

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

**Establishment of the neural crest cell induction system from mouse embryonic stem cells and analysis of regulatory factors in neural crest differentiation**

(マウス胚性幹細胞から神経堤細胞への分化誘導法の確立と神経堤細胞の分化制御因子の解析)

氏名 相原 祐子

神経堤は脊椎動物に特異的な細胞集団で、発生中の胚で神経外胚葉と非神経外胚葉の境界に形成され、胚全体へ遊走する。神経堤細胞は、末梢神経や平滑筋、骨や軟骨など多くの細胞種へ分化する。こうした神経堤細胞の形成不全により、ヒルシュスプルング病等の重篤な神経堤症が発症することが明らかとなっている。神経堤症の発症メカニズムの理解と治療法の開発のためには、神経堤細胞の分化制御機構の解明が重要である。しかし、神経堤細胞の詳細な分化制御機構については十分に解明されていない。

一方、マウス胚性幹 (ES) 細胞は、その多能性から分化研究に用いられており、ES 細胞から神経堤細胞の分化誘導法の開発は神経堤細胞の分化制御機構の解明に有用と考えられる。しかし、従来の ES 細胞の培養には、血清やフィーダー細胞、細胞塊の形成が必要であり、分化過程の解析が困難であった。これらを用いない分化誘導法の使用が可能となれば、神経堤細胞の詳細な分化制御機構の解明が期待される。

そこで本研究では、神経堤細胞の分化制御因子を解析するため、血清やフィーダー細胞、細胞塊の形成を用いないマウス ES 細胞からの神経堤細胞の分化誘導法を確立することを目的とした。

はじめに、無血清单層培養系によるマウス ES 細胞から神経堤細胞の分化誘導法の検討を行った。ES 細胞を無血清单層で培養を行うため、無血清培地中で培養細胞の足場となる細胞外マトリックスの選択を行った。その結果、ラミニン上で培養することで細胞が高効率に生存可能であることが示され、これを用いて培養を行うこととした。次に、分化制御因子の解析を可能とするため、発生段階と同様の過程を経て分化誘導する条件を検討することとした。神経堤細胞は、発生段階において内部細胞塊から原始外胚葉、神経外胚葉を経て分化する。そこで、マウス ES 細胞をこれら神経方向へ分化誘導するため、神経分化への関与が報告されている FGF2 を添加して培養を行い、遺伝子発現量の変化を定量的 RT-PCR 法により解析を行った。その結果、添加 2 日後には原始外胚葉マーカーである FGF5 の発現量の増加が認められた。神経外胚葉で発現しているマーカー遺伝子 *Nestin*, *Musashi1* の発現量変化を検討したところ、4 日後で顕著に増加することが示された。以上の結果から、ES 細胞を無血清单層培養系にて FGF2 添加条件下で培養を行うことで、ES 細胞から原始外胚葉を経て神経外胚葉へ分化誘導可能なことが示唆された。さらに、神経外胚葉から神経堤細胞へ分化誘導するため、FGF2 を添加して 4 日間培養した細胞に、FGF2 と共に各種成長因子を添加して神経堤細胞マーカーの遺伝子発現量を解析した。その結果、BMP4 を添加して 2 日間培養することで、AP2 $\alpha$ , P0 などの神経堤細胞マーカーの発現量が増加することが明らかとなった。この誘導した細胞が神経堤由来の細胞種への分化能を持つか検討したところ、シュワン細胞、末梢神経、平滑筋、骨、軟骨、脂肪細胞へ分化可能であることが示唆された。このことから、誘導した細胞が神経堤細胞へ分化したことが示された。さらに、神経堤細胞のマーカー遺伝子である P0 が発現すると EGFP を発現して神経堤細胞を標識する P0-Cre/CAG-CAT<sup>loxP/-</sup>-EGFP トランスジェニックマウス由来の ES 細胞を樹立した。この細胞を無血清单層培養による神経堤細胞の分化誘導条件で培養したところ、

P0 の発現が EGFP により認められた。このことから、FGF2 と BMP4 による神経堤細胞の分化誘導条件は、樹立した別種の細胞においても ES 細胞から神経堤細胞へ誘導可能な条件であることが示された。以上より、無血清单層培養条件で発生段階と同様の過程を経る神経堤細胞の分化誘導法を確立した。

