

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 21 年度採択研究代表者

H25 年度 実績報告

高橋 淑子

京都大学大学院理学研究科
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 (京都大学大学院理学研究科、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
- ・生体内イメージング法を用いた NC 細胞リプログラミングと細胞動態の制御

(2) 「國貞」グループ

①主たる共同研究者: 國貞 隆弘 (岐阜大学大学院医学系研究科、教授)

②研究項目

- ・ES→NC 分化誘導過程における分化制御因子の検証

(3) 「荻野」グループ

①主たる共同研究者: 荻野 肇 (長浜バイオ大学バイオサイエンス学部・研究科 教授)

②研究項目

- ・ヒストン脱メチル化因子の組み合わせによるリプログラミング効果の検証

(4) 「榎本」グループ

①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)

②研究項目

- ・エピジェネティック制御ネットワークの構築と可視化

§ 2. 研究実施の概要

本 CREST 研究では、末梢神経系の幹細胞として認識される神経堤細胞（以下 NC 細胞）の分化形質及びリプログラミング能に着目して、胚内で「正常に起こる」と思われる NC 細胞リプログラミングの実体を理解し、その成果を将来的に人工的細胞リプログラミング法の開発につなげることを目的としている。H25 年度までの研究によって、主に体幹部の NC 細胞の高解像度遺伝子操作法が大きく進んだ。これらの研究成果の一部はすでに原著論文（*Science*, 336(6088): 1578-1581, 2012）にて発表され、さらには NC 細胞の移動機構や多分化能、そして正常胚でみられるリプログラミングに関する最先端の知見を統合し、NC 細胞の発生機構とその破綻による病態発症に関する総説を発表した⁹⁾。一連の研究から見えてきたことは、NC 細胞は従来考えられていたよりも遙かに高い可塑性をもつという新事実である。これらのことは、ES 細胞や iPS 細胞を用いた従来型の *in vitro* 解析だけでは得られなかった知見であると同時に、NC 細胞を用いた分化/リプログラミング研究が、生体内に見られる NC 細胞以外の細胞にも広くあてはまる原理を導きうるポテンシャルを再確認させるものである。具体的には、NC 由来の細胞分化運命が、生体内で働く細胞間相互作用や組織間相互作用によって大きく変化しうるなどを見出すとともに、それら相互作用の分子実体について迫りつつある。BMP やケモカインなどは重要な役割を担う中心的分子として位置づけられる。並行して、近年広く用いられている *in vitro* ディレクショナルリプログラミング法を NC 細胞にも応用することによって、複数の転写因子の組合せから、線維芽細胞→NC 細胞への直接リプログラミングの可能性を見出したと共に（下図）、これらリプログラミング効率を調節するエピジェネティック制御の実体も見え始めてきた。羊膜類のみならず、カエル胚やショウジョウバエ胚といった、それぞれの解析に最適な生体モデル生物をうまく利用することによって、独創性の高い研究を目指している。

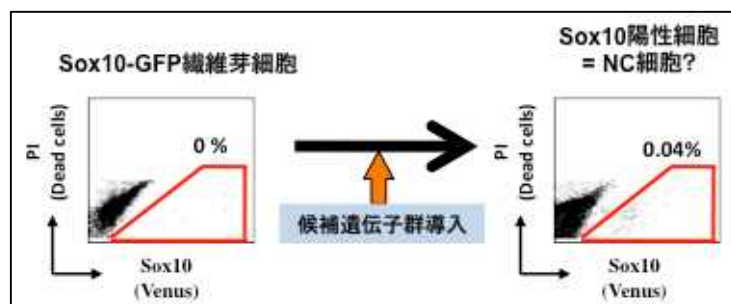


図. 複数の転写因子の組合せによる線維芽細胞→NC 細胞への直接リプログラミング

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

高橋グループ

1. 高橋淑子, 齋藤大介:「自立神経の発生における血管の関わり」, *血管医学*, **14**: 9-13, 2013
2. 高橋淑子:「特集:神経-血管ワイヤリング オーバービュー」, *血管医学*, **14**: 7-8, 2013
3. 田所竜介, 村井英隆, 酒井謙一郎, 高橋淑子:「ライブイメージング法を用いた表皮内メラノサイトの可視化」, *日本小児皮膚科学会雑誌*, **32**: 95-99, 2013
4. 齋藤大介, 高橋淑子:「神経-血管相互作用から読み解く自立神経系の成立機構」, 臓器円環による生体恒常性のダイナミクス, *実験医学増刊*, **31**: 759-764, 2013

榎本グループ

5. 金森崇浩・榎本和生:「局所性カルシウムシグナルによる樹状突起の選択的除去メカニズム」, *実験医学*, **31**: 2603-2606, 2013
6. 金井誠・橋本大輝・木下裕介・榎本和生:「神経-血管ワイヤリング研究のための古くて新しいモデル生物ショウジョウバエ」, *血管医学*, **14**: 267-272, 2013

