

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840083

研究課題名(和文) 転写因子CDX2を誘導可能なヒトES細胞を用いて腸管上皮細胞を誘導する

研究課題名(英文) Induction of intestinal epithelial cells from CDX2 inducible human ES cells

研究代表者

中武 悠樹 (Nakatake, Yuhki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20415251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトCDX2を誘導した状態で、ヒトES細胞からの腸管上皮誘導法を試行し、免疫染色により分化マーカーの発現を解析したところ、予想とは異なり、小腸上皮細胞への分化が抑制された。トランスクリプトームデータを並列的に解析し、各組織との相同性を計算したところ、CDX2誘導株は、全体として神経細胞に近く、CDX2の下流遺伝子と想定していた腸管内分泌マーカー遺伝子として知られるNEUROG3は、カルシウム作動性かつ電気生理学的な活動電位を有する成熟した神経細胞様細胞へと分化することが確認された。これらの知見は実験計画時には想定していなかったが、結果として論理的に妥当な新知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We have induced human CDX2 in human embryonic stem (hES) cells, and examined their marker expression by immunohistochemistry, revealing unexpected result that showed clear reduction of intestinal epithelial cells after CDX2 induction. Our parallel transcriptome analysis also showed high similarity to neural cell lineage, compared with another adult tissues. We expected NEUROG3 as a downstream gene for CDX2, because it is a marker gene for intestinal secretion cells, but NEUROG3 induced hES cells were differentiated into functional neural cells that show calcium flux and action potential with multiple data from electrophysiological experiments. Finally we could obtain these new observations with a logical validity, although we didn't expect them in our initial plan.

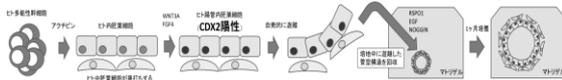
研究分野：分子生物学

キーワード：幹細胞 腸管発生 転写因子 CDX2 NEUROG3 ヒトES細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管上皮細胞は、原腸陥入期の内胚葉細胞から分化発生し、腸管の最外層を形成することで、食物の消化吸収・腸内細菌に対する隔壁として機能する。しかし、放射線腸管障害や炎症性疾患などにより、粘膜による再生が追いつかない程の損傷を受けると、腸機能障害をきたす。成体内の腸管上皮には、Cryptと呼ばれる箇所に、増殖性の高い組織幹細胞が存在しており、そこから杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、吸収上皮細胞が供給されているが、同機構は、胃・食道がんを含む消化器がんで頻発する腸上皮化生との類似性が高く、発ガンと密接に関与すると考えられている。次世代型の腸管上皮細胞を供給する再生医療を実現するためにも、腸管上皮細胞の発生を司る分子機構に注目されるが、ヒトでは遺伝子誘導や遺伝子破壊といった逆遺伝学アプローチを取ることが困難なため、ヒト腸管発生のモデル系を構築することが重要課題となっている。

単純に腸管上皮細胞を供給するには、腸管組織幹細胞の初代培養を行い、大量供給すればよい。これについては、様々な機関が精力的な検討を行っており、国内では東京医科歯科大学や、申請者の所属する慶應義塾大学医学部が中心となり、臨床を念頭に置いた研究が推進されている(JST 再生医療実現拠点ネットワークプログラム：Jungら, Nat. Med. 17, 2011)。初代培養系では腸管上皮の発生メカニズムを模倣することは難しいが、近年、米国オハイオ大学の研究グループにより、iPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞から、腸管上皮細胞および三次元的な管空構造の誘導法が報告された(下図：Spenceら, Nature, 470およびNat. Protocol, 6, 2011)。



