

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. 研究実施体制

(1) 「高橋」グループ

① 研究代表者: 高橋 淑子 (奈良先端科学技術大学院大学、教授)

② 研究項目

- ・NC 細胞を中心とした神経幹細胞の動態制御と生体内リプログラミング法の基盤作り

(2) 「國貞」グループ

① 主たる共同研究者: 國貞 隆弘 (岐阜大学、教授)

② 研究項目

- ・ES 細胞からの NC 分化誘導過程における分化制御因子の検証
- ・ES 細胞からの NC 分化系により明らかにされた NC 分化制御因子の成体における機能検証

(3) 「荻野」グループ

③ 主たる共同研究者: 荻野 肇 (奈良先端科学技術大学院大学、特任准教授)

④ 研究項目

- ・NC 分化制御因子の作用に対するエピジェネティック効果の検証

(4) 「榎本」グループ

⑤ 主たる共同研究者: 榎本 和生 (大阪バイオサイエンス研究所、研究部長)

⑥ 研究項目

- ・エピジェネティック制御因子の探索に向けたゲノムワイド RNAi システムの構築
- ・ショウジョウバエ末梢神経への分化を制御するエピジェネティック因子の網羅的探索

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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)

研究のねらい

本研究では、神経堤細胞(NC 細胞)を中心とする胚体内の幹細胞、及びそれに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の視点から、幹細胞の維持機構や細胞分化機構を理解することをめざしている。細胞分化やリプログラミングの解析には、転写因子やエピジェネティック因子などの核内因子が重要である。加えて生体内(特に胚内)では、細胞がその位置を刻々と変化させながら分化を進めることから、それらの変化に伴う周辺環境シグナルのダイナミズムも考慮する必要がある。これらの複雑なシステムをある一定のロジックで理解するためには、4次元的に変化し続ける発生中の胚を対象とする研究が有効である。このような研究の動向について、その一部を Science 誌の Editorial に発表した(Science, 332; 1241, (2011))。

概要

Tol2トランスポゾン法を中心としたNC 細胞操作法の開発・改良を継続して行うとともに、これらの遺伝子操作法を用いることによって、NC 細胞が生体内を移動する際の誘因機構について新たな知見を得た(主に交感神経系について)。そこでは、背側大動脈が中心となって、NC 細胞の誘引因子や分化決定因子など、複数のファクターが時空間的に正しく制御されていた。また本研究を通じて、当初期待していなかった新しい細胞挙動を見出すことができた(主に色素細胞系について)。加えて、体軸後方の神経形成(Secondary Neurulation)についても NC 細胞と類似の解析を行ったところ、新たな幹細胞の存在の可能性と、その挙動についての知見を得た。

進捗状況

・Tol2トランスポゾン法の開発と改良

本CREST研究のスタート以来、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を進めてきた。H23年度においては、Tol2トランスポゾン法を中心として、胚内の限定された領域の細胞を安定的に遺伝子操作する方法に焦点を当て、NC細胞に最も適した操作法の開発に成功した^{A-3)}。そこでは、NC細胞特異的エンハンサーとCre/Loxシステムを組み合わせた発現系や、さらにはテトラサイクリンによる時期特異的な発現誘導系を組み合わせることができると、生体内における細胞挙動を極めて厳密かつ詳細に解析することが可能になった。さらに、海外との多くの共同研究を通して、NC細胞に由来する色素細胞^{A-2)}や、腸管神経節^{A-1)}の挙動の解析、そして同じく胚内を移動する筋芽細胞^{A-6)}やEMTをおこした上皮細胞のその後の追跡^{A-5)}などに、我々のTol2法が非常に有効であることを実証することができた。

・NC細胞の移動誘因機構

NC細胞はさまざまな細胞へと分化するが、その中でも交感神経系に分化するものは、腹側方向へと移動することが知られている。移動先には背側大動脈が存在していることから、この大動脈がなん

らかの役割を持っていると長年期待されてきたが、直接的な証拠はなかった。そこで H23 年度では、背側大動脈の胚内移植や NC 細胞へのコンディショナル遺伝子操作を用いて、以下の知見を得た。NC 細胞移動時期では、背側大動脈周辺においてさまざまなモルフォゲンが発現している。解析の結果、大動脈から分泌される BMP が、周辺組織内における SDF1 と Neuregulin1 の発現に必要であることがわかった。そして SDF1 と Neuregulin1 が、NC 細胞の真の誘引因子として作用するのである。これらのことは、生体内での直接的な細胞-遺伝子操作と、*in vitro* でのケモアトラクトアッセイの両方からのアプローチにより証明された。成体ホメオスタシスの中核を担う交感神経系の初期形成機構の一端を明らかにすることができた。これらの内容は、minor revision 後、Science 誌に再投稿したところである。

• Secondary Neurulation にみられる新規の神経幹細胞

NC 細胞は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。一方で体の後方を支える神経系は、前方とは全く異なるプロセスによって作られる。このような後方における神経形成は、Secondary Neurulation (SN; 日本語訳はなし) とよばれている。SN 現象自体は 75 年以上も前に記載されていたが、SN 細胞の実体や挙動、そしてそれらを制御する分子機構はほとんどわかっていなかった。H23 年度の研究では、トリ初期胚の Fate Mapping 法により SN 前駆細胞を突き止め、これまで提唱されていたよりも明瞭に SN 領域を同定することができた。さらには、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いて、SN 前駆細胞を特異的に遺伝子操作することに成功した。EGFP 遺伝子を導入したところ、体後方に見られる中枢神経と末梢神経がすべてラベルされていた^{A-4)}。興味深いことに、3日目胚 (Old) から取り出した SN 細胞を2日目胚 (Young) に移植したところ、宿主胚内で完全なセットの神経系を作る様子が観察されている。このことは、SN 前駆細胞が幹細胞としての性質を有する可能性を示す。現在、SN 細胞が「第3の神経幹細胞」であることを証明すべく解析を進めている。このような新たな幹細胞の発見に向けた解析は、既知の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も、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 医学研究科)

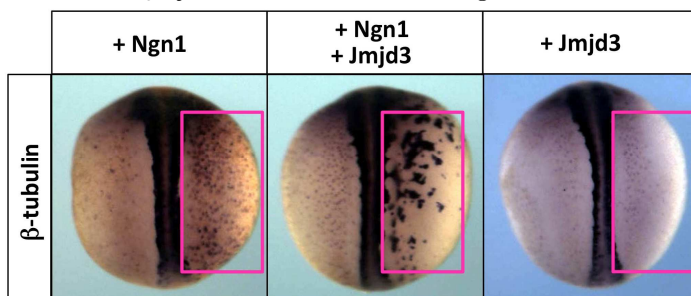
我々の開発した神経堤細胞 (NC 細胞) の培養技術を用いて、NC 細胞の分化制御や、一旦分化した NC 細胞サブタイプからのリプログラミング操作法の開発を行う。また ES 細胞からの NC 分化誘導法をベースとして、iPS 細胞から NC 細胞を効率的に入手する方法の開発など、次世代再生医療への基盤づくりを行う^{B-1, 5)}。

昨年度までに作成した Sox10-IRES-EGFP マウスを用いて、9.5 日胚から発生初期の NC 細胞を EGFP+Kit+CD45- および EGFP+Kit-CD45- に分離し、NC 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その分化能力を解析した。分化系譜が色素細胞に限定されていると考えられてきた EGFP+Kit+CD45 細胞(色素芽細胞)においても多分化能が維持されていることを見出した^{B-2)}。この成果により、本研究で用いる ES 細胞→NC 細胞分化誘導系が発生初期の生体由来の NC 細胞の分化培養にも有効なことが明らかになり、ES 細胞と生体由来 NC 細胞の両者を用いた確実なリプログラミング関連遺伝子の解析が可能となった。

NC 幹細胞に特異的に発現するか、あるいは NC 細胞にも発現している ES 細胞などの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セルソーターにより精製した NC 細胞由来 RNA を用いた遺伝子発現の差異に基づいて推定した。その中から転写調節因子の機能解析を昨年から引き続き行っている。本年度は、候補遺伝子の ES 細胞→NC 細胞分化誘導系での siRNA によるノックダウンおよび遺伝子導入による過剰発現実験を行い、神経堤細胞分化での機能の解析を行った。過剰発現系については産総研の五島らとの共同研究でレトロウイルスを用いた過剰発現系を確立し、候補遺伝子の NC 細胞発生との関連を調べている。いくつかの遺伝子に関してはノックダウンによる NC 細胞誘導の喪失が観察されている。今後荻野らによりゼノパスで NC 細胞の分化を制御する遺伝子を含む多くの遺伝子に関して同様の解析を行い、NC 細胞の分化制御の全体像を明らかにしたい。

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)

ヒストン修飾には様々なものがあり、それらのうちヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) や 9 番目のリジン (H3K9) に対するメチル化と脱メチル化は、それぞれクロマチン構造の凝縮と弛緩を促して遺伝子発現を調節することが知られている。本年度までに、H3K27 に対するメチル化酵素 Ezh2 とその補助因子 Eed、及びそれらと拮抗する脱メチル化酵素 Jmjd3 と Utx をツメガエルにおいて同定単離し、いずれも NC の形成過程で特異的に発現することを発見した^{C-1)}。また、H3K9 に対する脱メチル化酵素 Jmjd2A 及び KIAA1718 についても同定単離した。次に、これらヒストン修飾因子のそれぞれを、NC 由来の神経節細胞で発現する転写因子 Neurogenin と一緒にツメガエル胚で強制発現させたところ、H3K27 脱メチル化酵素の Jmjd3 あるいは Utx が Neurogenin と協調的に働いて、神経分化を強く促進することがわかった(右図)。Neurogenin だけを強制発現させても、一部の表皮外胚葉細胞が神経細胞に分化するが、Jmjd3 あるいは Utx を共発現させると、表皮外胚葉細胞のみならず脊索に相当する中胚葉細胞すら神経細胞にリプログラミングされた。



Neurogenin1 (Ngn1)とJmjd3の共発現による異所的な神経分化の促進。Ngn1とJmjd3のmRNAを、単独あるいは組み合わせてツメガエル受精卵にインジェクションし、神経胚期に神経分化マーカー(β -tubulin)の発現を調べた(背面図)。赤四角は強制発現させた部分を示す。

D. 榎本グループ(大阪バイオサイエンス研究所)

ショウジョウバエ感覚ニューロンを解析モデルとして、末梢神経系の機能分化機構およびリプログラミング機構を簡便に評価できるアッセイ系を構築した^{D-1, D-2, D-3)}。このシステムを用いて網羅的 RNAi スクリーニングを開始し、すでに10個程度のエピジェネティック制御因子が、それぞれ異なる末梢神経分化に関わる可能性を見いだした。今後、さらにスクリーニングを進行させるとともに、同定したエピジェネティック因子群の機能について、とくに「末梢神経への分化制御」の詳細な解析

を行う予定である。

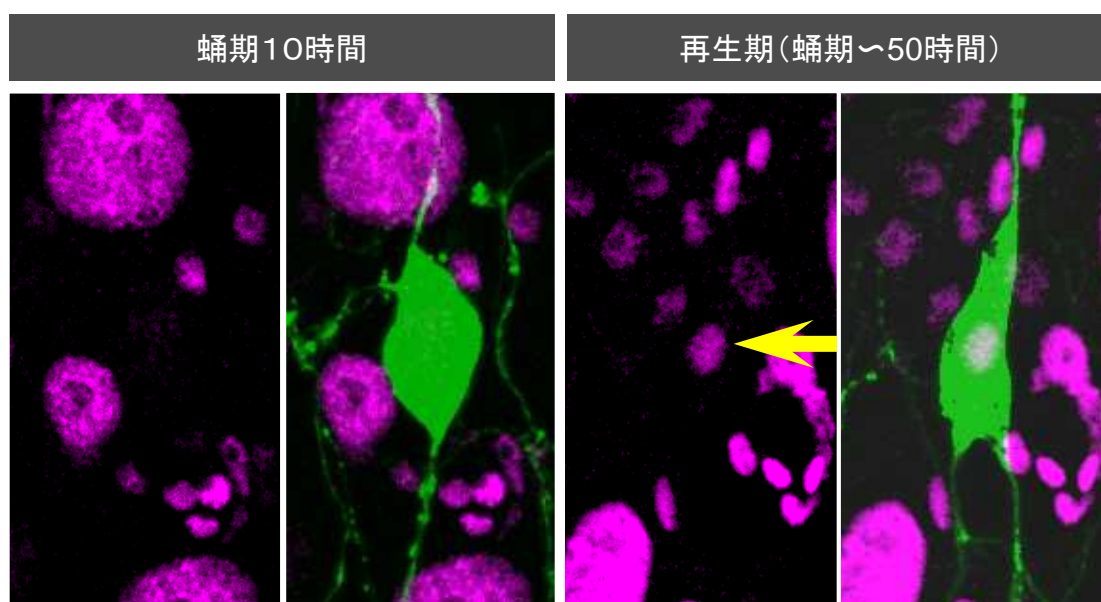


図 特定の複合体(マゼンタ)が、一過的に特定の感覚ニューロン(グリーン)に発現し、機能分化の制御を行う。図は、蛹期前半(左)と後半(右)の発現パターンを比較した。この因子は、再生期特異的に発現が誘導されることから、神経回路の再生(再構築)を特異的に制御している可能性が示唆される。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

A. 高橋グループ

A-1

Binder, B. J., Landman, K. A., Donald F. Newgreen, D. F., Simkin, J. E., Takahashi, Y. and Zhang, D.: Spatial Analysis of Multi-species Exclusion Processes: Application to Neural Crest Cell Migration in the Embryonic Gut. *Bulletin of Mathematical Biology*, 74 (2): 474-490, 2012. (doi: 10.1007/s11538-011-9703-z)

A-2

Adameyko, I., Lallemand, F., Furlan, A., Zinin, N., Aranda, S., Kitambi, S. S., Blanchart, A., Favaro, R., Nicolis, S., Lübke, M., Müller, T., Birchmeier, C., Suter, U., Zaitoun, I., Takahashi, Y. and Ernfor, P.: Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest.

Development, 139(2):397-410, 2012. (doi: 10.1242/dev.065581)

A-3

Yokota, Y., Saito, D., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: Genomically integrated transgenes are stably and conditionally expressed in neural crest cell-specific lineages. *Dev. Biol.*, 353(2): 382-395, 2011. (doi:10.1016/j.ydbio.2011.02.001)

A-4

Shimokita, E. and Takahashi, Y.: Secondary neurulation Fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Dev. Growth Differ.*, 53(3):401-410, 2011. (doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01260.x)

A-5

Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: In vivo gene manipulations of epithelial cell sheets: a novel model to study epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev. Growth Differ.*, 53(3):378-388, 2011. (doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01252.x)

A-6

Wang, H., Bonnet, A., Delfini, MC., Kawakami, K., Takahashi, Y. Duprez, D.: Stable, conditional, and muscle-fiber-specific expression of electroporated transgenes in chick limb muscle cells. *Dev. Dyn.*, 240(5):1223-1232, 2011. (doi:10.1002/dvdy.22498)

B. 國貞グループ

B-1.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H.K., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H. and Yamanaka, S.: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, 8, 409-412, 2011. (doi: 10.1038/nmeth.1591)

B-2.

Motohashi, T., Yamanaka, K., Chiba, K., Miyajima, K., Aoki, H., Hirobe, T., and Kunisada, T.: Neural crest cells retain their capability for multipotential differentiation even after lineage-restricted stages. *Developmental Dynamics*, 240, 1681-1693, 2011. (doi: 10.1002/dvdy.22658)

B-3.

Walker, G.J., Soyer, H.P., Handoko, H.Y., 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*, 131, 1384-1387, 2011. (doi: 10.1038/jid.2011.21)

B-4.

Aoki, H., Hara, A., Motohashi, T. and Kunisada, T.: Protective effect of Kit signaling for melanocyte stem cells against radiation-induced genotoxic stress. *J Invest Dermatol*, 131, 1906-1915, 2011. (doi: 10.1038/jid.2011.148)

B-5.

Aoki, H., Hara, A., Era, T., Kunisada, T. and Yamada, Y.: Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development*, 139, 667-677, 2012. (doi: 10.1242/dev.072272)

C. 萩野グループ

C-1

Kawaguchi, A., Ochi, H., Sudou, N. and Ogino, H.: Comparative expression analysis of the H3K27 demethylases, JMJD3 and UTX, with the H3K27 methylase, EZH2, in *Xenopus*. *Int. J. Dev. Biol.*, 2012 (in press).

C-2

Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H. and Taira, M.: Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. *Development*, 2012 (in press).

C-3

Yokoyama, Y., Maruoka, T., Ochi, H., Aruga, A., Ohgo, S., Ogino, H. and Tamura, K.: Different requirement for Wnt/ β -catenin signaling in limb regeneration of larval and adult *Xenopus*. *PLoS ONE* 6(7): e21721, 2011 (doi:10.1371/journal.pone.0021721).

D. 榎本グループ

D-1

Morikawa, R., Kanamori, T., Yasunaga, K., and Emoto, K.: Different levels of the TRIM protein Asap regulate distinct axonal projections of *Drosophila* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 19389-19394, 2011. (doi: 10.1073/pnas.1109843108)

D-2

Emoto, K.: The growing role of the Hippo-NDR kinase signaling in neuronal development and disease. *J. Biochem*, (Invited Review) 150: 133-141, 2011. (doi: 10.1093/jb/mvr080)

D-3

Emoto, K.: Dendrite remodeling in development and disease. *Dev. Growth Differ.* (Invited Review) 53: 277-286, 2011. (doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01242.x)

D-4

Enelinga, K., Briona, L., Pintob, V., Pinhob, M. J., Mochizuki, N., Emoto, K., S.

Patricio, and Bertorello, A. M.: Salt-inducible kinase 1 regulates E-cadherin expression and intercellular junction stability. FASEB J. (in press).

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 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)