

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618004

研究課題名(和文)低酸素刺激がiPS細胞の大脳皮質分化において果たす役割と分子機構

研究課題名(英文)Effect of hypoxia on cerebral cortex differentiation of iPS cells

研究代表者

高崎 真美 (TAKASAKI, Mami)

筑波大学・医学医療系・特任助教

研究者番号：80392009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では哺乳類の初期発生を制御する要因の一つとして酸素濃度に着目し、マウス・ヒトES細胞及びヒトiPS細胞を用い、神経分化におけるその役割について解析した。その結果、ES細胞から神経外胚葉への運命付けという非常に初期の段階において、低酸素応答転写因子Hif-1 α が必須の役割を果たすことが示された。しかしながら、iPS細胞に関しては同様の結果が得られず、異なる分子機構の存在が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem (ES) cells are useful for elucidating the molecular mechanisms of cell fate decision in the early development of mammals. It has been shown that aggregate culture of ES cells efficiently induces neuroectoderm differentiation. However, the molecular mechanism that leads to selective neural differentiation in aggregate culture is not fully understood.

In this study, we demonstrate that the oxygen-sensitive hypoxia-inducible transcription factor, Hif-1 α , is an essential regulator for neural commitment of ES cells. However, we could not observe Hif-1 α activation in aggregate culture of human iPS cells at the timing of neural commitment. Further analysis might be necessary to elucidate molecular mechanism of neuroectoderm differentiation for iPS cells.

研究分野：再生医学・幹細胞生物学

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：低酸素応答 神経 胚性幹細胞 iPS細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 知覚、随意運動、思考、記憶などを司る大脳皮質は、哺乳類が高次脳機能を果たす上で必須あり、生命進化の理解にとっても重要な組織の一つである。また、大脳皮質分化の分子機序を明らかにすることで、大脳関連疾患の発症機構の解明及び再生医療・創薬の発展に繋がることが期待される。

哺乳類の初期発生研究において、発生の過程を試験管内で再現することが可能な胚性幹細胞 (ES 細胞) は、着床後の初期胚操作が難しい哺乳類において極めて有用な実験材料と言える。これまでの研究で、マウスおよびヒト ES 細胞を無血清培地中で分散浮遊培養することにより、神経系細胞の効率的な分化とともに、大脳皮質様の組織構造が ES 細胞凝集塊中に構築されることが示されている (Watanabe *et al.*, 2005; Eiraku, Matsuo-Takasaki *et al.*, 2008)。これらの報告は、分泌タンパク質などの分化誘導シグナルの非存在下であっても、ES 細胞から自立的に組織化 (自己組織化) した大脳組織が形成され得ることを示唆するが、その分子メカニズムは不明のままである。また、再生医療や創薬の観点からは、iPS 細胞 (Takahashi and Yamanaka., 2006) に由来する大脳皮質組織の分化機構の解明が期待されるが、ES 細胞と同様にその詳細は未だわかっていない。

(2) 哺乳類の初期発生を制御する要因の一つとして「酸素濃度」が挙げられる。なぜなら、子宮内における初期胚は、自身の血管系が発達する以前は低酸素状態で発生が進むため、低酸素条件下での試験管内分化実験がより正確な脳の発生場を反映していると考えられるからである。しかしながら、これまでの研究の多くは通常酸素条件下 (21% O₂) で行われたものが大半を占め、生体内環境を正確に再現したものとは言い難い。近年、低酸素応答転写因子の一つである *Hif-1a* 欠損マウスが、脳管が閉じずに胚性致死に至ること (Iyer *et al.*, 1998)、神経細胞特異的な *Hif-1a* 欠損マウスが神経細胞数の減少を伴う水頭症を発症すること等が報告されている (Tomita *et al.*, 2003)。これらの報告は、酸素濃度が神経分化・脳形成の制御に深く関与していることを示唆し、その分子機序を ES 細胞及び iPS 細胞を用いた試験管内分化系において詳細に検証することが重要である。