この方法は、ヒトiPS/ES細胞にActivinAを添加することで内胚葉へと誘導した後、増殖因子カクテルを変化させることで、CDX2陽性の胚体内胚葉、前腸内胚葉細胞へと、小腸発生を段階的に模倣する。最終的に立体的な管空構造を構築できるため、肺芽や他の組織様構造作製にも応用されているが、分泌細胞マーカーであるCGA陽性細胞は1~2%程度と計算され、終末分化細胞の作製効率の改善が望まれている。小規模研究として、熊本大学においてはiPS細胞を基点とした腸管上皮細胞への分化誘導が、名古屋市立大学においては腸管上皮細胞の機能を利用した薬物スクリーニングの評価系構築が試みられているが、分化誘導効率の改善には至っていない。ヒト腸管発生の分子メカニズムを正しく理解し、細胞分化を制御するためには、逆遺伝学的アプローチが必須となるが、遺伝子操作と培養環境操作を組み合わせることは一般には困難なため、多くがブラックボックスのままである。

申請者は前年まで、留学先の米国衛生研究所にて、転写因子を用いたマウスES細胞の網羅的な分化誘導実験に携わっていた。現所属から、転写因子を薬剤にて誘導できるヒトES細胞株を、網羅的に作製しており、現時点で200を超える転写因子の薬剤誘導株の作製を完了している(所属研究室プロジェクト：CREST生命動態山本班【動的遺伝子ネットワーク解析】)。

申請者の先行研究において、樹立したヒトCDX2発現誘導株は、野生型とは異なる細胞形態を有し、次世代シーケンサーを用いて発現解析したところ、腸管に特異的な遺伝子群(KLF5, TMEM35, GSN, PALLD)発現が上昇することが明らかとなった。Cdx2は、マウスにおいては胎生期初期の腸管形成時から成体までの一貫して腸管上皮に強く発現し、Cdx2欠損マウスはCrypt形成不全により、小腸の形成不全が生じる(Silbergら GASTROENTEROLOGY, 119, 2000、およびTamaiら CANCER RESEARCH 59, 1999)。ヒトにおいてもCDX2は消化管上皮に非常に特異的に発現し、CDX2変異は、小腸、食道、胃、大腸など、消化管がんに関与することが広く知られる(Guoらによる総説, Cancer Biol Ther., 7, 2004)。以上を考え合わせると、CDX2を誘導した細胞は、小腸上皮細胞などの消化管組織構造になり易いと考えられるため、本研究で検討する。

2. 研究の目的

遺伝子誘導と培地組成による分化誘導を組み合わせ、腸管上皮細胞・三次元構造の高効率な誘導を目指す。

まずは、既に樹立しているヒトCDX2誘導株を用いて、腸管上皮細胞に特化した培養条件で、分化誘導能が改善するか検討する。培養条件は、所属機関で行われている初代培養法と、段階的にES/iPS細胞を分化させるSpenceらの方法を、それぞれを検討する。その際は、CDX2誘導の日数を段階的に減少させ、遺伝子誘導時間の最適化を行う。続いて、腸上皮に発現するKLF5, ASCL2, SOX9, NEUROG3を導入・誘導し、分化誘導能の変化を知る。分化誘導能の評価は、最終分化状態である内分泌細胞マーカー(CGA)を免疫染色する。並行して、マウスEpiBlast stem (EpiS)細胞から、同条件を用いて腸管幹細胞の誘導を試みる。Cdx2が誘導可能なマウスES細胞は、前所属で既に樹立されており(西山ら, CellStemCell, 2009)、マウスEpiES細胞は、ヒトES/iPS細胞と近い細胞状態であるため、本研究で得られる知見を補強し、種差を分子生物学的に理解できる。

申請者は現在、200を超えるヒト転写因子に対して、網羅的に薬剤誘導型ヒトES株を既に作出している。転写因子誘導後のヒトES細胞の形態学的な変化から、既に得られている遺伝子誘導株のうち、およそ半数、つまり100以上の遺伝子誘導株が何らかの表現型を

有すると期待しているが、現行のプロジェクトは、網羅的な遺伝子動態解析とバイオリソースの創出がメインであり、単一細胞系譜を逐一解析することは現実的に不可能である。対して、本研究では、転写因子 CDX2 からのインプットに焦点を合わせ、単一細胞系譜（腸管上皮細胞）へのポテンシャルを実証的に検証することを目的とする。詳細な個別研究をすることで、リソースの有用性を示すことができ、予測モデルの妥当性を検証できるため、研究上の相互作用が高い。

