

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860386

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞からのかゆみ末梢神経誘導法の開発とその特性化

研究課題名(英文) A method to differentiate peripheral neurons mediating itch from human induced pluripotent stem cells

研究代表者

梅原 芳恵 (UMEHARA, Yoshie)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：40707072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではinduced pluripotent stem (iPS) 細胞技術に着眼し、難治性かゆみの治療法の開発に向けて、ヒトiPS細胞(hiPSC)からの末梢かゆみ神経の誘導法について検討した。その結果、hiPSC由来の神経堤(NC)細胞(hiPSC-derived NC細胞)を効率よく誘導することに成功し、さらにそれらの細胞から多数のヒト末梢神経細胞を得ることに成功した。本研究成果によりヒト末梢神経(DRG)細胞の詳細な解析が可能となり、より効果的なかゆみの新規治療法の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established a method to differentiate peripheral neurons from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). Our method provided robust induction of neural crest (NC) cells from hiPSCs. Moreover, human peripheral neurons were efficiently differentiated from hiPSCs-derived NC cells. This method enables detailed analysis of human DRG neurons and informs development of new therapies for patients with intractable pruritus such as atopic dermatitis.

研究分野：分子発生学、かゆみ科学

キーワード：末梢神経 ヒトiPS細胞 難治性かゆみ

### 1. 研究開始当初の背景

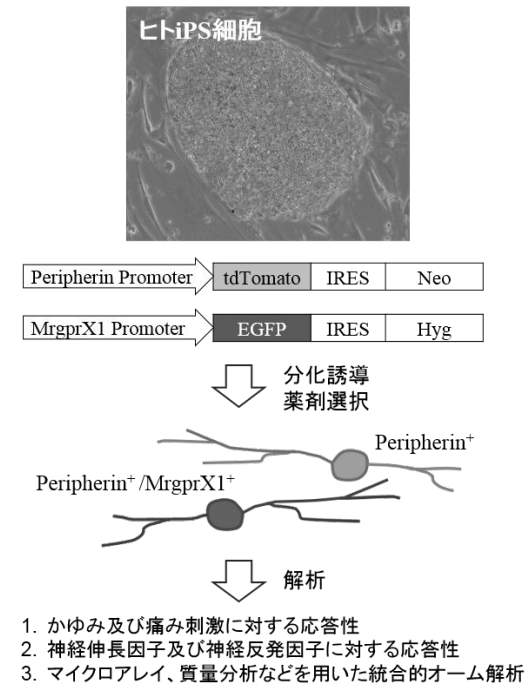
正常な皮膚バリアは種々の外部刺激から身体を防御し、適度な水分を体内に保持する役割を持つ。皮膚バリアの機能が破綻しているアトピー性皮膚炎(AD)や乾皮症患者の皮膚は、容易に外界の刺激を受けるとなり、抗ヒスタミン薬が奏功しない難治性のかゆみを引き起こす。かゆみは強い搔破行動と湿疹の増悪をもたらし、患者の quality of life (QOL) を著しく低下させる。特に、AD 患者は痛み刺激でかゆみが誘発されるなどの知覚異常があるため、搔破により病態が悪化する。しかし、難治性かゆみを制御する方法は確立されておらず、幅広い視点に立った病因解明と新規止痒治療薬の開発が切望されている。

近年、トランスジェニックマウスを用いた研究により、ガストリン放出ペプチド gastrin-releasing peptide (GRP) が脊髄内投与によりマウスの搔破行動を誘発すること、GRP 受容体 (GRPR) が脊髄後角におけるかゆみ伝達に關与することが報告された (Sun *et al.*, *Nature*, 2007, 448:700-703)。また、我々の研究グループでは、GRP 含有神経線維は表皮内にも分布することを明らかにし、AD モデルマウスではコントロールマウスと比較して、その分布密度が高いことを報告している (Tominaga *et al.*, *J Invest Dermatol*, 2009, 129: 2901-2905)。さらに、マウスにおいて抗マalaria薬クロロキンの受容体である Mas-related G protein-coupled receptor (Mrgpr) A3 を発現する後根神経節 (DRG) 細胞が末梢から脊髄へのかゆみ伝達に關与すること、それら神経細胞が脊髄後角において GRPR 陽性神経とシナプスを形成していることが明らかにされた (Han *et al.*, *Nat Neurosci*, 2013, 16: 174-182)。先行研究により、ヒトにおけるクロロキンの受容体は MrgprX1 であり、ヒト MrgprX1 遺伝子が DRG で特異的に発現することが報告されている (Lembo *et al.*, *Nat Neurosci*, 2002, 5: 201-209)。このようにマウスにおいては細胞培養や遺伝子工学的手法を用いた研究により、かゆみの神経伝達に關与する分子や細胞が明らかにされつつある。しかし、ヒトにおいてそれらの手法は使えず、ヒトにおいて MrgprX1 陽性 DRG 細胞がかゆみ特異的な末梢神経であるかについては不明のままである。加えて、末梢神経を対象に行われている他の研究に關しても、モデル動物の DRG 細胞とヒトの DRG 細胞が同様の機能や役割を担っているかどうかは不明である。

