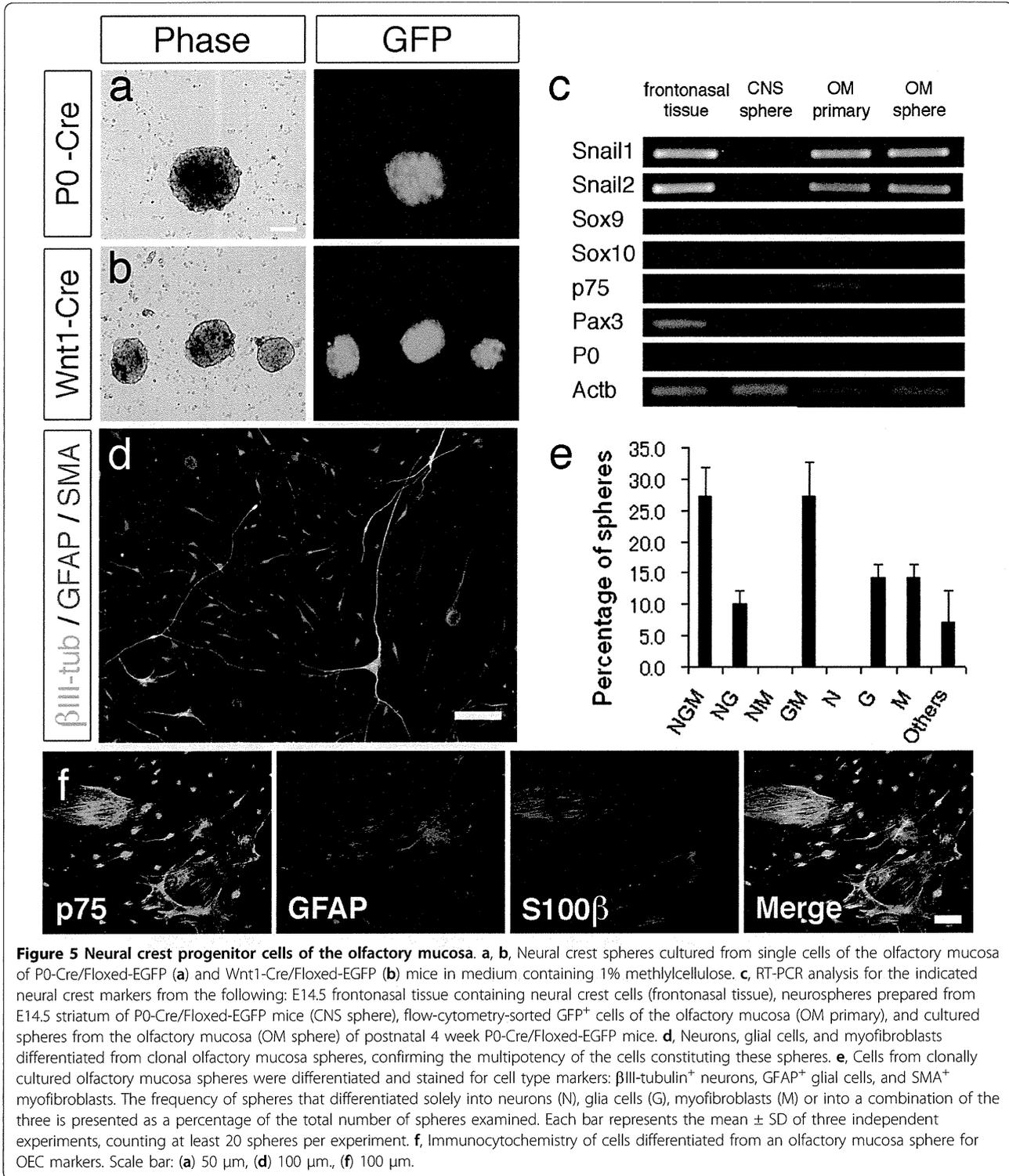


Figure 4 GFP expression in OECs from *Wnt1-Cre/Floxed-EGFP* mice. **a**, Anti-GFP DAB-nickel-staining of the olfactory system reveals GFP expression in areas populated by OECs. The white arrow indicates the olfactory nerve traversing the cribriform plate from the olfactory mucosa to the olfactory bulb. The white arrowhead indicates the outer layer of the olfactory bulb with GFP⁺ cells. Note that the skeletal system and the meninges, which are derived from the neural crest, are also positive for GFP. The yellow asterisk indicates the area observed in **d-f**, which corresponds to the groove in the cribriform plate where the olfactory nerves pass before crossing the cribriform plate and the black asterisks indicate the nasal cavity. **b-c**, Confocal images of the olfactory system showing direct GFP fluorescence and immunostaining for β III-tubulin. The arrow indicates the olfactory nerve passing through the cribriform plate and the arrowhead indicates the outer layer of the olfactory bulb with GFP⁺ cells. **d-f**, Cross-section images of the olfactory nerve before it passes through the cribriform plate, displayed as Z-stack confocal images with corresponding x- and y-axes, showing GFP fluorescence and immunostaining for OEC markers p75 (**d**), GFAP (**e**), and S100 β (**f**). All images are oriented with the olfactory mucosa above and the olfactory bulb below the shown area. **g**, Primary OEC cells cultured from the olfactory mucosa and verified by multiple OEC markers were positive for GFP, verifying their neural crest origin. **h-i**, Venus fluorescence in Sox10-Venus mice verifies the expression of Sox10, a neural crest marker, in OECs at E14.5 (**h**) and E15.5 (**i**). The asterisk indicates the nasal cavity. OE: olfactory epithelium, LP: lamina propria, OB: olfactory bulb, NS: nasal septum, CP: cribriform plate. Scale bars: (**a**, **h**, **i**) 200 μ m, (**b**, **c**) 100 μ m, (**d-g**) 50 μ m.



root ganglion spheres (74.6 \pm 1.0%) which generally demonstrate a neuron-dominant differentiation pattern [24]. On the other hand, olfactory mucosa spheres demonstrated a glia-dominant differentiation pattern (GM 27.1 \pm 5.5%; NG 10.0 \pm 2.2%; G 14.3 \pm 2.1%; M 14.3 \pm 2.1%;

no NM or N). Cell-intrinsic differences have been shown to determine the differentiation characteristics of NC stem/progenitor cells [44], and our results indicate that the olfactory mucosa contains NC stem progenitors that are predisposed to a glial lineage. Furthermore,

immunocytochemistry of differentiated cells revealed the presence of cells that were positive for OEC markers (Figure 5f), suggesting that the NC progenitor cells of the olfactory mucosa spheres are able to produce OECs. Most cells were found to be p75⁺, possibly reflecting their NC origin, since p75 has consistently been observed to mark NC stem cells in the gut [45-47] and other tissues. Cells double positive for p75 and S100 β generally had a flat morphology while p75 and GFAP double-positive cells had spindly bipolar, tripolar, or stellate morphologies.

Discussion

The olfactory placode has been described as one of the most versatile placodes, being unique in its capacity to give rise to glial cells and stem cells capable of generating various differentiated cell types of the OE throughout life. However our findings suggest that the unique properties that have been attributed solely to the olfactory placode may in part be properties endowed by NC-derived cells. In this study, we demonstrate the presence of postmigratory NC progenitor cells within the olfactory mucosa and show that OECs are derived from the NC. Furthermore, even though the majority of cells in the OE are derived from the olfactory placode, we demonstrate the capacity of NC-derived cells to give rise to all cell types of the OE.

The OE, with its capacity for continual neurogenesis in adults, has long been a hotspot for the study of neuroscience. However, identifying different progenitors in the embryonic or adult OE has been historically challenging due to the difficulty in distinguishing distinct embryonic and adult olfactory epithelial progenitors, expanding them *in vitro*, and demonstrating their developmental potential *in vivo*. With the development of sophisticated transgenic mouse technologies, it has become possible to demonstrate the relationship between progenitors and its descendants and to temporally map the progeny derived from a progenitor in fine developmental time windows. By utilizing transgenic mice that express Cre recombinase behind one of two promoters (derived from the Wnt1 or P0 gene) known to be active in migrating NC cells, we demonstrated the presence of NC-derived cells in the embryonic and postnatal OE.

Clusters of GFP⁺ cells spanning the epithelium were observed from E10.5, and generally gradually increased in number during the embryonic period. In the mouse OE, neurogenesis during embryonic establishment (E10 - E18.5), postnatal expansion (P0 - P30), and adult maintenance (P30-) proceed with distinct, spatiotemporal patterns and different cellular and extracellular environments. During embryonic OE development, there is a dramatic expansion of epithelial cells that is brought about by proliferating cells that are equally

distributed between the apical and basal OE during early embryonic stages, but become largely located at the basal area by late embryonic stages [48]. The observed increase in GFP⁺ cells during the embryonic period suggests that NC-derived cells may support cell expansion during the early embryonic period.

We found that a subset of cells in the embryonic olfactory mucosa expressed Sox10, which has been shown to be required for the survival and maintenance of multipotent NC cells. Sox10 is also required for specification of NC cells to the glial lineage, since peripheral glia is absent in Sox10-deficient mice [49,50]. Further studies are required to elucidate the characteristics of the Sox10-expressing cells in the olfactory system, but these cells may be multipotent NC progenitor cells or mature olfactory cells that have differentiated into OECs or SUS cells, because Sox10 has been shown to be expressed in Schwann cells after specification to the glial lineage [51].