3. 研究の方法

《平成 26 年度の計画：ヒト幹細胞での逆遺伝学的アプローチ》

① ヒト CDX2 を誘導した状態で、Spence らが開発した ES 細胞からの腸管上皮誘導法を試行

（留意点）培養系は原始内胚葉、胚体内胚葉、前腸内胚葉細胞と遷移する。遺伝子誘導のウィンドウを絞ることで、CDX2 誘導が効果的な分化状態が特定できる。CDX2 誘導単独によって分化誘導能が上昇しないケースでも、複数転写因子を同調的に誘導することで検討を重ねる。Spence らの方法でマーカー遺伝子として使用されている転写因子 KLF5, ASCL2, SOX9, NEUROG3 について、優先的に検討する。CDX2 誘導が効果的な期間が初期であれば KLF5、後期であれば NEUROG3 との共誘導により、腸管上皮細胞へ分化が促進すると予想している。

② 佐藤らの用いる初代培養条件で、CDX2 を誘導した ES 細胞を培養

（留意点）腸管上皮の初代培養が行えるという事は、必要な外的要因が備わっているという事である。上述の実験結果を元に、複数の転写因子の誘導で直接的に細胞運命が転換するか検討する。

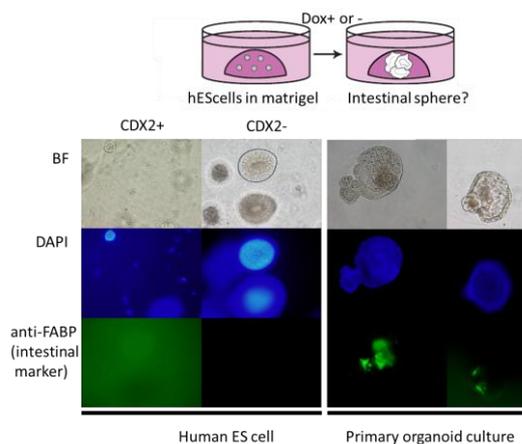
《平成 27 年度の計画：マウス EpiS 細胞にて、前年の知見を追証》

（留意点）マウス EpiS 細胞は前所属研究室で培養されており、簡便に誘導可能であることが分かっている。ヒト幹細胞の培養環境に近いと、ほぼ同様に実験できると予想する。ヒトとマウスで転写因子の表現型が大きく異なる場合、ヒト・マウスでのネットワーク解析として発表できる。

4. 研究成果

平成 26 年度の計画は、ヒト CDX2 を誘導した状態で、ヒト ES 細胞からの腸管上皮誘導法を試行する事であった。当初の計画通りに試行したところ、浮遊した 3 次元構造が得られたものの、CDX2 誘導によって 3 次元構造が増えたとは判断できなかった。逆に、構造自体は減少する傾向が観察された。免疫染色により分化マーカーの発現を解析したところ、遺伝子誘導自体は十分に CDX2 の発現量が確保されていたものの、予想とは異なり、小腸上皮細胞への分化は抑制される結果が得ら

れた（下図）。



並行して行われているプロジェクトにより、トランスクリプトームを詳細に解析し、他の転写因子が誘導された株のトランスクリプトームデータを並列的に解析し、各組織との相同性を計算したところ、CDX2 誘導株のトランスクリプトームは、全体として神経細胞に近いことが明らかとなった。同様のアプローチによって、CDX2 の下流遺伝子と想定していた NEUROG3 も同様に神経細胞に近いと考えられ、実際に神経細胞様の細胞分化を引き起こすことなどが明らかとなった。