次に、確立した分化誘導法を用いて神経堤分化制御因子の解析を行った。上記で確立した神経堤細胞の分化誘導法を用い、神経堤細胞の分化制御に関与する因子の探索を行った。確立した方法では ES 細胞は神経方向（神経外胚葉）へと分化した後、BMP4 を添加することで、神経堤細胞へと誘導される。そこで BMP4 添加後の遺伝子発現量の変化をマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、53 遺伝子は、添加 1 時間後から 8 時間後まで持続的に遺伝子発現の増加が認められ、この中から核内での機能が予測される 27 因子を選出した。この内、神経堤形成に関与することが報告されていない 5 個を候補因子として選出した。この候補因子の中からデータベース検索により、遺伝子発現パターンと遺伝子欠損による表現型が神経堤分化制御因子と類似する forkhead box F2 (*Foxf2*) を選出した。*Foxf2* は、変異マウスでヒトの神経堤症と同様の表現型が認められ、神経堤細胞の形成に機能している可能性が考えられた。*Foxf2* が神経堤細胞分化の早期で機能する可能性を検討するため、確立した分化誘導法で *Foxf2* と早期神経堤分化制御因子 *AP2α* の遺伝子発現量の比較を行った。その結果、*Foxf2* の遺伝子発現が *AP2α* より先に増加し、*Foxf2* が早期で機能する可能性が考えられた。次に、*Foxf2* の神経堤細胞の分化における機能について解析するため、*Foxf2* の発現を RNA 干渉法により阻害したマウス ES 細胞を作製し、確立した分化誘導法を用いて神経堤細胞の分化への影響を検討した。*AP2α* の遺伝子発現量の変化を解析した結果、*Foxf2* の阻害を行った細胞で *AP2α* の発現量の減少が認められた。そこで、下流の神経堤マーカー遺伝子の発現への影響を免疫染色法により検討を行った結果、*Foxf2* を阻害した細胞で神経堤マーカー遺伝子の発現

の減少が認められた。このことから、Foxf2 は早期の神経堤分化制御因子 AP2 $\alpha$ と下流の神経堤マーカー遺伝子の発現に必要であることが示された。さらに、遊走性神経堤細胞の形成に關与する *Snail* と *Twist* の遺伝子発現量の減少も認められたことから、遊走能についての検討を行った。実際に、阻害を行った細胞では遊走性の細胞数の減少が認められ、遊走性の神経堤細胞の分化に Foxf2 が關与することが示唆された。さらに、神経堤由来の細胞種である末梢神経への分化誘導を行ったところ、Foxf2 の阻害により神経へ分化しないことが示された。このことから、Foxf2 は、神経堤由来の細胞種への分化能を持つ神経堤細胞の形成に必要であることが示唆された。最終的に、生体内における Foxf2 の遺伝子発現を確認するため、脊椎動物のモデル動物であるカエル (*Xenopus laevis*) 胚を用いた RT-PCR 法と whole mount in situ hybridization (WISH) による遺伝子発現解析を行った。その結果、神経堤分化の早期の段階である原腸胚期から遺伝子の発現が認められ、予定神経堤形成領域に局在することが示された。この発現パターンは AP2 $\alpha$ と類似しており、Foxf2 が神経堤細胞の分化の早期に機能することが示唆された。まとめると、確立した誘導法を用いることにより、新規の早期神経堤分化制御因子 Foxf2 を見出した。すなわち、このことから、確立した誘導法は神経堤分化制御機構を解明に有用であるということが示された。

以上より、本研究では神経堤分化制御機構のさらなる知見を得るため ES 細胞から神経堤細胞を無血清単層で分化誘導する手法を確立し、新規の神経堤分化制御因子 Foxf2 を見出した。また、Foxf2 の神経堤症発症との関連が示されたことから、本誘導法は神経堤症に關連する因子を見出すことが可能な誘導法であり、こうした因子の制御機構や神経堤症発症メカニズムの解明に有用であると考えられる。