The presence of scattered clusters of GFP⁺ cells in the postnatal mice OE with morphologic and antigenic properties identical to olfactory placode-derived epithelial cells demonstrate that NC-derived cells retain the potential to give rise to epithelial cells in adults. Unlike the NC-derived cells in the embryonic OE that seem to participate in the expansion of OE cells, NC-derived cells in the postnatal OE were often observed as clusters of GFP⁺ cells. The clusters of GFP⁺ cells were often comprised of HBCs, SUS cells, and Bowman's gland/duct cells, and the presence of GFP⁺ GBCs along with β -galactosidase⁺ ORNs in P0-Cre/Floxed-LacZ mice were also observed. HBCs are relatively quiescent, and do not take part in the normal maintenance of the OE or the replenishment of the OE after olfactory bulbectomy, in which GBCs lead the repopulation effort. However in extensive epithelial lesions following methyl bromide exposure, HBCs demonstrate a multilineage potential that regenerates all cell types of the epithelium [33]. Since GFP⁺ HBCs were frequently observed in the sporadic GFP⁺ cell patches of the postnatal Wnt1-Cre/Floxed-EGFP and P0-Cre/Floxed-EGFP mice OE, NC-derived cells may give rise to HBCs that later generate other cells of the epithelium. This hypothesis may be examined through methyl bromide lesion experiments with Wnt1-Cre/Floxed-EGFP and P0-Cre/Floxed-EGFP mice. The fact that HBCs in culture have demonstrated the capacity to generate OECs along with neurons and other non-neural cells verifies another characteristic of HBCs that may be related to the NC [52].

The multipotent developmental capacity of NC cells to differentiate into both neuronal and mesenchymal derivatives [22,53-55] has resulted in the NC being considered a fourth germ layer. The multipotency and self-renewal of NC cells from various embryonic sources

in vitro demonstrated the presence of NC stem/progenitor cells. With the discovery of multipotent NC stem/progenitor cells not only in late gestation embryonic tissues but also in adults, the possibility of therapeutic applications has initiated intense studies to identify and characterize NC stem/progenitor cells in multiple NC-derived adult tissues. Here, we demonstrate the capacity of NC-derived cells of the olfactory mucosa to generate spheres *in vitro*, a characteristic of proliferative NC-derived cells. Furthermore, when placed on serum-containing differentiation medium, these spheres exhibited a trilineage differentiation potential by giving rise to neurons, glial cells, and myofibroblasts, thus indicating the presence of NC progenitor cells in the olfactory mucosa. The frequency of olfactory mucosa spheres with a trilineage potential was 27.1%, which is considerably lower than that of NC progenitor cells derived from the dorsal root ganglion (74.6%). A series of our recent reports on NC stem/progenitor cells has shown that their self-renewal capacity is reflective of their differentiation capacity [24], providing a possible explanation for the limited expansion capacity of olfactory mucosa-derived NC progenitor cells compared to dorsal root ganglion-derived NC progenitor cells. The differentiation characteristic of olfactory mucosa-derived NC progenitor cells demonstrated a glia-dominant differentiation pattern, confirming the *in vivo* data from the transgenic mice demonstrating the higher tendency of NC-derived cells to give rise to OECs and SUS cells. Although we have not examined the relationship between the olfactory mucosa-derived NC progenitor cells that we isolated and the progenitors of the OE, our study suggests the possibility that cells derived from the NC may be involved in the remarkable regenerative capacity of the OE.

The isolation of NC-derived progenitor cells from the olfactory mucosa, with an established method for amplification as spheres and the ability to differentiate into OECs, opens the door to possible clinical applications. OECs, with the unique ability to guide axons into the CNS, have attracted the attention of researchers studying therapy strategies for neurotrauma, and cultured OECs have been shown to be beneficial for the treatment of peripheral and CNS ailments [56,57]. NC-derived stem cells identified in numerous tissues have rapidly asserted its presence as a potential source for transplantation. Unlike embryonic stem cells that are hindered by ethical issues, NC-derived stem cells allow for autologous transplantation, and several NC-derived stem cells have been demonstrated to have a beneficial effect after transplantation into peripheral and CNS lesions. One of the well-documented and promising candidates is the NC-derived stem cell found in the hair follicle. Nestin⁺ stem cells isolated from the hair follicle

can be cultured as spheres, and have demonstrated the ability to differentiate into neurons, glia, keratinocytes, smooth muscle cells, and melanocytes *in vitro* [58-61]. Subsequent studies showed that transplanted hair follicle stem cells could enhance the regrowth and functional rejoining of the severed sciatic and tibial nerves [62], as well as the severed spinal cord [63,64], in immunocompetent mice. Although the capacity to generate OECs makes olfactory mucosa-derived NC progenitor cells an appealing transplantation candidate, the studies conducted with hair follicle stem cells clarifies the futures studies required to investigate the characteristics and therapeutic potential of this progenitor cell.

The cephalic sensory system develops through an intricate collaboration between sensory placodes and NC cells, and our results demonstrate that the role NC cells play in the development of the olfactory system is greater than previously reported. Our findings indicating a dual origin for cells of the OE inspire a resurgence of developmental research, and provide further evidence of the versatility and morphogenic capacity of NC cells.

Methods

Mouse lines

The P0-Cre mouse was obtained from Dr. K. Yamamura (Kumamoto University, Japan). Wnt1-Cre mouse and LacZ mice were purchased from The Jackson Laboratory. The CAG-CAT-EGFP mouse was obtained from Dr. J. Miyazaki (Osaka University, Japan). Wnt1-Cre and P0-Cre mice were crossed with CAG-CAT-EGFP transgenic mice to produce Wnt1-Cre/Floxed-EGFP and P0-Cre/Floxed-EGFP mice, respectively. P0-Cre mice were crossed with LacZ mice to produce P0-Cre/Floxed-LacZ mice. All experimental procedures and protocols for animals conformed to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Care and Use Committees of Keio University.

Immunohistochemistry

Embryonic mice were anesthetized in ice, decapitated, and fixed overnight in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS). After sequential treatment in a graded series of 10% and 30% sucrose in PBS at 4°C, the head was embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound and sectioned on a cryostat at 15 µm. All mice over 2 weeks of age were deeply anesthetized, transcardially perfused with 4% PFA in 0.1 M PBS and decapitated. After postfixation in 4% PFA overnight at 4°C, the skull was decalcified for 7 days in 0.5 M EDTA (Decalcifying Solution B, Wako), and sequentially soaked in a graded series of 10% and 30% sucrose in PBS at 4°C. The head was embedded in OCT compound and sectioned on a cryostat at 20 µm.

Immunostaining was performed with the following primary antibodies: rabbit anti-fibronectin (Chemicon), mouse anti-Mash1 (R&D Systems), mouse anti-cytokeratin 5/14 (Chemicon), mouse anti-cytokeratin 18 (Chemicon), goat anti-olfactory marker protein (OMP, Wako), mouse anti- β III-tubulin (TuJ-1, Babco), rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, Dako), mouse anti- α smooth muscle actin (SMA, Sigma-Aldrich), rabbit anti-p75 low affinity nerve growth factor-receptor (p75, Chemicon), mouse anti-S100 β (Sigma-Aldrich), and rabbit anti- β gal (Sigma). The competence of all immunohistochemistry procedures was confirmed with a negative control in which primary antibodies were omitted. Staining of Mash1 required an antigen retrieval procedure with 10 min 105°C autoclave in Target Retrieval Solution (TRS, Dako) followed by indirect immunoperoxidase amplification procedures using ABC-Elite (Vector Laboratories) and TSA (Perkin Elmer), in which case GFP was stained with anti-GFP polyclonal antibody (Chemicon). Staining of β gal was also amplified with TSA (Perkin Elmer). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Molecular Probes). Images were obtained by fluorescence microscopy (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss) or confocal microscopy (LSM700, Carl Zeiss) and assembled using Adobe Photoshop.

Cell tracing of neural crest cells in chick embryo

Fertilized eggs were incubated at 38°C in a humid incubator to stage 8 according to Hamburger and Hamilton [65]. Embryos were exposed by making an opening at the sharp edge of the egg shell. DNA solution including 2 mg/ml pCAGGS-TP, 4 mg/ml pT2AL200R175-CAGGFP [29], and 1% fast green in TE buffer was injected to the anterior neural fold, which will give rise to the midbrain and anterior hindbrain. A pair of platinum electrodes CUY611P3-1 (Nepagene, Ichikawa, Japan) was placed on the vitelline membrane beside the embryos. Five square pulses (9 V, 25 msec each) after a high-voltage pulse (50 V, 0.05 msec) were charged by an electroporator CUY21EX (Bex, Tokyo, Japan). After electroporation, the opening was sealed with Scotch tape (Scotch 313), and the embryos were reincubated at 38°C until the desired stages. The embryos were dissected, fixed in 4% PFA overnight at 4°C, and sequentially soaked in a graded series of 10% and 30% sucrose in PBS at 4°C. The embryo was embedded in OCT compound and sectioned on a cryostat at 20 μ m.

Olfactory mucosa cell preparation

Animals were deeply anesthetized, killed by cervical dislocation and decapitated. The olfactory mucosa was carefully dissected into ice-cold media hormone mix (MHM) [66], washed twice in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, calcium- and magnesium-free;

Invitrogen) and incubated for 20 min at 37°C in Dispase II (Boehringer Mannheim). The tissue was then digested in 0.5% collagenase type IA (Sigma-Aldrich) in MHM for 20 min at 37°C and mechanically dissociated. Cells were passed through an 80 μ m cell-strainer-mesh and resuspended in MHM.

