

領域略称名：細胞コミュニテイ
領域番号：3105

平成26年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る事後評価報告書

「哺乳類初期発生の細胞コミュニテイ」

(領域設定期間)

平成21年度～平成25年度

平成26年6月

領域代表者：基礎生物学研究所・初期発生研究部門・

教授・藤森俊彦

目 次

1. 研究領域の目的及び概要	2
2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	4
3. 研究領域の設定目的の達成度	6
4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	9
5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	10
6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	11
7. 総括班評価者による評価	12
8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	13
9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	16
10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	21

1. 研究領域の目的及び概要（2 ページ程度）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

学術的背景

発生生物学は、今、大きな変革期にある。先の世紀に始まった分子生物学を大きく取り入れた発生学研究は、個々の現象に関わる遺伝子やタンパク質の機能について膨大な情報を与えた。その一方で、個体の発生という、経時的にダイナミックに変動する細胞集団を理解するには、未だ多くの本質的問題が未解決のままである。例えば、胚の中において細胞がどのように個性を獲得し、それがどのように細胞の配置に反映されて体軸が形成されるか、さらに、その際に個々の分子や細胞が何を行っているかは、まったく分かっていない。即ち、このような発生の本質的問題を解明するためには、これまでの遺伝子を中心とした局所的・静的な理解だけでなく、**細胞集団としての胚を時間的、空間的に「細胞コミュニティ」として捉えなおし、現象を総体として連続的に理解することが必要**である。そのためには従来の研究手法にとらわれず、膨大な動的画像情報の解析、現象に潜む法則性の数理的抽出など、新規の手法を取り入れる必要がある。また、細胞の動態を理解するには、胚内において個々の細胞を細胞生物学的に解析することが必要である。近年の発生生物学、細胞生物学等の進展により、新しい視点から発生の本質的問題に取り組む環境は整ったといえる。

そこで、研究対象を哺乳類の初期発生に絞込み、本領域を組織した。哺乳類の初期発生は、他の脊椎動物とは異なりその様式は柔軟であり、着床までに形成される胚体外組織と胚組織間、あるいは各組織内での**細胞コミュニティとも呼ぶべき細胞間の相互作用**が、胚の形態形成に重要な役割を果たす。前後軸は、まず胚体外内胚葉上に決定され、これが胚に伝達される。原条の形成部位の決定には胎盤組織との接触が重要となる。左右軸形成においては、ノードから左右側板へ長距離の情報伝達がなされる。このように、初期胚は、その構成がシンプルでありながら、細胞分化、細胞移動、細胞増殖、細胞死といった胚発生のエッセンスが凝縮しており、**細胞の挙動は細胞コミュニティによって胚全体で統制**されている。このような比較的少数の細胞コミュニティによって生み出される哺乳類に特有な発生様式を理解することは、ヒトの発生過程の理解ならびに疾患の解明につながり、ES や iPS 細胞の分化制御の理論的基盤を与えると期待される。

これまで、哺乳類の初期発生研究は、主にマウスで行われてきた。約半世紀前に受精卵から胚盤胞への体外培養系が樹立され、再び胚を子宮に移植して発生させることも可能になった。そして、発生工学的技術によって作製された遺伝子改変マウスの解析から、分化運命決定、体軸形成に関与する様々な遺伝子が同定、解析された。本領域の計画研究者においても、目野が左右軸決定過程における Nodal シグナルの役割を、佐々木が栄養外胚葉分化における転写因子 Tead4 の役割を明らかにした。

しかし、これらの解析の過程で以下の点が改めて**重要な技術的問題**として認識された。着床直後の胚の解析の技術的困難さ：哺乳類胚は子宮に着床する特徴をもつが、着床後初期の胚は摘出、あるいは子宮内で解析することは非常に難しい。着床前から確立されていく胚の位置情報が、着床後の発生過程にどのように反映されるのかを直接検証する事は重要な課題であるが、着床というハードルにより着床前後の理解が断絶している。着床直前の胚盤胞ですらその細胞数は 200 個に満たないので、生化学的解析は極めて困難である。従来の発生過程のスナップショット的解析手法に起因する誤謬のリスク：線虫等のように決定論的ではない哺乳類初期発生過程で、初期胚細胞に観察される不均一性が実際に細胞分化運命決定を規定しているのかどうかを見極める事は、時間的に断片化した解析からは極めて困難である。

また、**学問的問題として、胚発生の場の中で時間・空間的に連続した理解が必要**である。その為には、分泌シグナルや細胞間接触による細胞間や細胞集団間の相互作用の場における情報のありかた、それらの情報を細胞内に伝達し遺伝子発現に反映させる様式、細胞の反応として現れる細胞極性の獲得、細胞骨格や細胞の形態の変化、更にそれらの細胞の反応が再び他の細胞との相互作用へとつながる一連の機構を明らかにする必要がある。

最近、これらの問題を解決する糸口が得られつつある。本領域代表者の藤森は、遺伝子操作による細胞標識法とライブイメージング法を駆使することにより、着床前胚の発生が基本的には決定論的なものではないことを明らかにした。

何をどこまで明らかにするか

本領域においては、着床前ならびに着床後の初期発生の諸過程に関与する細胞および、分子機構の解析を、従来の方法に加えて、ES 細胞分化誘導法、遺伝子操作による細胞標識法、ライブイメージング法、

画像解析および現象の数理モデル化といった新たな手法を総合的に適用することにより飛躍的に発展させたい。さらに、着床直後の胚を解析する手法を開発して各研究に適用する事により、最終的には哺乳類初期発生の細胞コミュニティに起こる形態形成過程を制御する分子機構を連続的・包括的に解明することを、その目標とする。

計画研究における具体的研究内容は以下のとおりである。

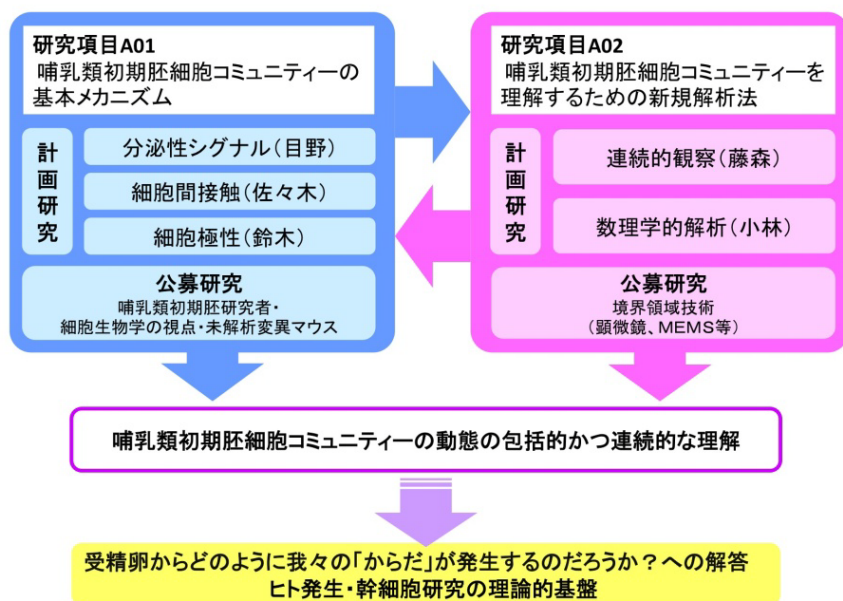
1. 分泌性シグナルの形成とその機能の解明 (目野)
2. 細胞間の接触情報を細胞の個性に反映するメカニズムの解明 (佐々木)
3. 細胞の個性を胚の形態形成に反映する機構の解明 (鈴木)
4. 胚発生の新規解析法の開発 (藤森)
5. 画像情報の処理と胚発生の数理モデル化 (小林)

本領域の発展がどのように学術水準の向上・強化につながるか

本領域は、対象として「多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの」に相当する。それぞれ異なるアプローチを持ち寄ることによって、哺乳類初期発生の理解という学術領域の研究の飛躍的向上、強化をもたらし、世界的にも新規な知見に到達することが可能となることを期待している。本領域は、実質的な研究領域の進展を目指し、共同研究を活発に行い、情報交換も綿密に行う。班会議等の研究集会に限らず、情報を流すネットワークを整備する。研究内容の情報や、実験のツール、手法に関しても早い段階で共有しあうことで、各々の研究の進む速度を促進できることが期待される。若手の研究人材の育成のためにも、研究室間で技術的交流をし、実際に実験を行う者が行き来できる環境を整える。また、哺乳類初期発生研究の裾野を広げるため、技術講習会等を通じた草の根の活動にも取り組む。

また、「異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの」、「当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの」としての一面も持つ。発生生物学、細胞生物学の様々な手法からのアプローチだけでなく、定量化、モデル化を目指し、さらにモデルからの生物学実験へのフィードバックを目標とし、これが成功すれば他領域の良いモデルケースとなり得る。

