

高橋 淑子

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科・教授

神経堤細胞をモデルとした生体内での細胞リプログラミング法の開発

§1. 研究実施の概要

本 CREST 研究においては、神経堤細胞 (NC 細胞) を中心とする胚体内の幹細胞及びそれ由来する細胞系譜をモデルとして、生体内における細胞リプログラミング研究を通して、幹細胞の維持機構や細胞分化機構を理解することを目標としている。NC 細胞の分化やリプログラミングには、転写因子やエピジェネティック因子などをさまざまに組み合わせた遺伝子操作が有効であると考えられる。平成 22 年度 (22 年 4 月～23 年 3 月末) においては、NC 細胞の生体内操作が高解像度で行えるニワトリ胚を用いて、生体内リプログラミングに適した遺伝子操作法の開発と、導入遺伝子の時・空間特異的な発現システムの改良プロジェクトを継続させた。これら新規方法論は極めて有効であり、後期 NC 細胞の動態に関して新規知見を得つつある。またこれらの解析をとおして、「第3の神経幹細胞」ともいべき全く新しい幹細胞の発見とその操作法の展開が見えてきた (主に高橋グループ)。主に國貞グループによる研究により、未分化 (あるいは幹細胞) NC 細胞に発現する Sox10 と EGFP を融合させた遺伝子をもつ Sox10-IRS-EGFP マウスの樹立がほぼ終了した。これらのマウス系統と FACS ソートと組み合わせることにより、感覚神経前駆細胞 (EGFP+Kit-CD45-) と色素細胞前駆細胞 (EGFP+Kit+CD45-) が異なる分画として精製されることがわかった。また Sox10-IRS-EGFP マウスから樹立した ES 細胞を ST2細胞フィーダーと共培養することにより、NC 細胞分化ポテンシャルを *in vitro* 環境で幅広く操作することが可能となった。

エピジェネティック因子の探索に関しては、主にカエル胚遺伝子注入法とショウジョウバエ遺伝学を用いたスクリーニングが順調に進行しており、特にクロマチンの不活性化に働くヒストン H3 メチル化酵素 Ezh2 やクロマチンの活性化を促進する脱メチル化酵素 Jmjd3 が、NC 細胞の正常な分化過程に重要であることが見えてきた (主に荻野グループ)。これまでのエピジェネティック研究のほとんどが培養細胞を用いたものであるのに対し、本研究は生体内におけるエピジェネティック効果を直接的に検証するものとして先駆的である。またショウジョウバエを用いたスクリーニングにより、約 50 個のエピジェネティック関連遺伝子が同定され、これらのいくつかは、神経突起の機能分化に重要であることが示されるなど、ショウジョウバエの利点を最大限活かした1細胞レベルで

の高解像度解析が順調に進行している(主に榎本グループ)。

§ 2. 研究実施体制

(1)「高橋」グループ

① 研究分担グループ長:高橋 淑子(奈良先端科学技術大学院大学、教授)

② 研究項目

- ・ 生体内における NC リプログラミング法に向けた基盤作り(遺伝子導入法の開発)

(2)「國貞」グループ

① 研究分担グループ長:國貞 隆弘(岐阜大学、教授)

② 研究項目

- ・ 生体内における NC リプログラミング法に向けた基盤作り(NC 分化制御因子の検証)

(3)「荻野」グループ

① 研究分担グループ長:荻野 肇(奈良先端科学技術大学院大学、特任准教授)

② 研究項目

- ・ 生体内における NC リプログラミング法に向けた基盤作り(NC 分化制御因子の検証)

(4)「榎本」グループ

① 研究分担グループ長:榎本 和生(大阪バイオサイエンス研究所、研究部長)

② 研究項目

- ・ NC リプログラミングにおけるエピジェネティック効果の検証(Loss of Function によるエピジェネティクス因子スクリーニング)