Primary OEC preparation

The olfactory mucosa was treated as above with Dispase II and the superficial portion of the epithelium was shed off. The remaining tissue was collected in HBSS and centrifuged. The cell pellet was digested in 0.5% collagenase type IA in DMEM/F12 for 20 min at 37°C and dissociated. The cells were collected in DMEM/F12 +10% fetal bovine serum (FBS), spun down, and resuspended in culture medium. The culture medium consisted of DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. Cells were fixed with 4% PFA for 10 min for immunostaining.

Sphere forming cultures

Olfactory mucosa cells were resuspended in MHM [66] supplemented with recombinant human EGF (100 ng/ml, Pepro Tech), recombinant human FGF-2 (100 ng/ml, Pepro Tech), B27 supplement (Invitrogen), and Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen). For clonal sphere formation, cells were plated at a density of 8.0×10^4 cells/well (6-well plates) in culture medium containing 1% methylcellulose. Spheres from CNS were prepared as described previously [67].

Clonal analysis

Each sphere was individually plated in a chamber of poly-D-lysine/laminin (Sigma-Aldrich/Invitrogen)-coated 8-well chamber slides (Iwaki) and cultured for 14 days in MHM supplemented with 10% FBS, without any growth factors. Differentiated cells were fixed with 4% PFA in PBS, boiled for 5 min to inactivate GFP-fluorescence, and pretreated with PBS containing 0.3% Triton-X100 for 5 min at room temperature before immunostaining. The samples were mounted and observed with a universal fluorescence microscope (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss).

RT-PCR

RNA was prepared using Trizol (Invitrogen) for primary GFP⁺ cells sorted from the olfactory mucosa, and RNeasy mini kit (Qiagen) for the other samples. RNA was treated with RNase-free DNase and cDNA was generated using oligo (dT) primers and SuperScript II RT reverse transcriptase (Invitrogen) as directed by the manufacturer. The following primers were obtained from Takara: Snail1, MA030195; Snail2, MA030179; p75, MA004379; Pax3, MA026554; p0, MA026318; and Actb, MA023938. For detection of Sox9 and Sox10,

primers were designed as follows: Sox9-F, 5'-CAAGTGTG TGTGCCGTGGATAG-3'; Sox9-R, 5'-CCAGCCACAGCAGTGAGTAAGAA-3'; Sox10-F, 5'-ACGCACTGAGGACAGCTTTGA-3'; and Sox10-R, 5'-ATGAGTTA TTGACAGCTTTGA-3'.

Flow-cytometric isolation of GFP⁺ cells

P0-Cre/Floxed-EGFP mice (postnatal 4 weeks) were killed and olfactory mucosa cells were collected as described above. Cells were stained with PI and subjected to flow-cytometry using Vantage (BD Biosciences) to sort out GFP⁺ cells and eliminate PI⁺ dead cells. Collected cells were immediately subjected to RNA preparation.

Additional material

Additional file 1: PCR confirms Cre recombination in GFP⁺ cells. a, Schematic diagrams of the CAG-CAT-EGFP transgene cassettes in the transgenic mice. The Cre recombinase excises the loxP-flanked CAT reporter gene resulting in GFP expression. The arrows under the gene constructs indicate the position and direction of the primers used for PCR. pA is a polyadenylation signal. The sizes of the PCR products are indicated under each gene construct. **b** Genomic PCR of GFP-positive or negative cells sorted from the olfactory mucosa of P0-Cre/Floxed-EGFP mice with the primer sets shown in **a** confirms Cre-mediated recombination in GFP⁺ cells. The sequence of the primers are: CAGp F, 5'-CTGCTAACCATGTTTCATGCC-3'; EGFP R1, 5'-TGGTGCAGATGAACTTCAGG-3'; EGFP F, 5'-AGCACGACTTCTTCAAGTCC-3'; EGFP R2, 5'-TGAAGTTCACCTTGATGCCG-3'.

Additional file 2: Clonal sphere culture in medium containing 1% methylcellulose. To determine cell density required for clonal culture, cells from the olfactory mucosa of GFP and RFP mice were equally mixed and cultured at a density of 8.0×10^4 cells or 1.6×10^5 cells per well in 6-well plates. The culture medium contained 1% methylcellulose to inhibit sphere migration and fusion. **a**, Formed spheres. Most spheres were of a single color but a small percentage of spheres were mixed ($2.3 \pm 4.0\%$ at 8.0×10^4 cells/well, $14.7 \pm 8.5\%$ at 1.6×10^5 cells/well). **b**, Percentage of single and mixed-color spheres. Values represent mean \pm SD (n = 3).

Abbreviations

OE: olfactory epithelium; OEC: olfactory ensheathing cell; NC: neural crest; P0: protein zero; (E)GFP: (enhanced) green fluorescent protein; p75: p75 low affinity nerve growth factor receptor; PE: post-electroporation; HBC: horizontal basal cell; GBC: globose basal cell; SUS: sustentacular (cell); ORN: olfactory receptor neuron; CNS: central nervous system; GFAP: glial fibrillary acidic protein; EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; OM: olfactory mucosa; SMA: smooth muscle actin; PFA: paraformaldehyde; OCT: optimal cutting temperature; PBS: phosphate buffered saline; MHM: media hormone mix; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS: fetal bovine serum.

Acknowledgements

We are grateful to members of the Okano laboratory, Keio University, and Dr. Yoshiko Takahashi for helpful advice and discussions. This work was supported by grants from Grants-in-Aid for Scientific Research from JSPS and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT), the project for realization of regenerative medicine and Support for the core institutes for iPS cell research from MEXT to M.N. and H.O., and "Funding Program for World-leading Innovative R&D on Science and Technology" to H.O.

Author details

¹Department of Orthopaedic Surgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan. ²Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan. ³Department of Biological Science, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo, 192-0397, Japan. ⁴Department of Gerontological Nursing/Wound Care Management, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan. ⁵National Institute of Musculo-Skeletal Disorders, Murayama Medical Center, 2-37-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo, 208-0011, Japan. ⁶Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Health Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519, Japan.

Authors' contributions

HK, SS, NN, KF, ES, MS, and TM performed the experiments. KF, ES, MS, and TM performed cell tracing studies in chick embryos. CA provided the Sox10-Venus mice. YM supported all flow cytometry analyses. YK, AT, and YT participated in the preparation of this study. HK, SS, ES, MN, and HO wrote the manuscript. HO provided financial support for the experiments. All authors have read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 11 August 2011 Accepted: 23 September 2011

Published: 23 September 2011

References

1. Le Douarin N: *The Neural Crest* Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
2. Selleck MA, Scherson TY, Bronner-Fraser M: **Origins of neural crest cell diversity.** *Developmental biology* 1993, **159**:1-11.
3. Klein SL, Graziadei PP: **The differentiation of the olfactory placode in *Xenopus laevis*: a light and electron microscope study.** *J Comp Neurol* 1983, **217**:17-30.
4. Mendoza AS, Breipohl W, Miragall F: **Cell migration from the chick olfactory placode: a light and electron microscopic study.** *J Embryol Exp Morphol* 1982, **69**:47-59.
5. Couly GF, Le Douarin NM: **Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon.** *Developmental biology* 1985, **110**:422-439.
6. Burr HS: **The effects of the removal of the nasal pits in *Amblystoma* embryos.** *J Exp Zool* 1916, **20**:27-57.
7. Osumi-Yamashita N, Kuratani S, Ninomiya Y, Aoki K, Iseki S, Chareonvit S, Doi H, Fujiwara M, Watanabe T, Eto K: **Cranial anomaly of homozygous rSey rat is associated with a defect in the migration pathway of midbrain crest cells.** *Development, growth & differentiation* 1997, **39**:53-67.
8. Bhasin N, Maynard TM, Gallagher PA, LaMantia AS: **Mesenchymal/epithelial regulation of retinoic acid signaling in the olfactory placode.** *Developmental biology* 2003, **261**:82-98.
9. Echelard Y, Vassileva G, McMahon AP: **Cis-acting regulatory sequences governing Wnt-1 expression in the developing mouse CNS.** *Development (Cambridge, England)* 1994, **120**:2213-2224.
10. Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI: **Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule.** *Nature* 1990, **344**:871-872.
11. Filbin MT, Tennekoon GI: **Homophilic adhesion of the myelin P0 protein requires glycosylation of both molecules in the homophilic pair.** *J Cell Biol* 1993, **122**:451-459.
12. Bhattacharyya A, Frank E, Ratner N, Brackenbury R: **P0 is an early marker of the Schwann cell lineage in chickens.** *Neuron* 1991, **7**:831-844.
13. Lee MJ, Calle E, Brennan A, Ahmed S, Sviderskaya E, Jessen KR, Mirsky R: **In early development of the rat mRNA for the major myelin protein P(0) is expressed in nonsensory areas of the embryonic inner ear, notochord, enteric nervous system, and olfactory ensheathing cells.** *Dev Dyn* 2001, **222**:40-51.
14. Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, Sano S, Kondoh G, Takeda J, Tabayashi K, Miyazaki J: **A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination.** *FEBS Lett* 2000, **470**:263-268.

15. Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, Tanabe K, Watanabe T, Kawakami K, Takahashi Y: **Stable integration and conditional expression of electroperated transgenes in chicken embryos.** *Developmental biology* 2007, **305**:616-624.
16. Chuah MI, Au C: **Olfactory Schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium.** *J Neurosci Res* 1991, **29**:172-180.
17. Ramon-Cueto A, Avila J: **Olfactory ensheathing glia: properties and function.** *Brain Res Bull* 1998, **46**:175-187.
18. Dymecki SM, Tomasiewicz H: **Using Flp-recombinase to characterize expansion of Wnt1-expressing neural progenitors in the mouse.** *Developmental biology* 1998, **201**:57-65.
19. Matsuoka T, Ahlberg PE, Kessaris N, Iannarelli P, Denney U, Richardson WD, McMahon AP, Koentges G: **Neural crest origins of the neck and shoulder.** *Nature* 2005, **436**:347-355.
20. Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP: **Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase.** *Curr Biol* 1998, **8**:1323-1326.
21. Yamauchi Y, Abe K, Mantani A, Hitoshi Y, Suzuki M, Osuzu F, Kuratani S, Yamamura K: **A novel transgenic technique that allows specific marking of the neural crest cell lineage in mice.** *Developmental biology* 1999, **212**:191-203.
22. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K: **Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006, **24**:2714-2722.
23. Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, Matsuzaki Y, Shibuya I, Kawaguchi H, Ieda M, Kanakubo S, Shimazaki T, Ogawa S, Osumi N, Okano H, Fukuda K: **Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart.** *J Cell Biol* 2005, **170**:1135-1146.
24. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H: **Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad.** *Cell stem cell* 2008, **2**:392-403.
25. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, Fehling HJ, Fukatsu A, Minegishi N, Kita T, Kimura T, Okano H, Yamamoto M, Yanagita M: **Dysfunction of fibroblasts of extra-renal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice.** *J Clin Invest* .
26. Shibata S, Yasuda A, Renault-Mihara F, Suyama S, Katoh H, Inoue T, Inoue YU, Nagoshi N, Sato M, Nakamura M, Akazawa C, Okano H: **Sox10-Venus mice: a new tool for real-time labeling of neural crest lineage cells and oligodendrocytes.** *Mol Brain* 2010, **3**:31.
27. Le Douarin NM, Renaud D, Teillet MA, Le Douarin GH: **Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after heterotopic transplantations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, **72**:728-732.
28. Bronner-Fraser M, Sieber-Blum M, Cohen AM: **Clonal analysis of the avian neural crest: migration and maturation of mixed neural crest clones injected into host chicken embryos.** *J Comp Neurol* 1980, **193**:423-434.
29. Kawakami K, Noda T: **Transposition of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish *Oryzias latipes*, in mouse embryonic stem cells.** *Genetics* 2004, **166**:895-899.
30. Harada H, Takahashi Y, Kawakami K, Ogura T, Nakamura H: **Tracing retinal fiber trajectory with a method of transposon-mediated genomic integration in chick embryo.** *Development, growth & differentiation* 2008, **50**:697-702.
31. Del Barrio MG, Nieto MA: **Relative expression of Slug, RhoB, and HNK-1 in the cranial neural crest of the early chicken embryo.** *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 2004, **229**:136-139.
32. Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL: **Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium.** *Experimental cell research* 2005, **306**:309-316.
33. Leung CT, Coulombe PA, Reed RR: **Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration.** *Nature neuroscience* 2007, **10**:720-726.
34. Doucette JR, Kiernan JA, Flumerfelt BA: **The re-innervation of olfactory glomeruli following transection of primary olfactory axons in the central or peripheral nervous system.** *Journal of anatomy* 1983, **137**(Pt 1):1-19.
35. D'Amico-Martel A, Noden DM: **Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia.** *The American journal of anatomy* 1983, **166**:445-468.
36. Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin S, Williams T, Wray S: **Neural Crest and Ectodermal Cells Intermix in the Nasal Placode to give rise to GnRH-1 Neurons, Sensory Neurons and Olfactory Ensheathing Cells.** *J Neuroscience* 2011, **31**:6915-6927.
37. Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin S, Williams T, Wray S: **Neural Crest and Ectodermal Cells Intermix in the Nasal Placode to give rise to GnRH-1 Neurons, Sensory Neurons and Olfactory Ensheathing Cells.** *J Neuroscience*, **31**:6915-27, 2011..
38. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD: **Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:778-784.
39. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM: **Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**:5530-5534.
40. Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, Dufour J, Belousov A, Bunnell BA: **Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells.** *J Cell Sci* 2004, **117**:4289-4299.
41. Roisen FJ, Klueber KM, Lu CL, Hatcher LM, Dozier A, Shields CB, Maguire S: **Adult human olfactory stem cells.** *Brain research* 2001, **890**:11-22.
42. Murrell W, Feron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A: **Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa.** *Dev Dyn* 2005, **233**:496-515.
43. Nagoshi N, Shibata S, Hamanoue M, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H: **Schwann cell plasticity after spinal cord injury shown by neural crest lineage tracing.** *Glia* 2011, **59**:771-784.
44. Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, Le-Douarin N, Dupin E: **The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts.** *Int J Dev Biol* 2005, **49**:151-159.
45. Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, Joseph NM, Morrison SJ: **Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity.** *Neuron* 2002, **35**:643-656.
46. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ: **Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells.** *Cell* 1999, **96**:737-749.
47. Stemple DL, Anderson DJ: **Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest.** *Cell* 1992, **71**:973-985.
48. Suzuki K, Tanaka M, Watanabe N, Saito S, Nonaka H, Miyajima A: **p75 Neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver.** *Gastroenterology* 2008, **135**:270-281 e273.
49. Murdoch B, Roskams AJ: **Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology.** *J Mol Histol* 2007, **38**:581-599.
50. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano R, Rosner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M: **The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development.** *Genes Dev* 2001, **15**:66-78.
51. Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L: **Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling.** *Development (Cambridge, England)* 2001, **128**:3949-3961.
52. Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M: **Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells.** *J Neurosci* 1998, **18**:237-250.
53. Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ: **Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype.** *J Neurosci* 2004, **24**:5670-5683.
54. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S: **Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation.** *Cell* 2007, **129**:1377-1388.
55. Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y: **Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **379**:1114-1119.
56. Dupin E, Sextier-Sainte-Claire Deville F, Nataf V, Le Douarin NM: **The ontogeny of the neural crest.** *C R Acad Sci III* 1993, **316**:1062-1081.
57. Kocsis JD, Lankford KL, Sasaki M, Radtke C: **Unique in vivo properties of olfactory ensheathing cells that may contribute to neural repair and protection following spinal cord injury.** *Neurosci Lett* 2009, **456**:137-142.

57. Mackay-Sim A, St John JA: **Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries.** *Experimental neurology* 2011, **229**:174-180.
58. Li L, Mignone J, Yang M, Matic M, Penman S, Enikolopov G, Hoffman RM: **Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**:9958-9961.
59. Amoh Y, Kanoh M, Niyama S, Kawahara K, Sato Y, Katsuoka K, Hoffman RM: **Human and mouse hair follicles contain both multipotent and monopotent stem cells.** *Cell Cycle* 2009, **8**:176-177.
60. Uchugonova A, Hoffman RM, Weinigel M, Koenig K: **Watching stem cells in the skin of living mice noninvasively.** *Cell Cycle* 2011, **10**:2017-2020.
61. Uchugonova A, Duong J, Zhang N, Konig K, Hoffman RM: **The bulge area is the origin of nestin-expressing pluripotent stem cells of the hair follicle.** *J Cell Biochem* 2011, **112**:2046-2050.
62. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM: **Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**:17734-17738.
63. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM: **Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function.** *Cell Cycle* 2008, **7**:1865-1869.
64. Liu F, Uchugonova A, Kimura H, Zhang C, Zhao M, Zhang L, Koenig K, Duong J, Aki R, Saito N, Mii S, Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM: **The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla.** *Cell Cycle* 2011, **10**:830-839.
65. Hamburger V, Hamilton HL: **A series of normal stages in the development of the chick embryo.** 1951. *Dev Dyn* 1992, **195**:231-272.
66. Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: **Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.** *Developmental biology* 2004, **275**:124-142.
67. Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S: **bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells.** *Neuron* 1993, **11**:951-966.

doi:10.1186/1756-6606-4-34

Cite this article as: Katoh *et al.*: The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Molecular Brain* 2011 **4**:34.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



軟骨細胞分化における miRNA

浅原 弘嗣*

マイクロRNAはノンコーディングRNAの一種であり、20～25塩基ほどの1本鎖RNAである。ターゲットとなる遺伝子のmRNAに結合し、その発現を抑制する機能を持ち、発生、がん、炎症などあらゆる医学・生物学分野において重要な役割を担うことが明らかにされてきている。

本稿では、特に軟骨細胞および関節軟骨組織の発生、および恒常性維持におけるmiRNAの機能を紹介する。

Frontier of epigenome in bone research.

miRNAs in cartilage development.

Department of Systems BioMedicine, Tokyo Medical and Dental University/

Department of Systems BioMedicine, National Research Institute for Child Health and Development, Japan.

Hiroshi Asahara

MicroRNAs (miRs) are ~ 22 nucleotide non-coding forms of RNA and exhibit tissue or developmental stage specific expression patterns. Recent findings show that the expression of miR-140, which is specifically expressed in chondrocytes, is reduced in OA chondrocytes. Furthermore, knockdown of miR-140 in mice chondrocytes promotes arthritis in mice. In addition to this, several other miRs have also been shown to play important roles in chondrocytes. Thus, miRs should be critical factors for cartilage development and homeostasis.

