe *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 2005)。SFEB 法と名付けられたこの培養方法は、支持細胞や血清を用いずに ES 細胞を浮遊培養するもので、外因性の増殖因子の効果を直接

評価できることから、選択的組織の分化誘導が可能となった。ES 細胞を用いた外胚葉からの神経分化誘導に関する研究は、国内外で進められているが、非神経外胚葉に由来する表皮や感覚プラコードの分化誘導に関する解析はほとんどなかった

2. 研究の目的

本研究では、上述した両生類研究での知見をマウス ES 細胞の試験管内分化系に応用し、哺乳類における非神経外胚葉、感覚プラコードの効率的な分化誘導法を確立し、さらにはその発生制御の分子機構を明らかにすることを目的として行った。感覚プラコードからは、嗅上皮、レンズ、内耳の有毛細胞といった、多くの重要な感覚器が分化する。本研究により、これら組織への分化機構が明らかになれば、基礎的な発生学のみならず、幹細胞医学研究の基盤学術に繋がり、将来的にはヒト ES 細胞への応用を通して再生医療への橋渡しの役割を果たす研究として期待される。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞の分散浮遊培養の初期に、BMP4、抗 Wnt 因子(DKK1 等)を添加する条件(各因子の至適濃度、添加時期、添加期間、等)を詳細に検討し、非神経外胚葉、予定感覚プラコード原基への効率的な分化条件を決定する。分化の評価は、予定感覚プラコードや表皮特異的に発現する分子マーカーを、免疫ヒストケミストリーや PCR 法を用いて行う。

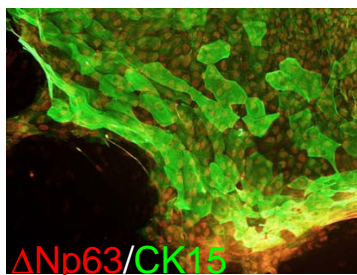
(2) 上記の方法で確立した培養条件下で誘導される、哺乳類の非神経外胚葉形成に関与する新規遺伝子を、マイクロアレイなどの網羅的方法により同定し、その機能を ES 細

胞への強制発現実験などの方法により検討する。

4. 研究成果

(1) 研究代表者は、哺乳類初期発生の *in vitro* モデル系としてマウスES細胞を用い、非神経外胚葉を効率良く誘導する条件の検討と分化機序の解明に取り組んだ。その結果、両生類胚での報告と同様に、BMP4(体軸の腹側化因子)や Dkk1(体軸の前方位因子)といった分泌タンパク質が、予定感覚プラコードへの分化を促進することを明らかにした。このことから、予定感覚プラコードへの分化機序は、進化の過程で保存されている事が示された。今後、予定感覚プラコードから個々のプラコード(嗅上皮・レンズ・内耳)への分化誘導を促す因子の同定を進めたい

(2) 研究代表者は、効率の良い非神経外胚葉への分化条件を見いだすために、細胞外環境因子にも着目して研究を進めた。ES細胞の分散浮遊培養(Watanabe *et al.*, 2005)時にBMP4を添加すると、神経外胚葉への分化は抑制されたがそのまま浮遊培養を続けても未分化な非神経外胚葉のまま、やがて細胞死に至った。そこで、細胞の生存や分化に関与すると考えられるラミニン、ファイブロネクチンといった細胞外マトリックス上に分化途中のES細胞塊を移して長期に接着培養したところ、高い効率で表皮(CK15, ΔNp63陽性)への分化が確認された(下図参照)。これらのことから、非神経外胚葉への分化にはBMP4シグナルだけでは不十分で、細胞の足場となり細胞増殖や細胞分化に影響を及ぼす、細胞外マトリックスとの相互作用が必要であることが示唆された。



(3) 次に、BMP4存在下においてファイブロネクチン上で培養したES細胞の遺伝子発現の変化を、マイクロアレイにより網羅的解析した。その結果、これまでにADAMTS2 (Procollagen I N-protease)やMMP9 (Matrix Metalloproteinase-9)などの酵素が同定された。このうちADAMTS2はヒトにおける皮膚の脆弱性などをおこすEhlers-Danlos syndromeの原因遺伝子の一つとされており、初期発生における非神経外胚葉の分化との関連性が特に注目された。今後、上述の遺伝子のES細胞での強制発現・ノックダウン実験により、非神経外胚葉分化での役割について明らかにしていきたい。

(4) また、初期発生を制御する環境因子として重要と考えられる「酸素濃度」にも焦点を当て、ES細胞から非神経外胚葉分化への影響を評価した。その結果、低酸素濃度(3% Oxygen)条件での培養では、外胚葉のうちでも神経外胚葉への分化が顕著に促進されたのに対し、非神経外胚葉への分化促進は見られなかった。この事より、発生期の表皮分化には、低酸素応答転写因子の関与は考えにくいとの結論を得た。

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 1件)

1) 松尾-高崎 真美、大根田 修、iPS細胞とES細胞の特性と可能性、腎と透析、査読無、66刊、2009、291-296

[学会発表](計 4件)

1) 高崎(松尾)真美、Effects of hypoxia on neural differentiation of mouse embryonic stem cells、第16回国際分化学会国際会議、2010年11月16日、奈良県新公会堂

(奈良県)

2) 高崎(松尾)真美、Analysis of molecular mechanism of non-neural ectoderm differentiation using mouse embryonic stem cells、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、パシフィコ横浜
(神奈川県)

3) 高崎(松尾)真美、Molecular mechanisms of early ectodermal development in vertebrate、若手フェスティバル in 下田、2009年7月3日、下田臨海実験センター(静岡県)

4) 高崎(松尾)真美、選択的ROCK阻害剤(Y-27632)を用いたヒトES細胞培養法、日本組織培養学会第81回大会、2008年5月19日、文部科学省研究交流センター
(茨城県つくば市)

[その他]

ホームページ等

<http://wakate.biol.tsukuba.ac.jp/index.html>

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/younginit/takasaki/ESteam/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高崎 真美 (TAKASAKI MAMI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
助教

研究者番号:80392009