2. 研究の目的

(1) ES 細胞を試験管内分化系に用い、哺乳類の大脳皮質分化に与える低酸素環境の影響

を解析することで、低酸素応答を介した大脳皮質分化制御の分子機序の解明を目指す。

(2) ES 細胞で示された大脳皮質分化における低酸素応答の分子機序が、ヒト iPS 細胞においても同様に当てはまるかを検証する。さらに、大脳皮質領域の神経細胞を効率よく分化誘導する方法を開発し、将来的に大脳関連疾患の発症機構解明や再生医療・創薬を推進する材料を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 神経外胚葉への特異的な分化法である分散浮遊培養法 (Eiraku, Matsuo-Takasaki *et al.*, 2008) を用い、マウス ES 細胞 (EB5 株)、ヒト ES 細胞 (KhES-1 株)、ヒト iPS 細胞 (ファイブプラスト由来・山中 4 因子導入) から細胞塊の培養を行い、分化のタイムコースに沿った神経前駆細胞への分化効率の解析、分化した神経細胞の種類の解析、形成される大脳皮質の組織構造の比較を、RT-PCR、免疫染色等の方法で解析する。

このとき、マウス ES 細胞、ヒト ES・iPS 細胞由来の細胞塊で低酸素環境が実際に形成されているかを検討するため、ハイポキシプローブを用いて細胞塊内の低酸素領域の可視化を試みる。

(2) 低酸素応答転写因子のうち、初期発生における脳形成への関連が予想される *Hif-1a* とその下流因子に注目し、その動向を Western 法や免疫染色法による蛋白質レベルで解析を行う。

Hif-1a の発現と神経分化に関連性が認められた場合、*Hif-1a* の強制発現 (遺伝子導入または CoCl₂ 処理による強制的な *Hif-1a* の誘導)、阻害剤処または shRNA の導入によるノックダウン実験を試み、神経分化に関連すると予想されるシグナル経路や遺伝子発現への影響について、RT-PCR、免疫染色、Western 法、クロマチン免疫沈降法、ルシフェラーゼアッセイ等の手法で解析する。*Hif-1a* の関連性が見いだせない場合、別の低酸素応答転写因子である *Hif-2a* とその下流因子に注目する。

4. 研究成果

(1) ES細胞塊における低酸素環境の形成

研究代表者は、哺乳類の大脳発生を制御する要因の一つとして“酸素濃度”に着目し、まずマウス及びヒトES細胞で解析した。分散

浮遊培養法で形成されたES細胞塊内の酸素濃度勾配をハイポキシプローブにて解析したところ、ES細胞塊は神経分化の進行とともに組織自律的に低酸素領域を形成した。さらに、低酸素応答転写因子のHif-1aが、時期を同じくして活性化されることが分った。また、マウスES細胞由来細胞塊内の低酸素領域は、マウスで最も初期の神経外胚葉マーカー遺伝子であるSox1の発現領域と一致し(図1) ヒトES細胞由来細胞塊内の低酸素領域は、ヒトで最も初期の神経外胚葉マーカー遺伝子であるPax6の発現領域と一致することが分った。これらの結果は、未分化ES細胞から神経外胚葉への運命付けという非常に初期の段階において、低酸素応答機構が重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

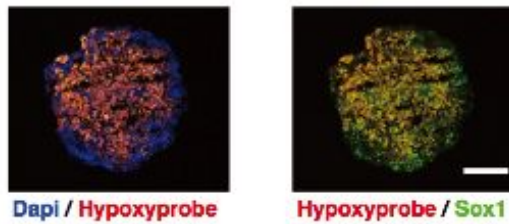


図1. 分化4日目のマウスES細胞塊の免疫染色

* Scale bar: 100 μm

(2) Hif1-aによる神経外胚葉分化の調節機構

低酸素応答機構と神経外胚葉分化の関係を分子レベルで明らかにするため、マウスES細胞を用いて詳細な解析を行った。shRNAの導入によりHif1-aノックダウンES細胞株を樹立し、分散浮遊培養による神経分化実験を行ったところ、Hif-1aノックダウンES細胞塊ではSox1の発現が著しく減少したのに対し、未分化ES細胞マーカー(Oct3/4, Nanog)及び原始外胚葉(エピプラスト)マーカーのFgf5の発現が有意に上昇した(図2)。これらの結果は、Hif-1aの機能を失ったES細胞は、未分化ES細胞またはエピプラストの発生段階に留まったまま、神経外胚葉への分化を進めることができないことを示すものである。