はじめに

マイクロRNAはノンコーディングRNAの一種であり、20～25塩基ほどの1本鎖RNAである。ターゲットとなる遺伝子のmRNAに結合し、その発現を抑制する機能を持ち、発生、がん、炎症などあらゆる医学・生物学分野において重要な

役割を担うことが明らかにされてきている。

骨・軟骨の発生におけるmiRNAの重要性

通常のmRNAと同様、miRNAはまず数百～数千塩基長のpri-miRNA (primary microRNA) として転写され、さらに、その転写物がいくつかのス

*東京医科歯科大学医歯学総合研究科システム発生・再生医学分野・教授 / 国立成育医療研究センター研究所・客員研究部長 (あさはら・ひろし)

テップを経て成熟型の機能を持つ miRNA となる。

核内でまず酵素 Dorosha と DGCR8 により、stem-loop 構造の 70 塩基程度の pre-miRNA (precursor miRNA) に切り出され、さらにそれが Exportin-5 によって細胞質に運ばれ、Dicer および TRBP/PACT (transactivation-response element RNA-binding protein/protein activator of the interferon-induced protein kinase) により、20～25 塩基の miRNA を含む 2 本鎖 RNA が生成される。この 2 本鎖 RNA のうち miRNA 側のみが RISC (RNA-induced silencing complex) に結合することで、機能的 (mature) miRNA-RISC 複合体となる^{1) 2)}。

このようなプロセスにおいて Dicer は、ほぼすべての miRNA 生成に不可欠である。しかし、そのノックアウトマウスは胎生期 7.5 日で死亡するため³⁾、各組織における miRNA の機能研究では、それぞれの組織におけるコンディショナルな Dicer ノックアウトマウスの解析が行われてきた。

Tabin らは、胎芽全域で特異的に Cre を発現する Prx-Cre マウスと Dicer-Flox マウスを掛け合わせて、四肢特異的な Dicer コンディショナルノックアウトマウスを作製し、このマウスの四肢における骨形成は、骨形成パターン自体は保たれていたものの、四肢の短小化がみられることを報告し、軟骨・骨形成において miRNA が重要であることを示唆した⁴⁾。

さらに、内軟骨性骨化初期での軟骨誘導における miRNA の機能研究では、Kronenberg らは、Col2-Cre マウスと Dicer-Flox マウスを掛け合わせて軟骨特異的な miRNA ノックアウトマウスを作製し⁵⁾、このマウスには、内軟骨性骨化における軟骨の増殖が減少した結果、肥大軟骨細胞への移行が早まり、骨格の短小化が起きていることを

報告した⁵⁾。このように、軟骨発生分化においても miRNA が重要であることが明らかとなった。

■ 軟骨特異的な発現を示す miRNA

発生期に組織特異的な発現をする miRNA をシステムティックに解析する目的で、ゼブラフィッシュをモデルにホールマウントインサイチュアハイブリダイゼーション (whole mount *in situ* hybridization: WISH) を行った。結果、軟骨に発現を示すものについては、ユビキタスに発現するもの以外に、miR-146, 140*, 199a, 199a*, 145 の報告がある⁶⁾。その中でも、140, 199a, 199a* については、メダカや、ニワトリでも軟骨での発現が報告されている⁷⁾。特に、miR-140 は他の組織では発現が低く、軟骨のみに特異的な発現を示すことが、マウス胎児を用いた WISH によっても報告された⁸⁾。199a, 199a* については、small RNA のライブラリースクリーニングでマウス結合組織での発現が確認されている。miR-140 の軟骨における機能については、ゼブラフィッシュを用いた解析において platelet-derived growth factor (PDGF) シグナルを介する軟骨分化制御機構が確認された⁹⁾。

軟骨細胞に特異的に働く miRNA を同定するため、われわれは、ヒト関節軟骨を用いた miRNA に対するマイクロアレイ解析を行い、軟骨分化における miR-140 のより特異的な発現上昇を確認している¹⁰⁾。また、miR-140 の発現は MSCs の軟骨分化と正相関し、分化に伴って Sox9, Col2a1 のような軟骨分化マーカーと同じ発現増加を示すことも明らかとなった。

■ miR-140 と発生・軟骨ホメオスタシス (図)

miR-140 は正常ヒト関節軟骨で高い発現を示

pri-miRNA : primary microRNA, pre-miRNA : precursor miRNA

TRBP/PACT : transactivation-response element RNA-binding protein/protein activator of the interferon-induced protein kinase, RISC : RNA-induced silencing complex, WISH : whole mount *in situ* hybridization

PDGF : platelet-derived growth factor (血小板由来増殖因子)

す一方、変形性関節症 (OA) 軟骨においてはその発現量は有意に低下しており、IL1-βによる関節軟骨細胞刺激においても miR-140 の発現は低下することが確認された¹⁰⁾。これらの結果から、miR-140 の発現低下が OA における病的な遺伝子発現の誘因となっており、miR-140 が OA の病態と関連していることが示唆される¹⁰⁾。

そのためわれわれは、miR-140 ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを作製し、miR-140 の機能解析を行った。結果、miR-140 ノックアウトマウスは発生異常は認められなかったものの、生後、四肢、体幹、顔面の短小化がみられ、Dicer ノックアウトマウスでみられた表現型の一部が miR-140 で説明できることを確認した¹¹⁾。

同様の表現型は、われわれとは別の miR-140 ノックアウトマウスでも報告されている¹²⁾。これらの結果から、miR-140 が内軟骨性骨成長に不可欠であり、Dnpep を介した bone morphogenetic protein (BMP) シグナル抑制が、その原因の一つとして考えられた。

また、肢芽のマイクロマスカルチャーにおける miR-140 ノックダウン解析では、BMP シグナルの下流で働く Sp1 によって軟骨細胞増殖が低下することが報告されており¹³⁾、miR-140 が内軟骨性骨成長において、Dnpep、SP1、BMP2 といった複数の遺伝子をターゲットとして働いていることが明らかとなった。早期の OA では関節軟骨の変化のみならず、軟骨下骨の肥厚、柔軟性の

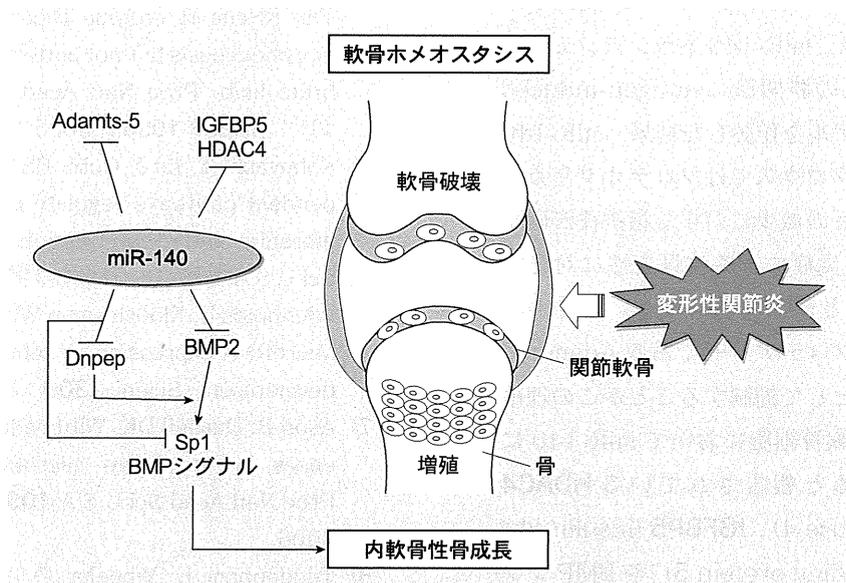


図 miR-140 を介した軟骨発生・代謝制御機構

miR-140 は、異なるターゲットを制御することで、内軟骨骨化と軟骨ホメオスタシスの両方を調節することができる。

BMP : bone morphogenetic protein, HDAC4 : histone deacetylase 4, IGFBP5 : insulin-like growth factor binding protein 5

(文献 11 より)

OA : osteoarthritis (変形性関節症), BMP : bone morphogenetic protein, AIA : antigen-induced arthritis
 HDAC4 : histone deacetylase 4 (ヒストン脱アセチル化酵素 4)
 IGFBP5 : insulin-like growth factor binding protein 5 (インスリン様増殖因子結合タンパク質 5)

低下、骨梁の減少なども起きており、OA 軟骨における miR-140 の発現の低下が、BMP シグナルを介して軟骨下骨の変性にも関与していることが示唆される。これらの変性によるストレスの増加が、関節軟骨の変性を促進させ OA の進行につながっていると報告もある¹⁴⁾。

軟骨ホメオスタシスにおける miR-140 の役割を明らかにするため、時間軸での miR-140 の変化を調べた結果、膝関節軟骨は生後1カ月まで正常であったが、3カ月以降は徐々にプロテオグリカンの減少や軟骨のフィブリレーションなどの OA の進行が確認された。また、サージカル OA モデルにおいても、miR-140 ノックアウトマウスは術後8週で wild type マウスと比べ有意に OA の進行が確認された。さらに miR-140 の軟骨変性への効果を調べるため、wild type マウス、miR-140 ノックアウトマウス、miR-140 トランスジェニックマウスそれぞれの膝関節に antigen-induced arthritis (AIA) モデルを作製した結果、miR-140 トランスジェニックマウスではプロテオグリカンと type-II collagen の減少に対する抵抗性が確認され、miR-140 が炎症による軟骨変性に対して予防効果を持つことが示唆された¹¹⁾。miR-140 が、OA の主要なプロテアーゼである Adamts-5 を直接の標的分子として抑制することがこの理由の一つであるが、軟骨細胞において miR-140 によって抑制されると報告されている HDAC4 (histone deacetylase 4)、IGFBP5 (insulin-like growth factor binding protein 5) や BMP シグナルなどもこの結果の一因となっていると考えられる^{10)~14)}。このように miR-140 は、複数の pathway において多数の遺伝子をターゲットにしていることが明らかになってきており、軟骨実質の生成や分解を調節し、軟骨のホメオスタシスを維持する主要な miRNA であると言える。