「1個の受精卵からどのように体が作られるか」は、生物学における根源的な問いである。その理解に向けられる関心の強さは、例えばマウスをモデルとした哺乳類発生の解析で、受精卵がまず分裂して生じる2つの割球が均等な分化能力を持つのかどうかについて、過去10年に渡り Nature や Science といった世界的なトップジャーナル誌上で論争が繰り広げられたことから、窺い知ることができる。この論争は、最終的には本領域代表の藤森らが 2007 年 Science に報告したライブイメージングを駆使した解析により、2細胞期のそれぞれの割球に分化能の差はないことが検証され、ほぼ終結したと思われる。様々な新しい技術の開発が進む今日状況において、一研究者、ないしは一つの研究室がその全てをカバーすることは極めて困難であり、今後、より厳密に「1個の受精卵からどのように体が作られるか」を問い続けるためには、本申請のような学問分野を越えた研究者の緊密な連携は不可欠と考えられる。さらには、胚発生が、決定論的ではなく、主に細胞コミュニティによる調節機構で自律的に制御される哺乳類初期発生機構を解明する事は、今後の医学・発生学への一般論的貢献のみならず、システム論・制御工学など他分野にも影響を及ぼす事が期待できる。



2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2 ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

【研究組織概要】本研究では、計画研究、公募研究に共通な2つの研究項目(A01, A02)を設定し、計画研究を主体として研究を進め、更に計画研究を補完する優れた公募研究を採用し、初期胚における細胞コミュニティを理解し、目的の項目に示した目標を達成することを目指した。

A01 は「哺乳類初期胚細胞コミュニティの基本メカニズム」を対象とし、目野、佐々木、鈴木が計画班を務めた。マウス初期胚において、個々の細胞が胚の中で個性を獲得し役割を果たしていく過程を、分子・細胞レベルで解析し、胚中の細胞コミュニティにおける個々の細胞、分子の挙動を解明することを目的とした。目野(分担：和田)が前後/左右軸形成時の細胞外シグナルの解析を、佐々木(分担：西中村)が着床前後の細胞間接触を介した遺伝子発現の制御機構を、鈴木が胚の中での細胞極性形成の基本機構を担当した。公募研究として、初期胚における細胞極性形成(上野)、細胞の移動・再配置による体軸伸長(竹本)、前後軸形成(高岡)、上皮細胞形状制御(田ノ上)、基底膜の組成(二木)、細胞死動態(山口)、パターン形成(柊)、モルフォゲン勾配(松尾)、隣接細胞間シグナル伝達(下條)などの、初期胚理解に不可欠な多細胞発生動態に関連する研究を幅広くカバーする班が参加した。さらに、Vps52 シグナル関連遺伝子(杉本)、Strawberry Notch1 とヘリカーゼ関連因子(渡邊)、クロマチン制御と転写因子クロストーク(遠藤)、初期胚のヒストン修飾(田中)などの細胞内転写・エピジェネティック制御機構および、細胞膜タンパク質の分解(原)や生体内エネルギー(ATP)(山本)などの細胞内分子機構に関連する研究も参加している。

A02 は「哺乳類初期胚細胞コミュニティを理解するための新規解析法」を対象とし、藤森、小林が計画班を務めた。哺乳類胚は発生が子宮内で進むためその解析が困難であり、また、発生様式の柔軟性から、発生の経時的に連続した解析が必要になる。藤森(分担：丹羽)がライブイメージング、胚の培養法、初期胚の生化学的解析を可能にする ES 細胞による代替法などを含む新規解析法の開発を、小林が情報を画像解析や数理的手法で解析する研究を担当した。公募研究としては、クロマチン制御のリアルタイム解析(國府)、着床前胚の長期イメージング(山縣)、哺乳類胚 MEMS アッセイプラットフォーム(木村)、そして、画像解析と数理モデル(中里)などの将来の初期胚研究で重要な役割を果たしうる様々な技術関連の研究者が参画した。

【連携の概要】本領域では、領域立ち上げ当初から計画班を中心として、サンプルやマウスの提供、計測などの技術指導などのサポート、更には共同研究の実施を積極的に行い、領域内での密な連携体制の構築に努めてきた。また、班会議などを通して、公募班の間でも互いに交流する機会を設けることによって、計画班との間だけではなく、公募班の間の共同研究や連携も自発的に形成された。各班の間の連携関係(サンプル提供ほか)や共同研究関係は次頁の図にまとめられている。特に細胞生物学的な研究については、計画班の佐々木・鈴木・丹羽(藤森班分担)が中心となり、領域内でのサンプルや技術的なサポートを行っている。他方で、マウスや胚関連の技術については、目野・和田(目野班分担)・藤森の計画班と、ATP 活性可視化マウスを有する公募の山本班が、領域内での共同研究や連携に中心的な役割を果たした。画像解析や MEMS などの境界領域技術については、着床前胚を対象とした連携が藤森班と小林班を中心として山縣・木村・原公募班の間で形成されている。

本研究領域において各研究者間で交流が行われた技術・手法・マテリアルとしては、

- ・ 実験サンプル：プラスミドコンストラクト、ES 細胞ライン、遺伝子組み換えマウスなど
- ・ 分子・発生物学的技術：抗体染色、初期胚培養、幹細胞の維持・樹立、CRISPR/Cas9 システム
- ・ 網羅的解析手法；次世代シーケンサー解析、エンハンサー解析、結合タンパク質スクリーニング法
- ・ 初期胚計測技術：顕微鏡計測技術、イメージングプローブ技術、計測最適化技術など
- ・ 情報・工学関連技術：画像解析・マイクロ・ナノデバイスなど

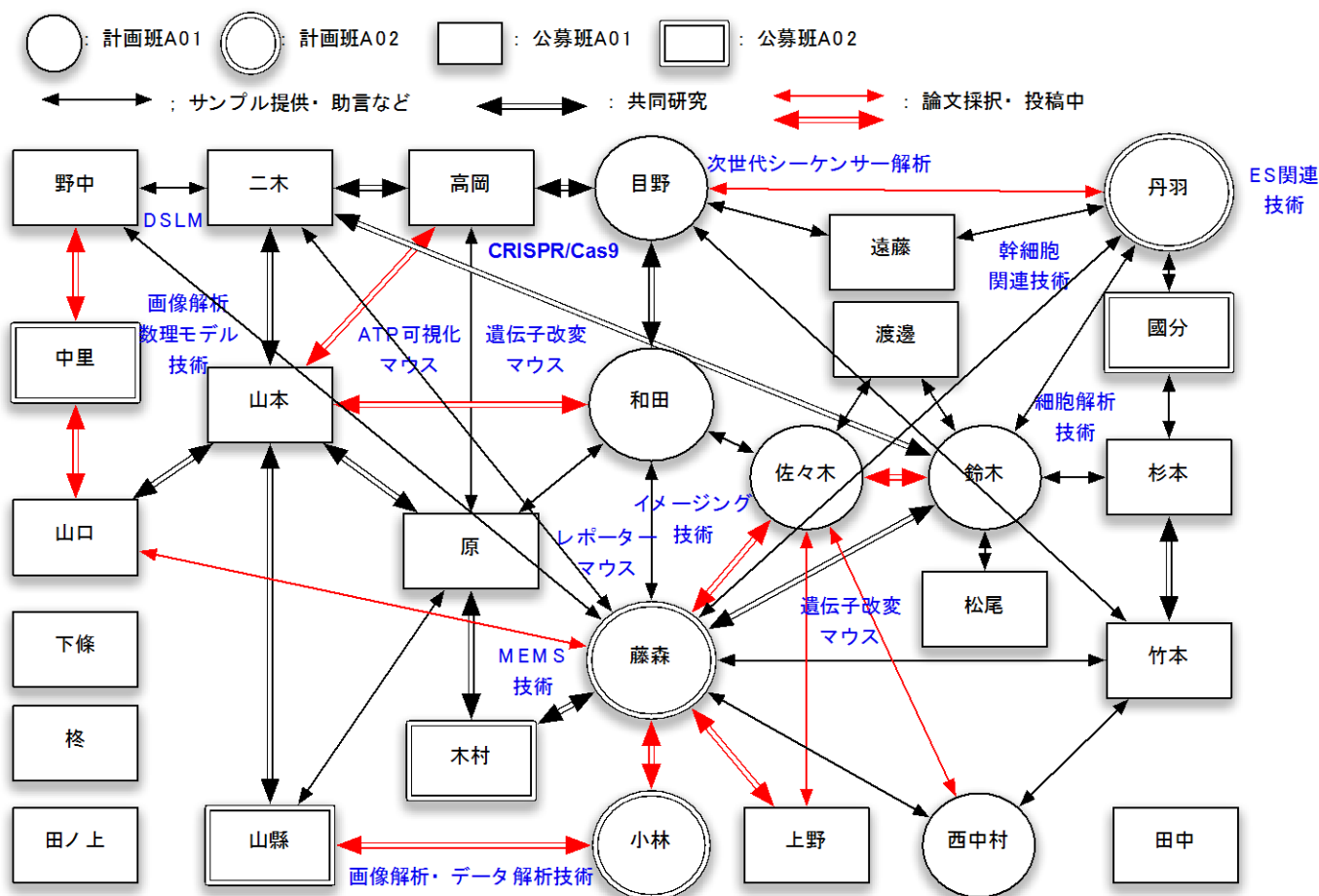
などをあげることが出来る。そしてこれらの個別の連携および技術交流以外にも、目野らの計画班による第一回技術講習会(2010/3/8~12)では、領域内のメンバーも複数参加をし、発生段階のマウス着床後胚の回収や、whole-mount in situ hybridization による遺伝子発現検出などの技術を共有している。さらに藤森班を中心として作製された細胞の様々な特徴を可視化する遺伝子組み換えレポーターマウスは、領域内の多くの班によって活用されている。また、本領域として 200 ページに及ぶ初期胚解析プロトコルを作製し、領域内外の初期胚研究に活用されている。

【連携に基づく代表的な共同研究成果】このような技術交流に基づく共同研究の幾つかは論文として取りまとめられた。

A01 計画班の佐々木班と鈴木班は「着床前胚の外側の細胞の上皮極性化、分化に際して PAR-aPKC システムが果たす役割」に関する共同研究を 4 年間（平成 22～25 年度）にわたって進め、成果を発表するに至った（Hirate *et al.* *Curr.Biol.* 2013）。この中で鈴木班は、PAR-aPKC 関連の実験ツールや遺伝子改変マウスを供給しその利用を技術的にサポートするとともに、実際の実験データの解釈等に関する議論を重ねた。また佐々木班は上野公募班の Prickle2 変異マウスの着床前胚における機能解析について、解析技術を指導し、成果につながっている（Tao *et al.* 2012, *Dev. Biol.*）。そして西中村は、佐々木計画班の作成したマウスを用い、初期胚後端部に位置する体軸幹細胞様の細胞集団が腎臓の起源であることを見だし、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から腎臓組織を試験管内で誘導することに成功した（Taguchi *et al.* *Cell Stem Cell*, 2014）。これは立案当初には予期しなかった成果であり、領域での共同研究が実を結んだものである。

一方 A02 計画班内の共同研究としては、藤森班からレポーターマウス（Abe *et al.* 2013 *Development*, 2011 *Genesis* など）の配布、小林班が藤森班から着床前胚の 4D イメージングデータの提供を得て、細胞核の自動同定のアルゴリズムの開発などを着手し、約 90%の精度で核を自動認識できるアルゴリズムを考案した（Bashar, *et al.*, 2012, *PloS One*）。さらに小林班は山縣公募班とも共同研究を行い、核の自動同定アルゴリズムの改良を行い 99%の精度を実現している（Bashar *et al.*, 2014, 投稿中）。また藤森班は A01 の佐々木班のサポートも行い、ライブイメージングの系を研究室内に立ち上げ（Imuta *et al.* 2013, *Genesis*）、さらに脊索の形態形成運動時の細胞運動を理解するために数理モデルによる力の解析、物理モデルの構築に協力した（Imuta *et al.* 2014, *Mech. Dev.*）。

これら以外にも、高岡班・山本班（Takaoka, *et al.*, 2011, *Nat. Cell Biol.*）、和田班・山本班（Aoyama, *et al.* 2012, *Dev. Cell*）など、公募班の間で共同研究が実現しており、未発表ではあるものの複数の共同研究が本領域内を土壌として萌芽し、現在も研究が進行中である。



3. 研究領域の設定目的の達成度（3 ページ程度）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか、また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らしての達成度合いについて、具体的に記載してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目毎の状況も記述してください。

本領域では、哺乳類初期発生における諸過程について細胞及び分子レベルの解析を行い、初期胚における細胞コミュニティを連続的・包括的に明らかにすることを目標とした。これを達成するために、初期発生解析に内在する技術的な問題点を克服すると共に、時空間的解析の方法論の投入によって次世代の発生生物学を開拓することを試みた。また、個々の細胞の集合体として初期胚を理解するには、さらなる細胞生物学的視点を導入することが不可欠であった。以下、項目別に設定目的と研究成果及び達成度合いを記載する。

（初期発生研究における技術革新）

・初期胚由来細胞株の活用

初期胚はごく限られた数の細胞から構成されているため、生化学的な解析が極めて困難である。これを解決する一手段として、初期胚細胞から得られる胚性幹細胞（ES 細胞）、エピブラスト幹細胞（EpiSC）、栄養膜幹細胞（TS 細胞）、胚体外内胚葉細胞（XEN 細胞）の活用が考えられる。これら細胞株の基本的な性質を明らかにすると共に、ES 細胞に発生プログラムを適用することで腎臓組織を試験管内で誘導することにも成功した。その概要は以下の通りである。

簡便なノックアウトベクター作製法を確立し、各種転写因子を欠失させた変異株の解析によって ES 細胞の多分化能・分化に関する知見を深化させた（計画研究分担・丹羽）。Vps52 は細胞間相互作用を介し、多能性幹細胞の分化制御に重要な役割を果たすことを明らかにした（公募研究・杉本）。ポリコム群変異胚由来の ES 細胞、TS 細胞、XEN 細胞を樹立し、それぞれの細胞におけるポリコム群の転写制御及び分化における機能を解析した（公募研究・遠藤）。ES 細胞のゲノム領域に沿った転写活性の出力変化を、ルシフェラーゼレポーターによってリアルタイムに可視化する系を開発した（公募研究・國府）。8.5 日胚の後端部に位置する T 陽性細胞集団に腎臓の前駆細胞があることを見だし、マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞から T 陽性細胞を経由して腎臓組織を試験管内で誘導することに成功した（計画研究分担・西中村）。初期胚エピブラストにおける発生プログラムの知見を応用し、EpiSC の樹立効率・維持を飛躍的に改善した（計画研究・目野）。

・着床前後の全胚培養法の確立

培養下に胚を発生させる全胚培養法は古くからの技術であるが、適用可能な胚のステージや培養可能時間は限られていた。以下の通り、初期胚培養技術を格段に発展させることに成功した。

従来の全胚培養では前後軸形成に必須の臓側内胚葉（DVE）の移動が生じないが、子宮内圧を模した PDMS マイクロデバイスによって正常発生が可能になった（公募研究・松尾）。着床にまたがる時期の培養法の開発に取り組み、胚盤胞から卵筒期に至る割合が 5 割に達した（計画研究・藤森）。

・マイクロデバイスの活用

マイクロ流体技術を応用した哺乳類受精卵アッセイシステムを開発した。受精卵周囲の微小空間の環境を精密に制御する手法を確立し、受精卵アッセイプラットフォームとして抗体スクリーニングをはじめとする広範囲の用途に適用可能であることが分かった（公募研究・木村）。

・エピゲノム解析の適用

エピゲノム解析を初期胚に適用するための方法論が開発された。

トランスポゾン転移追跡法によるゲノム高次構造の解析を試み、トランスポゾン挿入部位を網羅的に同定するための方法論を確立し、ES 細胞及びその分化系でトランスポゾン挿入分布を解析した（公募研究・國府）。ヒストンのリジン残基を標的とするクロマチン制御因子活性を可視化するために、各種 FRET プローブを作製し、試験管内で脱メチル化活性及びメチル化活性を定量できることが確認できた（公募研究・田中）。

（時空間的解析の方法論）

・蛍光タンパクレポーターマウスの開発

胚をタイムラプス観察するための様々なレポーターマウスを作製して、これを活用すると共に国内外の研究機関に分与することで広範囲の研究に貢献した。下記は、その一例である。

まず、各種細胞内小器官に局在する蛍光タンパクをユビキタスに発現するマウスを開発した。この蛍光マウスの用途は広く、既に国内 51 件のべ 107 系統、海外 59 件のべ 111 系統を配布した（計画研究・藤森）。代表的分化マーカー遺伝子（*Cdx2*, *Gata6*, *PDGFRA*, etc）のプロモーター下で蛍光タンパクを発現するマウスを作製した（計画研究・藤森）。マウス生体内の ATP を測定できる FRET レポーターマウスを開発し、代謝と形態形成の関係を明らかにした（公募研究・山本）。初期胚におけるエンドソームダイナミクスを可視化する蛍光タンパクレポーターマウスを作出した（計画研究分担・和田）。Notch シグナルを検出するルシフェラーゼレポーター

ターマウスを作出した（公募研究・下條）。

・初期発生イベントの経時観察方法の開発

神経管閉鎖における細胞動態の観察に成功した（公募研究・山口）。胚様体及びマウス胚組織培養における基底膜ライブイメージングが可能になった（公募研究・二木）。脊索細胞の動態観察のためのイメージング技術を確立した（計画研究・佐々木）。

・細胞動態のインシリコ再構成技術と数理モデルの構築

初期発生現象の画像データから新たな生物的・理論的知見を得るには3つの情報・理論的技術（4D画像解析・時空間動態のデータ解析・統合的数理モデル）が不可欠になる。複数の発生局面において細胞動態の画像・データ解析に成功し、そのノウハウを得た。

着床前胚の細胞動態を解析するために、多次元画像情報から細胞核を自動認識する画像解析アルゴリズムを開発し、その変化を時間軸に沿って算出することで発生速度を定量化するシステムを構築した（公募研究・山縣）。細胞核の自動同定に加えて細胞分裂や移動の細胞動態を追跡するアルゴリズム等を開発し、割球の分裂系譜と胚内の位置関係を解析することが可能になった。さらに、細胞膜形状の時間発展を自動同定するアルゴリズム、組織内で遊走する細胞を同定・追跡するアルゴリズム等を開発した。データ解析については細胞や小胞のランダムに見える運動から運動方向の偏りを検定する統計的手法、分裂する細胞の確率的遺伝子発現状態などをサンプル間で比較検定する手法、胚内の細胞など3D空間内での複数物体の配置を解析する統計物理的手法等を開発した。数理モデルについては、極性形成に関わる数理モデル、ゆらぐ外的シグナルに応じて相互作用しながら遊走をする細胞のモデル、確率性を持って状態変異と増殖する細胞集団の理論モデルの解析を行った（計画研究・小林）。着床後胚の原腸陥入及び神経管閉鎖過程の4次元立体画像データから細胞運動を抽出する画像解析技術を確立し、解析を行った（公募研究・中里）。並列処理アーキテクチャを活用した高速化に取り組み、バイオイメージからの定量データの取得の高速化に成功した（計画研究分担・舟橋）。

（細胞生物学的視点の導入）

・初期胚上皮組織の本質的理解

初期胚には様々な上皮組織が特定の時期と部位に出現し、その極性が制御されると共に細胞の位置や性質も動的に変遷して行く。細胞極性の根幹をなす分子機構は培養細胞で解析されており、その知見を深めると共に初期胚における細胞極性を解析した。細胞接着に関しては、下記「哺乳類初期発生の柔軟性」を参照。

PAR-aPKC システムの二つの出力素子 aPKC と PAR-1 が標的とする下流分子として KIBRA と新規微小管制御タンパク質 MTCL1 を同定し、これらの上皮極性制御に果たす役割を明らかにした。MTCL1 の欠損がゴルジ体高次集合構造の異常と細胞の集団的運動極性の異常を引き起こすことを明らかにし、aPKC 欠損 ES 細胞が細胞運動能低下に起因する凝集体形成を示すことを見出した（計画研究・鈴木）。PAR3 新規結合タンパク質を同定し、その機能を明らかにした（計画研究連携・廣瀬）。Lulu の細胞生物学的解析を行い、Lulu は p114RhoGEF を活性化することによって上皮細胞の周縁体のミオシン分子を活性化し、上皮細胞頂端部の細胞張力を亢進させることを明らかにした（公募研究・田ノ上）。初期発生における基底膜構成因子の変遷を明らかにした（公募研究・二木）。平面内細胞極性（PCP）関連シグナル分子 Prickle の機能解析を行い、マウス初期胚で PCP シグナルはエピブラストの頂底極性の形成を担うことを明らかにした（公募研究・上野）。

・初期胚におけるエンドサイトーシスの制御とその機能

エンドサイトーシス・リソソーム経路によって4~8細胞期に細胞膜タンパクの大規模な分解が生じ、これが卵割に必要であることを明らかにした。さらに、細胞膜タンパクの品質管理に関わる Rer1 が着床後胚の発生に必須の役割を果たすことを見出した（公募研究・原）。マウス初期胚の臓側内胚葉における rab7 と mVam2 に依存した膜輸送の実態を解明し、エンドソームが頂端液胞に取り込まれるのはマクロオートファジー様の機構によることを見出した。臓側内胚葉のエンドサイトーシス機能に欠損をもつ変異胚は細胞内シグナル伝達の制御が異常となり、原腸陥入期前後のパターン形成が乱れることを明らかにした。特に、mVam2 に依存した膜輸送経路は、BMP シグナルの時空間的制御に重要な役割を果たすことを見出した（計画研究分担・和田）。