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

A. 高橋グループ (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

1. NC 細胞をターゲットにした、局所的かつ安定的遺伝子操作法の確立

NC 細胞研究にはトリ胚が最も適したモデル動物の一つであり、トリ胚操作には遺伝子のエレクトロポレーション法が極めて有効であることはいままでもない。しかしながら NC 細胞はその高い増殖能のため、従来のエレクトロポレーション法では導入遺伝子の発現が一過的であり、後期 NC 細胞の研究には適さなかった。そこで、我々が以前報告した Tol2-トランスポゾン法を用いて、NC 細胞内での遺伝子長期発現法を確立した。Tol2 法と NC 特異的 Sox10 エンハンサー (我々が同定) とを組みあわせることにより、NC を運動神経などと区別して操作することが可能になった^{A-1, 2, 3)}。さらに Cre/lox 法の導入により、Sox10 エンハンサーにより活性化された導入遺伝子を半永久的に発現させることができた^{A-4)}。これらの方法を Tet-on などと組みあわせれば、後期 NC 細胞のコンディショナルな遺伝子操作法が可能となり、リプログラミング法の基盤整備に向けて大きなステップといえる。

2. 「第3」の神経幹細胞の発見

NC 細胞は間葉系の神経幹細胞とみなされており、中枢神経系幹細胞と共に「2大神経幹細胞」として注目されている。本 CREST 研究において NC 細胞研究が進行する過程の中で、「第3の神経幹細胞」ともいふべき、これまでとは全く異なる幹細胞の存在の可能性を見出した^{A-5)}。これらの細胞は体の後方のみに位置し、Secondary Neurulation (SN) とよばれる発生様式に寄与する神経幹細胞/神経前駆細胞である。SN 過程では、もとは間充織の神経前駆細胞が上皮化の過程を経て神経管をつくるなど、体の前方でみられる Primary Neurulation (神経細胞シートが折りたたまれてできる) とは全くことなる。SN は 70 年以上も前に古典発生学的な記載がされているものの、その形成機構については未知のままである。我々の発見は、神経幹細胞の動態やそのリプログラミング機構の理解に向けて、新たな貢献をもたらすことが期待される。

B. 國貞グループ (岐阜大学大学院 医学系研究科)

昨年度開始した実験シリーズをさらに進め、以下の結果を得た。昨年度既に作製済みの Sox10-IRES-EGFP マウスを用いて、色素細胞前駆細胞や感覚神経前駆細胞などの神経堤由来細胞が特異的に標識されることを各前駆細胞のマーカーと二重染色することで確認した。これらの細胞は、12.5 日胚から採取した背部皮膚および背根神経節からセルソーターを用いて EGFP+Kit+CD45⁻ (色素細胞前駆細胞) および EGFP+Kit-CD45⁻ (感覚神経前駆細胞) 分画の細胞として精製できることを確認した。色素細胞前駆細胞現在の分化能力を、神経堤細胞から色素細胞・神経細胞への分化を支持する ST2 ストロマ細胞株との共培養により確認し、色素細胞と

神経細胞へ分化することを確認した。さらに、Sox10-IRES-EGFP マウス ES 細胞を ST2 と共培養し、色素細胞前駆細胞が EGFP+Kit+CD45-細胞として出現し、色素細胞及び神経細胞へ分化することを確認した。以上の成果により、色素細胞前駆細胞や感覚神経細胞から iPS 細胞を経由せずに直接神経堤幹細胞や生体の皮膚に存在する神経堤由来の幹細胞 (SKP 細胞) へのリプログラミングを検証できる実験系が確立された^{B-1)}。リプログラミング関連遺伝子の候補を調べるために、米国 NIH の Koらと共同で発生初期(段階別)に採取した Sox10-IRES-EGFP マウスの神経堤細胞(色素細胞前駆細胞や感覚神経細胞)の精密な遺伝子発現情報をDNAアレーにより網羅的に調べあげること成功した。現在神経堤幹細胞に特異的なあるいは幹細胞に共通するリプログラミング関連遺伝子の候補を探索している。