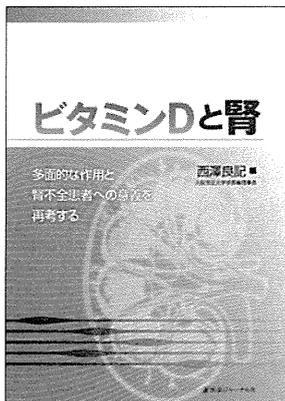
おわりに

miR-140 による軟骨治療は、早期の OA に対して理想的な治療薬となる可能性を秘めており、今後の研究が期待される。

文 献

- 1) Carthew RW, Sontheimer EJ: Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**: 642-655, 2009.
- 2) Siomi H, Siomi MC: On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* **457** (7228): 396-404, 2009.
- 3) Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al: Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**: 215-217, 2003.
- 4) Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, et al: The RNase III enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (31): 10898-10903, 2005.
- 5) Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, et al: Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (6): 1949-1954, 2008.
- 6) Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al: MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* **309**: 310-311, 2005.
- 7) Ason B, Darnell DK, Wittbrodt B, et al: Differences in vertebrate microRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14385-14389, 2006.
- 8) Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al: The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett* **580**: 4214-4217, 2006.
- 9) Eberhart JK, He X, Swartz ME, et al: MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis. *Nat Genet* **40**: 290-298, 2008.
- 10) Miyaki S, Nakasa T, Otski S, et al: MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 re-

- sponses. *Arthritis Rheum* **60** (9) :2723-2730, 2009.
- 11) Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al : MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev* **24** : 1173-1185, 2010.
- 12) Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T : Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Mol Cell Biol* **31** : 3019-3028, 2011.
- 13) Yang J, Qin S, Yi C, et al : MiR-140 is co-expressed with Wwp2-C transcript and activated by Sox9 to target Sp1 in maintaining the chondrocyte proliferation. *FEBS Lett* **585** : 2992-2997, 2011.
- 14) Araldi E, Schipani E : MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis. *Genes Dev* **24** : 1075-1080, 2010.



ビタミンDと腎

—多面的な作用と腎不全患者への意義を再考する—

大阪市立大学学長兼理事長 西澤 良記 編

A4判 168頁 定価 4,410円 (本体 4,200円 + 税 5%) 送料実費
ISBN978-4-7532-2451-7 C3047

おもな内容

I. 栄養学の観点から

- ビタミンD作用における25(OH)Dの栄養指標および臨床指標としての意義
- (1) ビタミンD不足・充足の栄養指標としての25(OH)Dの意義
 - (2) 骨密度低下・骨折予知のためのバイオマーカーとしての25(OH)Dの意義
 - (3) ビタミンDの転倒予防効果

II. 分子生物学的観点から

- ビタミンDの分子作用機序に関する最近の進歩
- (1) ビタミンDによる転写制御の分子機構
 - (2) VDRの高次機能
 - (3) ビタミンDによる non-genomic action

III. 多面的作用について

- ビタミンDの作用、基礎と臨床
- (1) ビタミンDの古典的作用
～基礎と臨床から～

- (2) ビタミンDの非古典的作用
～基礎の面から～

- (3) ビタミンDの非古典的作用
～臨床の面から～

IV. CKD-MBDの観点から

- CKD-MBDという新しい概念
- (1) ビタミンDのCKD-MBD発症における役割
 - (2) CKD-MBDにおける骨病変
 - (3) CKD-MBD診療のエビデンスとガイドライン

V. 臨床的観点から

- 静注ビタミンDが登場した歴史的背景
- (1) 静注用ビタミンD製剤に期待された効果とその成果
 - (2) 静注用ビタミンD製剤副甲状腺内局注療法の開発
 - (3) ビタミンD治療～今後の展望～

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号)
〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369 (00910-1-33353)
<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページからが便利です。

1. Whole mount *in situ* hybridization (WISH) を用いた軟骨発生・分化における遺伝子ネットワークの解明

味八木 茂* 浅原 弘嗣**

組織発生における分子ネットワークを明らかにするために用いられるポストゲノミックな手法として、個々の細胞種あるいは組織でのマイクロアレイ解析や時空間的な発現パターンを同定する *in situ* ハイブリダイゼーション法がある。マイクロアレイ解析に比べ、システマティックな *in situ* ハイブリダイゼーション解析は、組織でのより空間的な遺伝子制御に関する情報をもたらす。その結果、転写遺伝子のクラスターの同定に繋がる。我々は筋骨格系の発達が著しい時期のマウス胎仔を用いて、転写因子、コファクターおよび microRNA を含む WISH データベースを構築した。WISH を用いた我々のアプローチにより、筋分化でのフィードバックメカニズム、腱の発生や軟骨の恒常性において、重要な役割を担う新たな制御因子とネットワークが明らかになった。

Cutting edge on research of cartilage metabolism.

Analysis of molecular network in chondrocytes by WISH.

The Scripps Research Institute.

Shigeru Miyaki

National Research Institute for Children and Development / The Scripps Research Institute.

Hiroshi Asahara

One postgenomic strategy used to identify molecular networks functioning in tissue development is microarray analysis of individual cell types or tissues followed by *in situ* hybridization to identify temporal and spatial gene expression patterns. Compared with microarray analysis, the systematic *in situ* hybridization database presented here provides more detailed information on the spatial regulation of gene expression and allows identification of discrete clusters of transcribed genes. We created a whole-mount *in situ* hybridization (WISH) database, containing expression data of transcription factors, cofactors and microRNA expressed in mouse embryos a highly dynamic stage of skeletogenesis. Our approach, WISH provided us new regulators as a critical effector in a myogenic feedback mechanism, tendon development and cartilage homeostasis.

*スクリプス研究所 シニアリサーチアソシエート (みやき・しげる)

**国立成育研究医療センター システム発生・再生医学研究所・部長 / スクリプス研究所・主任研究員 (あさはら・ひろし)

はじめに

骨軟骨発生は、個体の形づくりに重要な役割を果たしている。それゆえ、先天性疾患機序の解明や、軟骨再生、関節疾患治療法の開発のためにも、軟骨発生・分化の分子生物学的なさらなる研究が必要とされている。たとえば、軟骨において最も重要な転写因子である *Sox9* は、その下流遺伝子群をどのように制御しているか、どのようなネットワークを形成して、時期特異的および組織特異的にどう機能するのかなどは、未だ明らかになってはいない。我々は、複数のポストゲノムの手法を開発あるいは導入し、それらを組み合わせることで、四肢発生に重要な役割を果たす軟骨発生・分化を決定する転写ネットワーク解明を目指し、以下のアプローチを行っている。

(1) 全転写制御因子および microRNA (以下 miRNA と略す) に対して、胚発生における Whole mount *in situ* ハイブリダイゼーション (以下 WISH^註と記述) を行い、データベースを構築。

(2) 抽出された遺伝子の機能情報を得るため、ChIP on Chip および ChIP-Sequence 解析、ハイスループット遺伝子導入解析の2つのポストゲノミックアプローチを確立し、ゲノムワイドかつ高速な解析。

そのなかでも WISH による成果の一部をここに紹介する。

Whole mount *in situ* hybridization (WISH)

ポストゲノム研究の重要な課題でもある個々の分子機能の解明において、その目的分子の生体内における発現の局在やその経時的変化を把握することは、我々に重要で多くの情報をもたらす。また、我々の目指す分子ネットワークの同定、解析においては、中心となる分子と協調して作用する分子の探索が重要であるが、目的分子と同時期に

同局在を示す遺伝子群を分類することで、ネットワークに関わる分子を効率よくスクリーニングできる。

1. WISH の利点

タンパク質の局在を見る場合は、抗体を用いた免疫染色法を、遺伝子発現の局在を見る場合は、そのアンチセンスプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法などを行う。これには、組織を剥切した薄い切断面での発現を見る組織切片法と、固定した胚を用いた全身における発現を調べるホールマウント法とに大別できる。現在、さまざまなモデル生物を用いた遺伝子発現データベース作製が全世界で進行中である。例えば、マイクロアレイ法を用いた発現データベースは、各組織・臓器、あるいは細胞ごとの膨大な発現データを含蓄し、さまざまな側面から利用されている。

しかしながら、これらのデータベースは、詳細な発現部位を特定することは困難であるという欠点がある。それに比べて、*in situ* ハイブリダイゼーション法では、細胞レベルでの微小な発現位置まで視覚的に特定できるという利点がある。中でも WISH 法は、あらゆる組織・臓器における発現を1個体、1回の解析で捉えることができるという点で、マイクロアレイ法では困難な視覚的な発現位置情報を与えてくれる。これまでに、いくつかのグループにより、さまざまなモデル生物を用いた WISH 法によるデータベースが構築されてきた。しかし、これらの多くは、さまざまな研究者による「投稿型」であることから、実験条件が一定ではなく、比較・解析が難しいという短所があった。

2. WISH データベースの構築

そこで、我々は遺伝子発現を制御するスイッチ

WISH : whole-mount *in situ* hybridization (胚発生における whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーション)