NEUROG3 は、神経細胞の他、内分泌細胞系譜においても機能することが知られ、小腸上皮細胞誘導実験系においても、後期の分泌細胞出現時期に発現することが報告されている。このため、ES 細胞を一度腸管上皮様細胞へと分化させてから、NEUROG3 誘導を試み、分泌細胞の増減を検討した。しかし、ここでも予想に反し、未分化状態維持培地と同様に、NEUROG3 誘導株は神経様細胞へと分化した（下写真）。CDX2 誘導株も神経細胞様のトラ



ンスクリプトームを獲得していることを考え合わせると、計画時に用意していた転写因子セットを用いて、神経細胞を誘導することは容易であると考えられるが、腸管への分化誘導は困難と考えられた。成体における CDX2 の発現は、小腸上皮に強いものの、視床下部、脳梁、海馬などの神経細胞に発現することが報告されており、申請者らのトランスクリプトーム解析においても、これらの神経組織と相同性が高いことが明らかとなった。また、未分化な ES 細胞の培養条件は、神経細胞の培養条件と近いことが知られ、マウスおよびヒト ES 細胞は神経細胞へと分化する傾向が強いことも示唆されている。実際、腸管内分泌マーカー遺伝子として知られる NEUROG3 を、我々が開発した遺伝子誘導法にて、ヒト ES 細胞において強発現したところ、カルシウム

イメージング法ならびにパッチクランプ法により、カルシウム作動性かつ電気生理学的な活動電位を有する成熟した神経細胞様細胞へと分化することが確認された。これらの事実は、実験計画時には想定していなかったが、結果として論理的に妥当な新知見を得ることができた。

現在、得られた新知見をまとめ、論文を作成し、投稿手続きを進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. **著者名** : Motohashi T, Watanabe N, Nishioka M, Nakatake Y, Yulan P, Mochizuki H, Kawamura Y, Ko MS, Goshima N, Kunisada T
論文表題 : Gene array analysis of neural crest cells identifies transcription factors necessary for direct conversion of embryonic fibroblasts into neural crest cells,
雑誌名 : Biol Open. (査読有)
巻 : 5 (3)
発行年 : 2016 年
doi : 10.1242/bio.015735
ページ数 : 12

[学会発表] (計 5 件)

1. **発表代表者名** : Yuhki Nakatake
発表表題 : Large-Scaled Transgene Activation on Human Embryonic Stem Cells
学会等名 : 第 14 回幹細胞シンポジウム
発表年月日 : 2016 年 05 月 20-21 日
発表場所 : 淡路島夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)
2. **発表代表者名** : 中武悠樹
発表表題 : ヒト多能性幹細胞の分化運命を決定する転写因子の網羅的同定と細胞分化制御技術の開発
学会等名 : 第 15 回日本再生医療学会
発表年月日 : 2016 年 3 月 17-19 日
発表場所 : 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
3. **発表代表者名** : Yuhki Nakatake
発表表題 : Large-Scaled Transgene Activation on Human Embryonic Stem Cells
学会等名 : ISCB2015
発表年月日 : 2015 年 11 月 23-25 日
発表場所 : シンガポール (シンガポール)
4. **発表代表者名** : Yuhki Nakatake
発表表題 : Large-Scaled Transgene Activation on Human Embryonic Stem Cell

学会等名 : JST - CREST - PRESTO joint international symposium ~Structural Biological Dynamics:From Molecules to Life with 60 trillion Cells~
発表年月日 : 2015 年 11 月 05-06 日
発表場所 : 東京大学伊東ホール (東京都文京区)

5. **発表代表者名** : Yuhki Nakatake
発表表題 : Comprehensive transcriptional factor screening for trophectodermal lineage in human ES cells
学会等名 : CHIR-JST meeting
発表年月日 : 2015 年 10 月 29-30 日
発表場所 : トロント (カナダ)

[図書] (計 1 件)

1. **著者名** : 山水康平、中武悠樹、洪繁、洪実
出版社名 : 羊土社
書名 : 実験医学増刊 Vol. 33 No. 2
発行年 : 2015 年
総ページ数 : 8 頁 (239-246)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中武 悠樹 (Nakatake Yuki)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 20415251

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし