

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670037

研究課題名(和文) 神経幹細胞の運命を制御する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Neural stem cells have directivity characteristics in the cell fate decision.

研究代表者

笠井 淳司 (Kasai, Atsushi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40454649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：(2)神経幹細胞は、様々な神経系細胞に分化する多能性を有する。本研究では、様々な神経分化誘導法を用いて、神経幹細胞分化前のnoggin処置が、miR-290クラスターの低下等、miRNAの発現パターンを変化させ、セロトニン神経細胞へ分化する割合が上昇することを明らかにした。本結果は、神経幹細胞の多能性には、既に分化指向性がある可能性を示す知見である。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells have pluripotency to differentiate into a variety of neural cells, such as neuron and glia cells. Here, we showed that noggin treatment to embryonic stem cells changed miRNA expression patterns in neural stem cells differentiated by diverse methods and increased serotonin neuronal differentiation. These findings suggest that pluripotency of neural stem cells may be already assigned the directional differentiation.

研究分野：(3) 神経薬理学

キーワード：miRNA 神経幹細胞 セロトニン noggin 運命決定

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は、様々な分化制御を受け中枢神経系細胞を生み出す多分化能と自己複製能を有する細胞と定義される。しかし、成体脳に存在する神経幹細胞は脳領域の微小環境によって細胞系譜が方向付けされていることや、多能性幹細胞から分化初期の時点で特定の神経細胞への運命決定を獲得していることなどから、神経幹細胞に既に特定の神経細胞になる形質を一部獲得している可能性がある。当研究室で確立した iPS 細胞および ES 細胞を起点とする極めて簡素化したセロトニン神経細胞分化誘導法(マトリゲル-Noggin 法)においても、神経幹細胞以前に細胞分化の運命決定がなされていることが示唆されている。

近年の分化制御研究により、細胞系譜決定にはサイトカインなどの細胞外シグナルとエピジェネティクスによる細胞内在性プログラムとのクロストークの重要性が明らかになってきた。特に、成体で生じる神経新生の運命決定は、20 塩基程度の small RNA が制御する転写過程調節に依存することや、iPS 細胞の作製効率が miRNA により改善されることから、両方向性の形質決定に miRNA が重要であることが明らかになっている。

2. 研究の目的

神経幹細胞の運命決定は、神経幹細胞になる以前の刺激が影響するが、その分子機構は不明であった。そこで、本研究では、各種神経細胞分化誘導法により得られる神経幹細胞の miRNA 発現プロファイルと noggin 処置による miRNA 発現変化、また、神経幹細胞の多分化能の解析を行う。

3. 研究の方法

1) マウス ES 細胞の培養

マウス ES 細胞には、E14tg2a EB5 細胞を用いた。0.1%ゼラチンによりコーティングした 10 cm tissue culture dish に 1000 U / mL Leukemia Inhibitory Factor(LIF) 存在下、10%牛胎児血清、ESM (0.1 mM NEAA, non-essential amino acid; Sigma-Aldrich, St Louis, MO; 1 mM sodium pyruvate; Sigma-Aldrich; 0.1 mM 2-メルカプトエタノール; Sigma-Aldrich; を含む GMEM ; GIBCO BRL, Carlsbad, CA) を用いて播種し、5%CO

₂ / 95%air, 37 °C のインキュベーター内で培養した。継代は trypsin-EDTA (GIBCO BRL) を用いて 1 日おきに行った。

2) マトリゲル - noggin 法による 5-HT 神経分化誘導

当研究室で構築したマトリゲル - noggin 法において、noggin は ES / iPS 細胞から神経幹細胞までの分化初期に作用し、5-HT 神経分化を誘導させる[J Neurochem, 2012, 122:81-93]。液状のマトリゲル (Growth Factor Reduced; BD Biosciences) 35 μ l / well を 24-well plate に入れ、セルスクレイパーを用いて均一に広げ、37 °C, 30 分の静置により重合させたものを用いて培養を行った。EB5 細胞をシングルセルに分散、懸濁し、 2×10^4 cells / well の濃度で、ES differentiation medium (ESM / 10% Knockout Serum Replacement; GIBCO BRL) 中に懸濁して、500 μ L / well を播種した。5%CO₂ / 95%air, 37 °C のインキュベーター内で、BMP アンタゴニスト noggin 1%を培養 0~5 日目まで添加して 14 日間培養し、ES 細胞を 5-HT 神経細胞へと分化させた。