これらの問題を解決し、AD 患者の知覚異常に基づく難治性かゆみを克服するには、ヒトの DRG に存在する末梢かゆみ神経を病態生理学的に研究することが必要である。しかし、ヒトから DRG 細胞を採取し、研究材料にすることは倫理的に困難であることから、これまでヒト末梢神経 (DRG) 細胞の詳細な解析は行われていない。

### 2. 研究の目的

本研究では induced pluripotent stem (iPS) 細胞技術に着眼し、難治性かゆみの治療法の開発に向けて、ヒト iPS 細胞からの末梢神経誘導法の開発とそれを活かした末梢かゆみ神経の特性化を目指す (図 1)。



**図 1. ヒト iPS 細胞を用いた末梢かゆみ神経の誘導法の開発の概要**

### 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞は理研 BRC より提供を受けた 201B7 株を使用した。ヒト末梢神経の誘導法は Lee らの方法を参考に、ヒト iPS 細胞 (hiPSC) から神経堤 (NC) 細胞を誘導し、さらにその hiPSC 由来の NC 細胞 (hiPSC-derived NC 細胞) から末梢神経を誘導する方法を検討した (Lee *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2007, 25:1468-1475)。

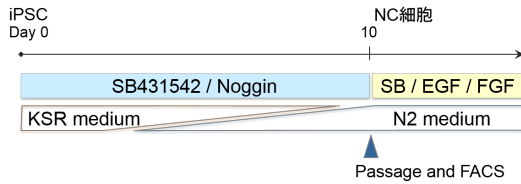
#### (1) hiPSC-derived NC 細胞の誘導

マトリゲルコートをしたディッシュでヒト iPS 細胞を分散培養し、50%コンフルエントになった時点から培地に Noggin (500 ng/ml) および SMAD シグナル伝達阻害剤 (SB431542, 10 μM) を添加し、NC 細胞への分化誘導を開始した。その間、培地は 15% Knockout serum replacement (KSR)/ Knockout DMEM から N2 サプリメントを加えた DMEM/F12 へ置換した。10 日後に継代および FACS による解析を行った (図 2a)。NC 細胞のマーカーである CD271 及び CD57 の発現解析を行い、CD271 及び CD57 共発現細胞を NC 細胞として NC 細胞への分化誘導効率を調べた。hiPSC-derived NC 細胞はポリ-L-オルニチン/ラミニン/フィブロネクチンコートをしたディッシュを用いて SB431542 (SB; 10 μM)、EGF (10 ng/ml)、FGF (10 ng/ml) を含む培地で培養を行った。

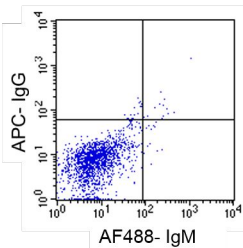
## (2) ヒト末梢神経細胞の誘導

得られた hiPSC-derived NC 細胞を BDNF (10 ng/ml)、アスコルビン酸 (200 μM)、GDNF (10 ng/ml)、NGF (10 ng/ml)、ニューロトロフィン-3 (10 ng/ml)、cAMP (0.5 mM) を含む培地で 14 日間培養し、末梢神経への分化誘導を行った。

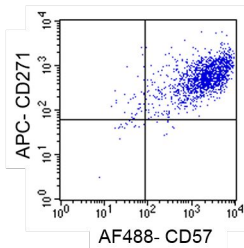
### (a) NC細胞の分化誘導プロトコール



### (b) アインタイプコントロール



### (c) CD271/ CD57



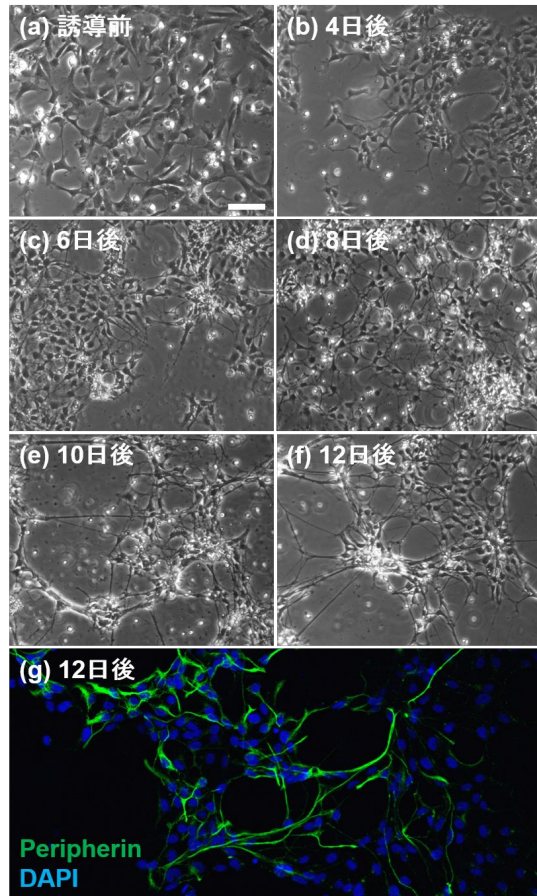
## 図 2. hiPSC-derived NC 細胞の誘導

分化誘導プロトコール(a)。分化誘導 10 日後の細胞を用いて CD271 及び CD57 の発現解析を行った(b、c)。

## 4. 研究成果

本研究においてヒト iPS 細胞から NC 細胞への分化誘導方法を検討した結果、CD271 及び CD57 を共発現する hiPSC-derived NC 細胞を非常に高い効率 (8 割以上) で分化誘導することに成功した (図 2c)。これまでヒト多能性幹細胞 (ES 細胞及び iPS 細胞) から NC 細胞への分化誘導法について多くの研究がなされてきたが、その分化誘導効率は 1 割程度であり、NC 細胞を FACS により単離し、濃縮する必要があった (Lee *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2007, 25:1468-75)。しかし本研究では効率よく hiPSC-derived NC 細胞を得ることができたため、それらの細胞全てを継代し、その後 FACS による単離を行わずに培地交換を行うことで hiPSC-derived NC 細胞から末梢神経への分化誘導を試みた。その結果、分化誘導 4 日後から軸索の伸長が観察され (図 3b)、8 日後では長い軸索を持ち神経細胞様の形態を示す細胞が観察された (図 3d)。12 日後にはペリフェリン陽性のヒト末梢神経細胞を多数得ることができた (図 3f、g)。今後はこれらのヒト末梢神経細胞を用いてかゆみ及び痛み刺激に対する応答性や、神経伸長因子及び神経反発因子に対する応答性等を検討する予定である。

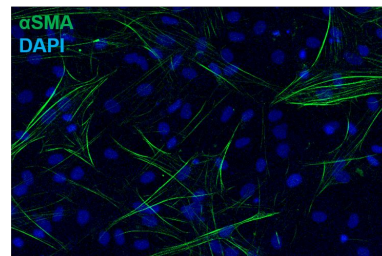
NC 細胞は末梢神経の他にも骨細胞や色素細胞に分化する多能性を持つ細胞である。そのため、hiPSC-derived NC 細胞の筋線維芽細胞への分化能について検討した。その結果



## 図 3. ヒト末梢神経細胞の誘導

hiPSC-derived NC 細胞(a)を用いて末梢神経への分化誘導を行ってから 4 日後(b)、6 日後(c)、8 日後(d)、10 日後(e)、12 日後(f、g)の様子。12 日後には末梢神経のマーカであるペリフェリンの発現が観察された(g、緑色)。

-smooth muscle actin (-SMA) 陽性の細胞が観察され、本研究において誘導した hiPSC-derived NC 細胞は筋線維芽細胞へ分化する能力も持つことが示唆された (図 4)。hiPSC-derived NC 細胞の誘導効率の上昇は、NC 細胞から分化する末梢神経以外の細胞の研究にも貢献できると考えられる。



## 図 4. 筋線維芽細胞の誘導

筋線維芽細胞マーカーの一つである -SMA の発現が観察された(緑色)。

本研究成果により、これまで制限されていたヒト末梢神経 (DRG) 細胞の詳細な研究が可能となる。かゆみの発生機序を多様な視点

から分子レベルで解明することにより、メカニズムが全く未知である「かゆみ過敏」に関する因子の同定や、より効果的なかゆみの新規治療法の開発に貢献できると考えられる。

#### 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 5 件)

1. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Cathelicidin LL-37 induces semaphorin 3A expression in human epidermal keratinocytes: implications for possible application to pruritus. *J Invest Dermatol*, 135: 2887-2890, 2015 査読有
2. Kamo A, Tominaga M, Matsuda H, Kina K, Kamata Y, Umehara Y, Ogawa H, Takamori K. Neurotrophin suppresses itch-related behavior in NC/Nga mice with atopic dermatitis-like symptoms. *J Dermatol Sci*, 81: 212-215, 2016 査読有
3. Ko KC, Tominaga M, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Takahashi N, Kina K, Ogawa M, Ogawa H, Takamori K. Possible anti-pruritic mechanisms of cyclosporine A in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, in press, 2016 査読有
4. Kamata Y, Tominaga M, Sakaguchi A, Umehara Y, Negi O, Ogawa H, Takamori K. Retinoid-related orphan receptor is involved in induction of semaphorin 3A expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 79: 84-86, 2015 査読有
5. 富永 光俊、鎌田 弥生、梅原 芳恵、Kyi Chan Ko、加茂 敦子、高森 建二 アトピー性皮膚炎 かゆみのメカニズム . *J Environ Dermatol Cutan Allergol* ,9 (1), 1-11, 2015 査読有

[学会発表](計 15 件)

1. Umehara Y, Tominaga M, Matsuda H, Kamata Y, Takamori K. Establishment of differentiation method for peripheral neurons mediating itch from human induced pluripotent stem cells. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015) 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 2015 年 12 月
2. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. The effects of cathelicidin LL-37 on semaphorin 3A expression in normal

human epidermal keratinocytes. 8<sup>th</sup> World Congress on Itch (WCI), Nara (Japan), Sep 2015

3. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. The antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 induces semaphorin 3A production in normal human epidermal keratinocytes. Society for Investigative Dermatology Annual Meeting, Atlanta (USA), May 2015
4. 梅原 芳恵、鎌田 弥生、富永 光俊、François Niyonsaba、小川 秀興、高森 建二 抗菌ペプチド LL-37 は培養正常ヒト表皮角化細胞における神経反発因子 semaphorin 3A の発現を促進する 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、島根県民会館 (島根県松江市) 2015 年 11 月
5. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Takamori K. Antimicrobial peptide LL-37 induces semaphorin 3A in normal human epidermal keratinocytes (抗菌ペプチド LL-37 は正常ヒト表皮角化細胞における semaphorin 3A の発現を誘導する) 第 24 回 国際痒みシンポジウム、東京、2014 年 10 月

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 抗菌ペプチドによるセマフォリン 3A の発現調節法  
発明者: 梅原 芳恵、鎌田 弥生、富永 光俊、ニヨンサバ フランソワ、高森 建二  
権利者: 学校法人順天堂、東レ株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-177778  
出願年月日: 2014 年 9 月 2 日  
国内外の別: 国内
2. 名称: 掻痒性皮膚疾患の治療又は予防剤  
発明者: 梅原 芳恵、鎌田 弥生、富永 光俊、ニヨンサバ フランソワ、高森 建二  
権利者: 東レ株式会社  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2015/ 74906  
出願年月日: 2015 年 9 月 2 日  
国内外の別: 国外

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅原 芳恵 (UMEHARA, Yoshie)  
順天堂大学大学院・医学研究科・博士研究員  
研究者番号: 40707072

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

富永 光俊 (TOMINAGA, Mitsutoshi)

順天堂大学大学院・医学研究科・准教授

研究者番号：50468592

松田 浩則 (MATSUDA, Hironori)

順天堂大学大学院・医学研究科・技術員