C. 荻野グループ(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

NCで発現し、クロマチンの不活性化に働くヒストン H3 メチル化酵素 Ezh2 と、逆に活性化を促進する H3 脱メチル化酵素 Jmjd3 について、それぞれの全コード配列をツメガエルのゲノム

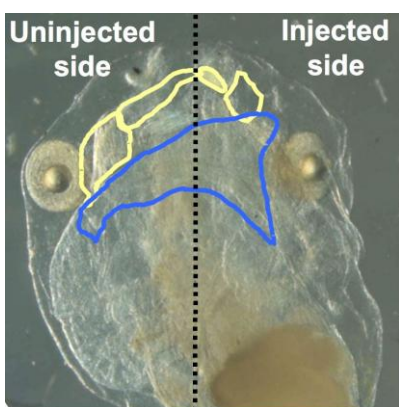


図1 *Jmjd3* mRNAのインジェクションによる顎骨形成の異常。上顎骨と下顎骨の輪郭をそれぞれ黄色と青色で示す。

解読結果^{C-2)}を用いて同定し単離した。次に、それらの強制発現実験をツメガエル胚においておこなった。神経堤マーカーである *Twist* 遺伝子の発現を調べたところ、*Ezh2* を発現させた胚では、第2、第3、第4咽頭弓に移動する NC 細胞が顕著に増大していた。また、*Jmjd3* を発現させた胚は第1咽頭弓に移動する NC 細胞をほとんど失い、発生の後期には顎骨の形成不全を起こした(図1左)。これらの発見は、ヒストン H3 のメチル化と脱メチル化の適切なバランスが NC の発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。

D. 榎本グループ(大阪バイオサイエンス研究所)

1. 昨年度に確立した感覚ニューロン特異的 RNAi スクリーニング法を用いて、ショウジョウバエ感覚ニューロンの機能分化およびリプログラミングに関与するエピジェネティック因子群の網羅的同定を開始した^{D-1,2)}。まず、エピジェネティック制御に関わるコア因子群を抽出・重み付けすることにより、順位付けを行うことで解析の優先順位を決定し、順次スクリーニングを開始した。本年度は、約50個のエピジェネティック関連遺伝子を選択し、種々の観点から機能解析を行った。
2. 変態期の感覚ニューロンは、(A)細胞死により除去される集団と、(B)神経突起のみ除去されるが細胞は生き残り、後に新たな神経突起を再構築する集団、の2種が存在することを見出した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

A. 高橋グループ

A-1

Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y., Miura, M.: Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon-mediated gene transfer system. *Genes Cells*; 15(5):501-12, 2010 (DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01397.)

A-2

Wang, H., Bonnet, A., Delfini, M., Kawakami, K., Takahashi, Y., Duprez, D.: Stable, Conditional, and Muscle-Fiber-Specific Expression of Electroporated Transgenes in Chick Limb Muscle Cells. *Developmental Dynamics*, in press (DOI:10.1002/dvdy.22498)

A-3

Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R., Takahashi, Y.: In vivo gene manipulations of epithelial cell sheets: a novel model to study epithelial-to-mesenchymal transition. *Development Growth and Differentiation*, in press, 2011

A-4

Yokota, Y., Saito, D., Tadokoro, Y., Takahashi, Y.: Genomically integrated transgenes are stably and conditionally expressed in neural crest cell-specific lineages. *Developmental Biology*, in press (doi:10.1016/j.ydbio.2011.02.001)

A-5

Shimokita, E., Takahashi, Y.: Secondary neurulation: fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Development Growth and Differentiation*, in press, 2011

A-6

Hou, X., Omi, M., Harada, H., Ishii, S., Takahashi, Y., Nakamura, H.: Conditional knockdown of target gene expression by tetracycline regulated transcription of double strand RNA. *Development Growth and Differentiation*, 2011 Jan;53(1):69-75. doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01229.x.