3) フィーダー細胞を用いた神経分化誘導法

Barberi らの方法[Nat Biotechnol, 2003, 21:1200-1207]をもとに、新生マウス頭蓋骨由来ストローマ細胞 PA6 細胞との共培養により ES 細胞から神経系細胞(セロトニン神経、神経幹細胞(NSC)、ドパミン神経)への分化誘導を行った(改良型 SDIA 法)。

4) FACS AriaII セルソーターを用いた神経幹細胞の単離

各神経分化誘導法により分化させた細胞集団のうち、CD133⁺ / CD44⁻ / CD271⁻ 細胞を神経幹細胞として、FACS AriaII セルソーター (BD Biosciences)により単離・分取した。

5) miRNA ライブラリの作製および次世代シーケンサーによる miRNA 発現解析

分取した CD133⁺ / CD44⁻ / CD271⁻ の神経幹細胞からの small RNA の抽出は、Purelink microRNA Isolation Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて行った。その後、Small RNA Chip Kit (Agilent, Santa Clara, CA) , 2100 バイオアナライザ (Agilent) を

用い, small RNA 中の miRNA の割合および濃度の測定を行った. 次に, SOLiD Total RNA-Seq キット (Applied biosystems, Foster City, CA) , MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) , Novex 10 % TBE-Urea Gels (Invitrogen) , SOLiD RNA バーコードキット (Applied biosystems) , Pippin Prep (sage science, Beverly, MA) , 3 % Agarose Gel Cassettes (sage science) , Agencourt AMPure XP Kit (beckmancoulter, Brea, CA) を用い, アダプターのハイブリダイゼーション, 逆転写反応, サイズセレクト, バーコードの付加および精製を行い, 次世代シーケンシング解析に必要な miRNA ライブラリを作製した. エマルジョン PCR および次世代シーケンサー SOLiD4 による miRNA 発現解析を行った. シークエンスデータを, 既知の miRNA リファレンス配列にマッピングし, 各 miRNA 発現タグ数を定量評価した.

4. 研究成果

1) 分化初期の Noggin が 5-HT 神経分化に与える影響

Noggin による 5-HT 神経分化誘導作用が, 他の神経分化誘導法においてもみられるか否かについて解析した. フィーダー細胞との共培養による 5-HT 神経分化誘導法, NSC 分化誘導法, DA 神経分化誘導法の各分化開始から 5 日間 noggin を作用させ, その後の 5-HT 神経分化効率を免疫染色法により解析した. その結果, 全ての神経分化誘導法において, 分化初期の noggin により, セロトニン神経分化が促進した (図 1).

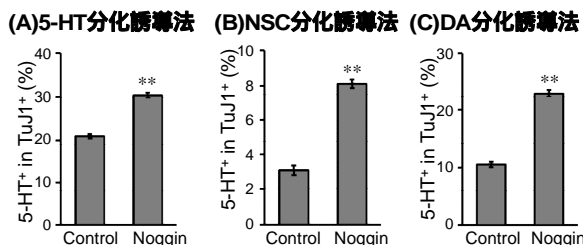


図 1. 各種神経分化誘導法における noggin によるセロトニン神経分化誘導作用. Barberi らの 5-HT 神経細胞分化誘導法(A), NSC 分化誘導法(B)および DA 神経細胞分化誘導法(C)を用い, 培養 14 日目の 5-HT 神経分化の割合を定量化した. 幼若神経細胞マーカー TuJ1 および 5-HT の免疫染色法を用い, TuJ1 陽性細胞中の 5-HT 陽性細胞数の割合を算出した. ** $p < 0.01$ vs. control by student's t-test.