ともいうべき役割を果たす転写因子群(転写因子, 転写コファクター)の網羅的な発現解析をマウス胚を用いて行った。この我々が独自に行った WISH データベース作製は, 転写因子群のリスト作製からはじまり, プローブ作製に用いた cDNA のクローンは, 合計 1,670 クローンに達した。プローブ作製などの詳細は文献を参照していただきたい¹⁾。この約 1,600 種類の転写因子について WISH を行った結果, 胚全体でいずれかの組織に明瞭な発現がある転写因子は 962 遺伝子, 肢芽に発現がある転写因子は 691 遺伝子に及んだ。我々は, このデータベースを「EMBRYYS」と命名し, 25,000 枚を超える画像とともにオープンアクセスとして全世界に公開している (<http://embryys.jp/embryys/html/MainMenu.html>)。(図 1)

我々はこの EMBRYYS を通して, 筋の発生・分化のマスター遺伝子である転写因子 *MyoD* や *Myogenin* と同じ発現様式を示した転写抑制因子である *RP58* を同定した。この *RP58* の機能は, *Id2/3* をはじめとした筋分化の際に不要となる遺伝子群の転写抑制に働くことである。これまで知られていた *MyoD* → *Myogenin* → 筋最終分化遺伝子発現という, “正の” 遺伝子発現カスケードに加えて, *MyoD* が *RP58* の発現を誘導し, *RP58* が *Id2/3* の発現を抑制するという, “負の” 遺伝子制御のネットワークが *MyoD* より下流の筋分化過程に存在することを提唱した²⁾。さらに, 腱における新規の転写因子 *Mohawk (Mkx)* を同定し, そのノック

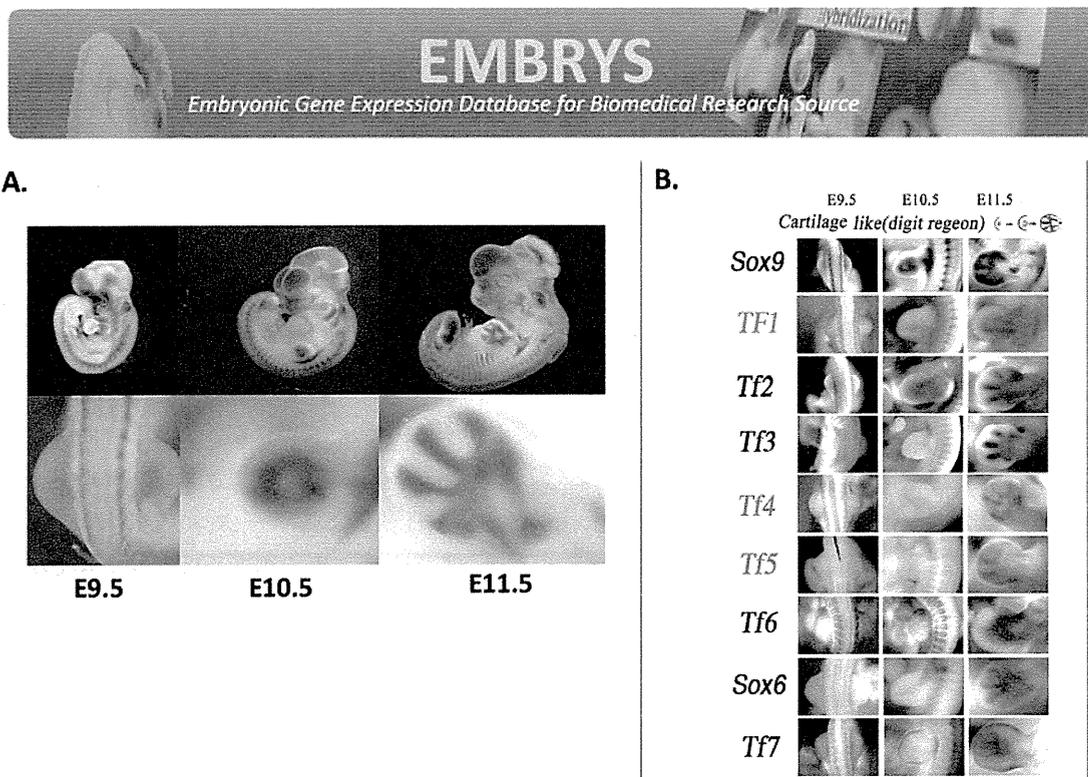


図 1 WISH データベース EMBRYYS の構築

A. 3 ステージのマウス胚の WISH 例, 軟骨マスター転写因子 *Sox9*

B. *Sox9* と同期して発現している転写制御因子群

(<http://embryys.jp/embryys/html/MainMenu.html> より)

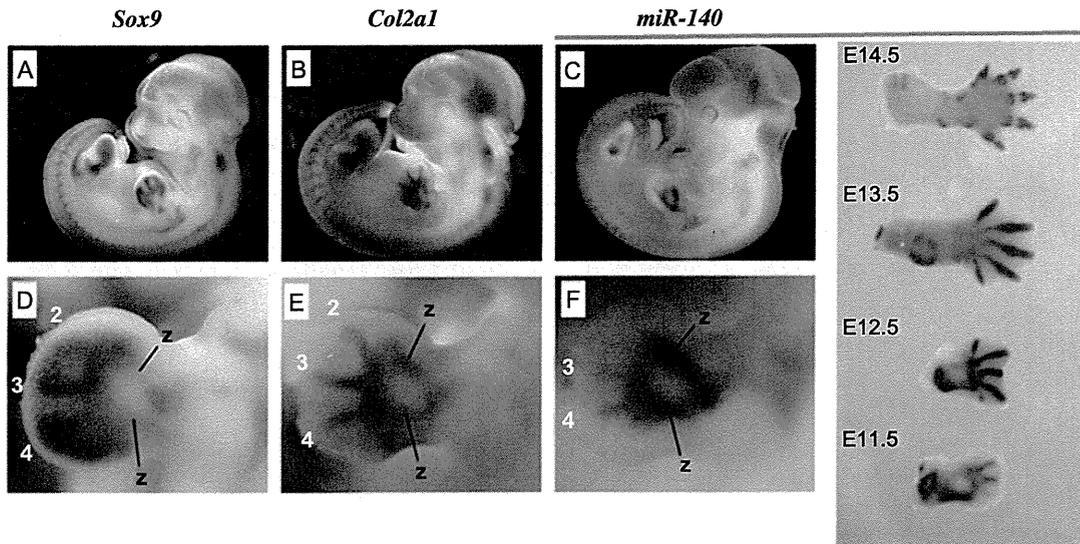


図2 マウス発生期における miR-140 の発現様式

転写因子 *Sox9* (A, D) と *Col2a1* (B, E), *miR-140* (C, F) の発現様式の比較 (E11.5)。上肢における *miR-140* の発現変化 (E11.5 ~ E14.5)。 (筆者ら提供)

アウト (KO) マウスを世界に先駆けて報告した³⁾。この *Mkx* KO マウスは、全身における腱の低形成が引き起こされることから、これまで腱の発生・分化に関与する唯一といってよい転写因子、*Scx* の機能に加えて⁴⁾、この *Mkx* が、腱の発生、再生および修復を理解する上で有用な新たな遺伝子になると期待される。

microRNAs

近年、多くの生物学的プロセスや疾患に関わっているとされるノンコーディング RNA である microRNA は、多くの分野で注目されている。miRNAs は、タンパク質をコードしない低分子 RNA であり、ヒトではこれまでに 500 種類以上の miRNA が同定されている。これらの miRNA は、標的となる複数の遺伝子の発現を抑制的に制御することが知られており、新たな制御因子であることがわかってきた。そして、いくつかの

miRNA は組織特異的な発現様式を示し、その組織形成や機能に深く影響することで発生・分化や疾患などさまざまな生命現象に深く関与することが次第に明らかになってきている⁵⁾。

しかし、miRNA による病理生理的機能の詳細はいまだ明らかになっていない。我々は、WISH を用いていくつかの miRNA についてその発現解析を行ったところ、軟骨発生・分化に必須である転写因子 *Sox9* と同様な発現様式を示す *miR-140* に注目した (図2)。この miRNA は、ゼブラフィッシュやマウス発生期において軟骨形成領域特異的に発現することが他のグループからも報告されている^{6) 7)}。

1. miR-140 の軟骨での発現

我々は、ヒト軟骨細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (以下 MSC^註 と略す) における miRNAs の発現を miRNA マイクロアレイ解析により比較した

MSC : mesenchymal stem cell (間葉系幹細胞)

ところ、軟骨細胞で高発現しており、MSCとの間で最も発現差のある miRNA としても *miR-140* が示された。この *miR-140* は、MSC による軟骨分化誘導にともない、*Sox9* や *Col2a1* のような軟骨分化マーカー遺伝子の発現様式と同様な発現の増加を示した。また、軟骨細胞の脱分化に伴い、その発現は *Col2a1* などと同様に減少した。我々は、この軟骨特異的 miRNA である *miR-140* と関節疾患との関わりを調べるために、変形性関節症（以下 OA と略す）軟骨における *miR-140* の発現を調べた。その結果、*miR-140* の発現は、正常軟骨に比

べ、OA 患者の軟骨でその発現が低下していること、また、軟骨細胞への IL-1 β 刺激は、*miR-140* の発現を低下させることも示し、OA 軟骨で見られる遺伝子発現の異常に関与することを報告した⁸⁾。

Illipolis らも、正常関節軟骨と OA 患者由来の軟骨を用いた miRNA プロファイリング中に OA 軟骨で発現の低下していた 7 つの miRNAs の中の一つとして *miR-140* を示した⁹⁾。これらの情報は、*miR-140* が軟骨発生・分化や OA 発症になんらかの関与があることを示唆した。