高橋グループ

7. Atsuta, Y., Tadokoro, R., Saito, D. and Takahashi, Y.: Transgenesis of the Wolffian duct visualizes dynamic behavior of cells undergoing tubulogenesis in vivo. *Dev. Growth Differ.*, **55**: 579-90, 2013 (DOI:10.1111/dgd.12047)
8. Kita, Y., Kawakami, K., Takahashi, Y. and Murakami, F.: Development of Cerebellar Neurons and Glia Revealed by in Utero Electroporation: Golgi-Like Labeling of Cerebellar Neurons and Glia. *PLoS ONE*, **8**: e70091, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0070091)
9. Takahashi, Y., Sipp, D. and Enomoto, H.: (Review) Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science*, **341**: 860-863, 2013 (DOI:10.1126/science.1230717)
10. Takase, Y., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: A low cost labeling with highlighter ink efficiently visualizes developing blood vessels in avian and mouse embryos. *Dev. Growth Differ.*, **55**:792-801, 2013 (DOI:10.1111/dgd.12106)
11. Yoshino, T., Saito, D., Atsuta, Y., Uchiyama, C., Ueda S., Sekiguchi, K. and Takahashi, Y.: Inter-epithelial signaling: Formation of an epithelial cell sheet requires its underlying epithelial tube during kidney development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (in press)

國貞グループ

12. Motohashi, T., Kitagawa, D., Watanabe, N., Wakaoka, T. and Kunisada, T.: Neural crest-derived cells sustain their multipotency even after entry into their target tissues. *Dev Dyn.*, **243**: 368-380. 2014 (doi:10.1002/dvdy.24072)
13. Aoki, H., Hara, A., Motohashi, T. and Kunisada, T.: Keratinocyte Stem cells but not

Melanocyte Stem cells are the primary target for Radiation-induced Hair Graying. *J Invest Dermatol.*, **133**: 2143-2151. 2013 (doi:10.1038/jid.2013.155)

14. Wakaoka, T., Motohashi, T., Hayashi, H., Aoki, M., Mizuta, K., Kunisada, T. and Ito, Y.: Tracing Sox10-expressing cells elucidates the dynamic development of the mouse inner ear. *Hearing Res.*, **302**: 17-25. 2013 (doi:10.1016/j.heares.2013.05.003)
15. Yoshimura, N., Motohashi, T., Aoki, H., Tezuka, K., Watanabe, N., Wakaoka, T., Era, T., Kunisada, T.: Dual origin of melanocytes defined by Sox 1 expression and their region-specific distribution in mammalian skin. *Dev. Growth Diff.*, **55**: 270-281. 2013 (doi:10.1111/dgd.12034)
16. Aoki, H. and Kunisada, T.: Deep into melanocyte stem cells: the role of Kit signaling in their establishment. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **26**, 606-607, 2013 (doi:10.1111/pcmr.12127)
17. Yamada, K., Ohno, T., Aoki, H., Semi, K., Watanabe, A., Moritake, H., Shiozawa, S., Kunisada, T., Kobayashi, Y., Toguchida, J., Shimizu, K., Hara, A. and Yamada, Y.: *EWS/ATF1* expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *J. Clin. Invest.*, **123**, 600-610, 2013 (doi: 10.1172/JCI63572)
18. Motohashi, T. and Kunisada, T.: Melanoblasts as Multipotent Cells in Murine Skin. *Methods Mol Biol*: Kursad Turksen. (ed), Chapter **15**. (989, 183-192), Humana press, 2013 (doi:10.1007/978-1-62703-330-5_15)

荻野グループ

19. Nabeshima, A., Nishibayashi, C., Ueda, Y., Ogino, H., and Araki, M.: Loss of cell-extracellular matrix interaction triggers retinal regeneration accompanied by *Rax* and *Pax6* activation. *Genesis*, **51**: 410-419, 2013 (doi:10.1002/dvg.22378)
20. Ochi, H., Kawaguchi, A. and Ogino, H.: Differential use of paralogous genes via evolution of cis-regulatory elements for divergent expression specificities. *New Principles in Developmental Processes*, Kondoh, H. and Kuroiwa, A. (ed), Chapter **11**, Springer, 279-289, 2014 (doi:10.1007/978-4-431-54634-4_21)

榎本グループ

21. Kanamori, T., Kanai, M., Dairyo, Y., Yasunaga, K., Morikawa, R., and Emoto, K.: Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in *Drosophila* sensory neurons. *Science*, **340**: 1475-1478, 2013 (doi:10.1126/science.1234879)
(Faculty of 1000 “Special significance” paper)
22. Kato, U., Inadome, H., Yamamoto, M., Emoto, K., Kobayashi, T., and Umeda, M.: A phospholipid flippase complex of Type IV P-type ATPase ATP8A1 and CDC50A is required for cell migration. *J. Biol. Chem.*, **288**: 4922-4934, 2013 (doi:10.1074/jbc.M112.402701)

23. Sakurai, A., Koganazawa, M., Yasunaga, K., Emoto, K., and Yamamoto, D.: Select interneuron clusters determine female choosiness in *Drosophila*. *Nat. Commun.*, **4**: 1825, 2013 (doi:10.1038/ncomms2837)
24. Yang, L., Li, R., Kaneko, T., Takle, K., Morikawa, R., Essex, L., Wang, X., Zhou, J., Xing, Y., Emoto, K., and Ye, B.: Trim9 regulates activity-dependent fine-scale topography in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, in press (doi:10.1016/j.cub.2014.03.041)