B. 國貞グループ

B-1

Hara, A., Taguchi, A., Aoki, H., Hatano, Y., Niwa, M., Yamada, Y., Kunisada, T.: Folate

antagonist, methotrexate induces neuronal differentiation of human embryonic stem cells transplanted into nude mouse retina. *Neurosci Lett.* 477, 138-143, 2010.

(DOI:10.1016/j.neulet.2010.04.050)

B-2

Iida, K., Takeda-Kawaguchi, T., Tezuka, Y., Kunisada, T., Shibata, T., Tezuka, K.: Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 55, 648-654. 2010.

(doi:10.1016/j.archoralbio.2010.06.005)

B-3

Tamaoki, N., Takahashi, K., Tanaka, T., Ichisaka, T., Aoki, H., Takeda-Kawaguchi, T., Iida, K., Kunisada, T., Shibata, T., Yamanaka, S., Tezuka, K.: Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res.* 89, 773-778, 2010.

(doi: 10.1177/0022034510366846)

B-4

Aoki H, Hara A, Motohashi T, Osawa M, Kunisada T.: Functionally distinct melanocyte populations revealed by reconstitution of hair follicles in mice. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 125-135, 2011.

(doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00801)

B-5

Walker GJ, Soyer HP, Handoko HY, Ferguson B, Kunisada T, Khosrotehrani K, Box NF, Muller HK.: Superficial Spreading-Like Melanoma in *Arf(-/-)::Tyr-Nras(Q61K)::K14-Kitl* Mice: Keratinocyte Kit Ligand Expression Sufficient to "Translocate" Melanomas from Dermis to Epidermis. *J Invest Dermatol.* in press.

(doi:10.1038/jid.2011.21)

C. 萩野グループ

C-1

Kurokawa, D., Ohmura, T., Ogino, H., Takeuchi, M., Inoue, A., Inoue, F., Suda, Y., Aizawa, S.: Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm. *Dev. Biol.*, 342: 110-120, 2010. (DOI:10.1016/j.ydbio.2010.03.013)

C-2

Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D. Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N. H., Shu, S., Taher, L., Blitz, I. L., Blumberg, B., Dichmann, D. S., Dubchak, I., Amaya, E., Fletcher, R., Gerhard, D., Goodstein, D., Graves, T., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Kawashima, T., Lindquist, E., Mead, P. E., Mitros, T., Ogino, H., Ohta, Y., Poliakov, A. V., Pollet, N., Robert, J., Salamov, S., Sater,

A. K., Schmutz, J., Terry, S., Vize, P. D., Warren, W. C., Wells, D., Wills, A., Zimmerman, L. B., Zorn, A. M., Grainger, R., Grammer, T., Khokha, M. K., Richardson, P. M. Rokhsar, D. S.: The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, 328: 633-636, 2010 (DOI: 10.1126/science.1183670)

C-3

Sato, S., Ikeda, K., Shioi, G., Ochi, H., Ogino, H., Yajima, H., Kawakami, K.: Conserved expression of mouse *Six1* in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR. *Dev. Biol.* 344: 158-171, 2010 (DOI:10.1016/j.ydbio.2010.04.029)

D. 榎本グループ

D-1

Yasunaga, K., Kanamori, T., Morikawa, R., Suzuki, E., Emoto, K.: Dendrite reshaping of adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. *Developmental Cell* 18: 621-632, 2010 (doi:10.1016/j.devcel.2010.02.010)

D-2

Fang, X., Lu, Q., Emoto, K., Adler, P. N.: The *Drosophila* Furry protein interacts with Trc and is highly mobile in vivo. *BMC Dev. Biol.* 10: 40, 2010 (doi:10.1186/1471-213X-10-40)

D-3

Emoto, K.: Dendrite remodeling in development and disease. *Development Growth and Differentiation*, Review Article in press (March.15 issue 2011).

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0件)