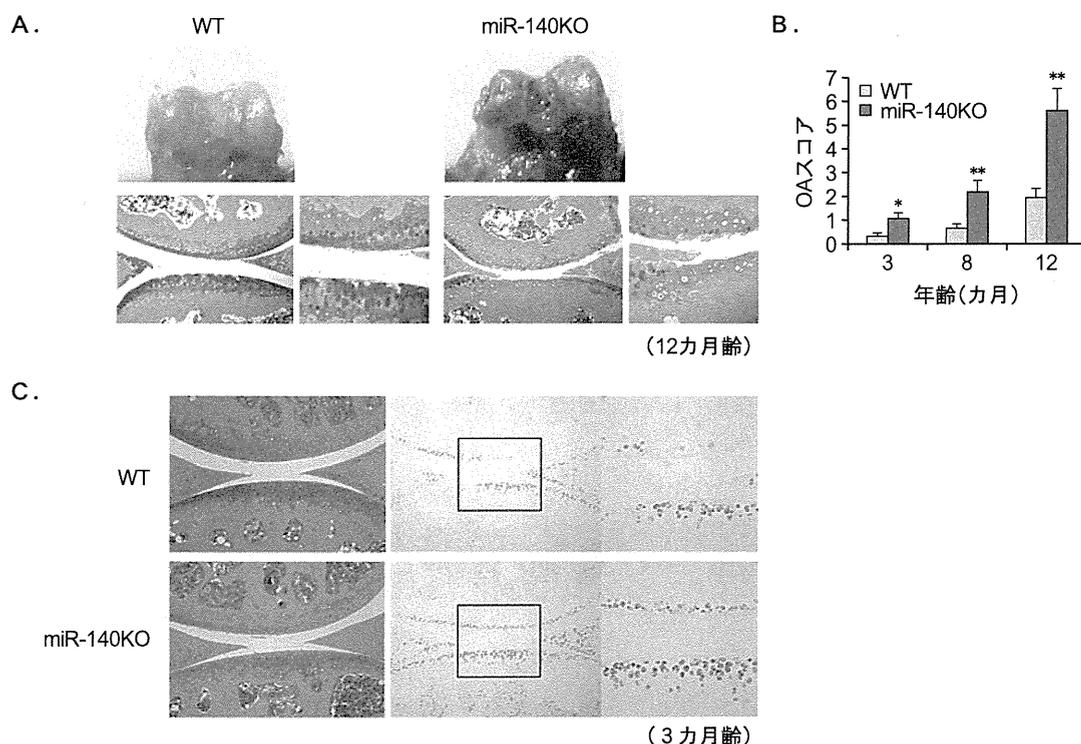


図3 miR-140 ノックアウト (KO) マウスの加齢による膝関節軟骨の変形性関節症 (OA) 様変化

A. miR-140 KO マウスは、加齢にともないプロテオグリカンの低下が進行し 12 カ月齢では軟骨破壊がみられる。

B. 加齢による WT と 140 KO マウスの OA スコア比較。

C. miR-140 KO マウス (3 カ月齢) の関節軟骨では、ADAMTS-5 の発現が増加している。

(巻頭カラーグラフィック5頁参照)

(文献 12 より改変)

OA : osteoarthritis (変形性関節症)

2. miR-140 ノックアウトマウスの表現系

そこで、我々は miR-140 の遺伝子改変マウスを作製し、軟骨発生や OA 発症への関与を解析した。発生期における miR-140 KO マウスは、顕著な骨格異常などはみられなかったが、出生後 1 カ月までに低身長や頭蓋顔面異常を伴う軽度な骨格異常を呈した。この原因の一つとして、軟骨細胞の増殖遅延が示唆されたが、関節軟骨をはじめとした関節の形態や構造には異常がみられなかった。これまで、OA 発症、進行には、主に加齢による軟骨の恒常性(アナボリックとカタボリック)バランスの変化、外傷などによるメカニカルストレスの増大、関節内における炎症などが重要であると考えられている。そこで、KO マウスを用いた加齢モデル、靭帯切除によるメカニカルストレス過負荷モデル、炎症誘発モデルによる膝関節を解析した。

興味深いことに加齢モデルにおける膝関節軟骨は、3 カ月齢マウスにおいて徐々に軟骨基質であるプロテオグリカンの低下が観察され、8 カ月齢ではプロテオグリカンの低下を伴う軟骨変性が進行していた。さらに 12 カ月齢マウスでは、激しい軟骨破壊が観察された(図 3)。メカニカルストレス過負荷モデルにおいても KO マウスは、野生型(WT)に比べて軟骨変性が有意に進行することを示した。

3. miR-140 と OA

次に、一過性の炎症誘発モデルにおいても KO マウスは、野生型に比べて軟骨変性が進行していた。一方、興味深いことに miR-140 を過剰発現する TG マウスは、野生型に比べ軟骨変性の進行が抑制されていた。

ではなぜ KO マウスは、OA 様の症状を示したのであるか? このメカニズムを明らかにするために、miR-140 がその発現を抑制的に作用する標的遺伝子を同定することは重要な情報を与える

と考えられる。我々は、WT マウスと KO マウスの軟骨細胞を用いたマイクロアレー解析および標的遺伝子予測アルゴリズム“TargetScan”などを用いて miR-140 の標的遺伝子となる候補を絞り込んだ。

OA の所見は軟骨基質であるプロテオグリカンの変性であり、そのプロテオグリカンを分解する主な酵素が ADAMTS-5 である。この Adamts-5 KO マウスは OA を引き起こさないことから、OA における ADAMTS-5 の重要性が示された^{10) 11)}。我々はこの Adamts-5 が miR-140 の標的遺伝子候補の中にあることをみつけ、その詳細を調べたところ、miR-140 が標的遺伝子の一つとして直接的に Adamts-5 を制御していることにより、プロテオグリカンの分解に影響を及ぼしていることを明らかにした。

つまり、miR-140 KO マウスは、加齢やメカニカルストレス、炎症などによる軟骨におけるカタボリックな因子の増大を制御できなくなり、軟骨代謝の恒常性バランスを崩すことによって OA が発症することを提唱した¹²⁾。

4. miR-140 の発現制御

それでは、この miR-140 の発現はどのように制御されているのだろうか。miR-140 の発現は、WISH の結果からも Sox9 の発現時期から少し遅れて軟骨特異的な発現様式を示すことから、SOX9 による制御の可能性について調べた。その結果、miR-140 の転写開始点の近傍に SOX9 結合領域を 3 つ同定し、その領域の SOX9 または SOX5, SOX6 トリオによる転写活性が示された。また、この領域を LacZ の上流に結合させたトランスジェニックマウスは、軟骨特異的な発現様式を示すことから、この領域への SOX9 の結合は、miR-140 を軟骨特異的に発現させるために重要な領域であることが示された(投稿準備中)。また、Dudek らは、miR-675 が軟骨特異的な発現

パターンを示し、軟骨細胞の脱分化によりその発現を減少させることを示した。そして、この miR-675 の発現は、SOX9 によって制御され、Col2a1 の発現は miR-675 によってポジティブに制御されることを報告している¹³⁾。このように SOX9 は、Col2a1 のような軟骨基質をコードする遺伝子群を直接的に制御するだけでなく、miRNA のようなノンコーディング RNA の発現をも制御し、転写ネットワークを形成することで軟骨分化および恒常性を司っていることが明らかになってきた。

5. miRNA による軟骨の遺伝子ネットワーク

SOX9 を起点とする軟骨発生・分化における転写ネットワークを miRNA のようなノンコーディング RNA を含む転写産物について、ChIP-Sequence を用いた解析や細胞ベースのシステムティックな遺伝子機能スクリーニングを駆使することで、これまでの“正の”遺伝子発現カスケードに加えて、今までよく分っていなかった転写抑制因子や miRNA による“負の”遺伝子制御ネットワークの存在とその重要性が、今後、次第に明らかになってくるであろう。軟骨における遺伝子ネットワークの解明は、骨軟骨細胞分化を促すシグナルや恒常性を保つシグナルの同定を導き出し、いまだ十分な治療法の存在しない OA など関節疾患の創薬シーズの探索や再生医療にも寄与できると考える。

おわりに

ポストゲノム研究においては、ほぼ全ての遺伝子に背番号が与えられたことにより、これら全ての遺伝子の自空間的、生理病理的な機能がくまなく解析できるようになった。マイクロアレイに加えて、個体レベルでの遺伝子発現情報や遺伝子機能を発現しての大量解析が重要となってきている。もうひとつの“ポストゲノム研究”は、まだ

知られていなかった遺伝子群、例えばノンコーディング RNA に代表される新しい遺伝子機能を発見、解明することであろう。これら二つの新しい研究戦略が合わさることで、詳細な軟骨の発生と疾患病態の分子機構が明らかになり、ひいては関節疾患の再生・再建医療にも貢献できるようになることが期待される。

文 献

- 1) 横山成俊, 浅原弘嗣: EMBRYOS: 発生過程の転写因子発現パターンの網羅的データベース構築. 細胞工学 **29** (9): 920-927, 2010.
- 2) Yokoyama S, Ito Y, Ueno-Kudo H, et al: A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. Dev Cell **17** (6): 836-848, 2009.
- 3) Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, et al: The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A **107** (23): 10538-10542, 2010.
- 4) Murchison ND, Price BA, Conner DA, et al: Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. Development **134** (14): 2697-2708, 2007.
- 5) Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell **136** (2): 215-233, 2009.
- 6) Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al: MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. Science **309** (5732): 310-301, 2005.
- 7) Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al: The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. FEBS Lett **580** (17): 4214-4217, 2006.
- 8) Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, et al: Micro RNA-140 is expressed in differentiated hu-