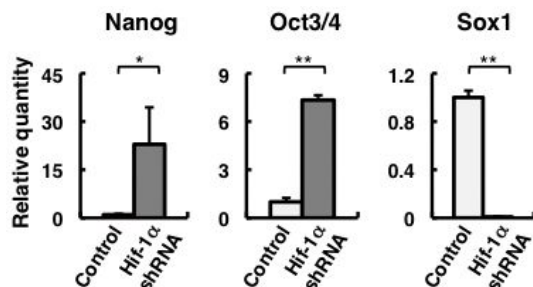


図2. 分化4日目のコントロール及びHif-1aノックダウンES細胞塊における遺伝子発現解析

転写因子であるHif-1aは、HREと呼ばれる特異的配列に結合して下流遺伝子発現を制御することが知られている。研究代表者は、Sox1遺伝子上流にHRE様配列を見出し、Hif-1aがSox1の発現を直接に制御している可能性を予想し、クロマチン免疫沈降法とルシフェラーゼアッセイ法を用いて検証した。その結果Hif-1aはSox1遺伝子上流のHRE様配列を特異的に認識し、直接にSox1の転写活性を制御する転写因子であることが証明された。

TGF-βスーパーファミリーに属する分泌タンパク質のBMP4は、神経分化に対して強力な阻害作用を有することが知られている。研究代表者は、Hif-1aノックダウンES細胞塊において、内在性BMP4の発現およびその下流シグナルであるSmad-1のリン酸化レベルが有意に上昇していることを発見した。Hif-1aノックダウンES細胞塊の培養時に、BMP4の阻害剤として知られるNoggin蛋白質を添加することで、Sox1の発現が回復することを確認したことから、Hif-1aはBMPシグナルを負に制御することを介して、神経外胚葉分化を正に制御する機能を有することが示された。

以上の結果は、神経外胚葉の初期分化において、低酸素応答転写因子Hif-1aが2つの異なる機能を果たすことを示した初めての報告として、国際学術雑誌に発表された(Zhao et al., in press)

(3) ヒトES細胞及びヒトiPS細胞の神経外胚葉分化と低酸素応答

ヒトES細胞及びヒトiPS細胞においても、マウスES細胞と同様の手法で神経外胚葉分化実験を行い、Hif-1aの発現をWestern法にて解析した。その結果、ヒトES細胞では低酸素領域が検出される分化10日目に蛋白質レベルでの発現が確認されたが、ヒトiPS細胞においては、Hif-1aの発現を検出することが出来なかった。ノックダウン実験を簡素化して研究を進めるため、HIF-1a阻害剤(GN44028)を使用し実験を行った所、ヒトES細胞において、未分化ES細胞マーカー(Oct3/4, Nanog)発現の上昇、最も初期の神経外胚葉マーカー(Pax6)発現の減少、神経分化抑制因子BMP4の発現上昇が確認された。これらの結果は、Hif-1aによる神経外胚葉分化の制御機構が、マウスとヒトにおいて保存されていることを強く示唆するものである。

上述の分子機構がヒトiPS細胞においても保存されているかを解析するためiPS細胞においてもHIF-1a阻害(GN44028)を用いて同様の実験を試みたが、有意な結果は得られていない。iPS細胞は、株間における細胞の性質の

違いが大きいことも考えられるので、さらに多くの株で検証していくべきであろう。

また、Hif-1aがES細胞から神経外胚葉への運命付けという非常に初期の段階にとって必須の因子であったため、当初予定していた大脳皮質分化における低酸素応答の影響については解析が不可能であった。

なし

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1件)

Zhao Y, Matsuo-Takasaki M, Tsuboi I, Kimura K, Salazar GT, Yamashita T, Ohneda O. Dual Functions of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha for the Commitment of Mouse Embryonic Stem Cells Toward a Neural Lineage. 2014 印刷中、査読有
DOI: 10.1089/scd.2013.0278.

[学会発表](計2件)

高崎(松尾)真美, The role of hypoxia inducible factor-1a in neural commitment of mouse embryonic stem cells
第10回 国際幹細胞学会年会, 2012年6月15日, パシフィコ横浜(神奈川県)

高崎(松尾)真美, Hypoxia inducible factor 1a is positive regulator of mouse embryonic stem cell differentiation into neural progenitors, 第34回 日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/stemcell/parameter.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高崎 真美 (TAKASAKI Mami)

筑波大学・医学医療系・特任助教

研究者番号:80392009

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者