2) マウス ES 細胞から分化誘導した神経幹細胞の分取

各種分化誘導法から回収する神経幹細胞の miRNA の発現比較を行うため, マウス ES 細胞をマトリゲル - noggin 法で 6 日間培養することにより神経幹細胞に分化させ, フローサイトメトリーを用いて, CD133 陽性かつ CD44 陰性かつ CD271 陰性 (CD133⁺ / CD44⁻ / CD271⁻) の神経幹細胞を分取した (図 2). また, Barberi らの方法により分化させた神経幹細胞も同様に分取した. 分取した細胞における nestin 陽性細胞の割合を免疫染色法により解析した結果, マトリゲル-noggin 法および改良型 SDIA 法ともに, 約 90% が nestin 陽性であり, 高純度に神経幹細胞を分取できた (図 2D.)

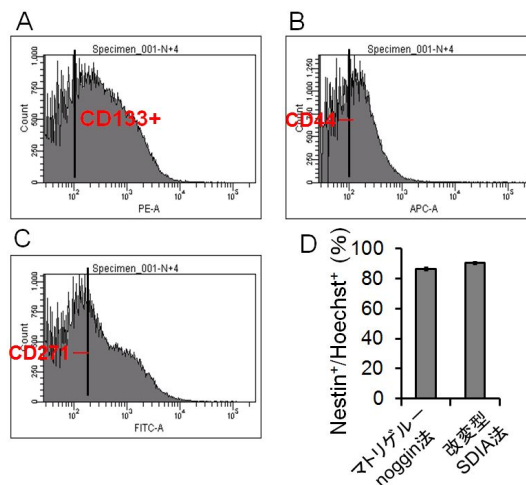


図 2. FACS による神経幹細胞の分取

マトリゲル-noggin 法により分化させた 6 日目の細胞集団から, CD133⁺/CD44⁻/CD271⁻ の細胞を神経幹細胞として分取した (A-C). 同様の方法を用いて, 共培養法により分化させた神経幹細胞の分取もを行い, 神経幹細胞の割合を免疫染色法を用いて定量化した (D).

3) 次世代シーケンサーを用いた miRNA の網羅的解析

分取した神経幹細胞に発現する miRNA の網羅的な解析を次世代シーケンサーにより行ったところ, 約 200 万のリード配列が検出された. 取得したデータを, 1897 種類のリファレンス配列に対してマッピングしリシークエンス解析を行った結果, 1859 種類の miRNA の発現が検出された.

全 miRNA の中で miR-290 クラスターの発現量が最も多かった. miR-290 クラスターは未分化なマウス ES 細胞で高発現し, 多能性の維持に関与することが報告されている [PLOS

Genet, 2011, 7, e1002054]. そこで, miR-290 クラスターが全体に占める割合について解析を行った(図 3). その結果, マトリゲル上での培養 6 日目に神経幹細胞をソーティングしたサンプルでは miR-290 クラスターの割合は 88.0%であったのに対して, noggin を培養初日から 5 日間処置すると 77.7%に低下していた. また, 改変型 SDIA 法による神経幹細胞維持培養 8 日目に神経幹細胞をソーティングしたサンプルでは miR-290 クラスターの割合は 89.1%であったのに対して, noggin を培養初日から 5 日間処置すると 70.6%に低下した. さらに, 改変型 SDIA 法による DA 神経・5-HT 神経分化誘導法の培養 8 日目に神経幹細胞をソーティングしたサンプルでは, miR-290 クラスターの割合はそれぞれ 61.5%, 61.0%であり, 神経幹細胞維持培養法の結果 (89.1%) と比較し減少していた.

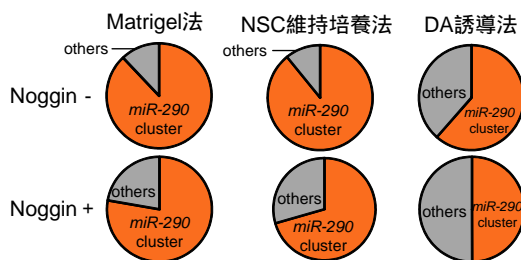


図 3. miR-290 クラスターの発現解析
様々な分化誘導法により得られた神経幹細胞 (上段) および、誘導開始から 5 日間の noggin を作用させて得られた神経幹細胞 (下段) における miRNA 発現プロファイル. すべての分化誘導法において, noggin は共通して miR-290 クラスターの発現量を低下させた.

4) まとめ

様々な神経分化誘導法を用いた noggin の 5-HT 神経分化誘導作用の一般性の確認, さらに, noggin が神経幹細胞の miRNA 発現パターンに与える影響を解析し, 以下の知見を得た.

1. マウス ES 細胞から神経幹細胞, 5-HT 神経, DA 神経への SDIA 法を基にした分化誘導法のいずれにおいても, 神経幹細胞になる前の分化の初期段階に noggin を 5 日間添加することにより, DA 神経分化には影響を及ぼすことなく, 5-HT 神経分化を選択的に促進させた.
2. 神経幹細胞の miRNA 発現プロファイル解析の結果, noggin により細胞の多能性を制御する miR-290 クラスターの発現が抑制されていた.

3. miR-290 クラスターの発現低下は, noggin を用いない 5-HT 神経および DA 神経分化誘導法で分化誘導した神経幹細胞でも共通して観察された.
4. Noggin により共通して変化する miRNA として, 複数の miRNA を同定した (未発表).
5. マトリゲル - noggin 法と改変型 SDIA 法という異なる 5-HT 神経分化誘導法において共通して発現変化がみられる miRNA が存在することを見出した.

これらの結果は, 5-HT 神経分化における初期分化シグナルとして noggin による細胞内シグナル調節が重要であることを示している. また, 神経幹細胞の段階で既に一部の miRNA の発現プロファイルが変化しており, 5-HT 神経への分化指向性が惹起されることを示唆している. 本研究は, 神経幹細胞の多能性が均一なものではなく, 運命決定が既に一部行われていることを示唆する重要な結果であると考えられる.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Atsushi Yamasaki¹, Atsushi Kasai¹, Akihiro Toi¹, Maki Kurita¹, Saki Kimoto, Atsuko Hayata-Takano, Takanobu Nakazawa, Kazuki Nagayasu, Norihito Shintani, Ryota Hashimoto, Akira Ito, Herbert Y. Meltzer, Yukio Ago, James A. Waschek, Yusuke Onaka, Toshio Matsuda, Akemichi Baba, Hitoshi Hashimoto. "Identification of the role of BMP and TGF- signaling in the trajectory of serotonergic differentiation in a rapid assay in mouse embryonic stem cells *in vitro*." ¹equally contribute to this work. *J Neurochem.* 132:418-428 (2015)

[学会発表](計 5 件)

1. 柿原素楽, 笠井淳司, 他 7 名, LPS 誘発炎症モデルにおいて発現変化する脳内 miRNA の同定, 第 126 回 日本薬理学会近畿部会, 2014 年 10 月 24 日, 和歌山県 JA ビル

2. Atsushi Yamasaki、Atsushi Kasai、他 7 名、The balance between BMP and TGF- β signaling at an early stage steers serotonergic differentiation from ES cells. 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台国際センター
3. Atsushi Yamasaki、Atsushi Kasai、他 5 名、Role of TGF- β and BMP signaling in the trajectory of serotonergic differentiation from ES cells. Neuroscience 2013、2013 年 11 月 9 日、San Diego
4. 岡田遼、山崎淳史、笠井淳司、他 4 名、In vitro セロトニン神経誘導モデルにおいてセロトニン神経選択的な発現増加を示す microRNA の in vivo 発現解析、第 124 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 11 月 1 日、京都ガーデンパレス
5. 木本早紀、山崎淳史、笠井淳司、他 5 名、セロトニン神経に特異的に発現する miRNA の同定とその機能解析、第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2013 年 10 月 26 日、沖縄コンベンションセンター

〔その他〕

ホームページ等

<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 淳司 (KASAI, Atsushi)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：40454649