（発生現象の本質的理解）

・哺乳類初期発生の柔軟性

哺乳類初期発生に特有の非決定論的分化の分子基盤を明らかにするため、初期胚の「接着情報」と「ゆらぎ」に着目した。受精卵は卵割とコンパクトの結果、割球の位置に応じた細胞間接着の違いが生ずるが、栄養外胚葉と内部細胞塊への細胞分化に Hippo シグナルを介した接着情報が必須の役割を果たすことを明らかにした。さらに、細胞間の接着と細胞極性の組み合わせによる Hippo シグナルの制御、接着結合が Hippo シグナルを活性化する機構を明らかにした（計画研究・佐々木）。マウス胚盤胞の内部細胞塊における2つの細胞系統（原始内胚葉とエピブラスト）の分化の分子学的かつ統計学的な解析をおこない、細胞系統特異的分化マーカー、

分化開始期にそれぞれの細胞系統に優位な分化マーカーを同定した。そのうちのひとつ FGF4 の変異胚の解析により、初期の遺伝子発現のゆらぎが細胞系譜分化に重要な役割を果たすというモデルを提唱した（公募研究・終）。着床前胚の摂動に対する影響及びその不均一性の生物学的な意義を理解するために、胚の発生速度に着目して、採卵時の卵巣刺激の有無や、培養中の酸素濃度が発生速度に与える影響について解析した（公募研究・山縣）。

・体軸形成の機構

哺乳類初期胚は、前後・背腹軸及び左右軸を自立的に形成し、これが発生の基盤となる。前後軸形成においては DVE 及び前方臓側内胚葉 (AVE) が重要な役割を果たすが、マウス胚 DVE の起源は少なくとも受精後 4 日まで遡ることができ、DVE は頭部誘導に働く AVE を前側に誘導する役割を果たすことを明らかにした（公募研究・高岡）。DVE は臓側内胚葉の一部が特殊化して形成されるだけでなく、子宮内膜圧による物理作用によって基底膜が遠位で破れ、ここからエピプラストが脱出し、遠位臓側内胚葉の細胞を構成することを明らかにした（公募研究・松尾）。左右軸は、ノードに生じる左向きの水流が起源であるが、その物理情報が如何に遺伝子発現に転換されていくかの理解は不十分である。新たに *Wnt3* がノード辺縁で左右非対称に発現することを見出し、その発現領域は Notch シグナルと *FoxA2* によって厳密に規定され、この組織における共通の遺伝子発現機構であることが示唆された。また、*inv* 変異マウスの解析から、ノードにおける *Nodal* と *Cer12* 発現の非対称性のバランスがその後の左右軸を決定するモデルを提唱した（計画研究・目野）。ポリコーン複合体の構成因子である MBLR の変異マウスを作製し、MBLR は胎盤形成及び前後軸の形成に関与することを明らかにした（公募研究・遠藤）。マウス初期胚の後方には体軸幹細胞が存在しており、この細胞は体幹部の神経上皮と沿軸中胚葉を持続供給することで体幹部を伸長させる。その運命決定は転写因子 *Sox2* と *Tbx6* が制御しており、*Tbx6* 変異胚では *Sox2* が異所発現する結果、沿軸中胚葉の代わりに神経管が余分に形成されることを明らかにした（公募研究・竹本）。

・細胞分化の制御機構

Nanog, *Gata6*, *Cdx2* などの着床前の分化制御因子の細胞間での挙動の違いをライブイメージングで明らかにし、緩やかに決まる細胞分化様式を解明した（計画研究・藤森）Notch シグナルの関連因子として知られていた *Sbno1* の変異マウスを解析し、*Sbno1* は栄養外胚葉分化・細胞の生存に関与するクロマチンリモデリング因子であることを見いだした（公募研究・渡邊）。半世紀以上前に発見された自然発症突然変異マウス *tw5* の解析から、多能性幹細胞が分化・増殖する時に重要な役割を果たす遺伝子 *Vps52* を同定し、*Vps52* はマウス初期胚エピプラストの増殖に必須の役割を果たすことを明らかにした（公募研究・杉本）。エピプラストは、各種シグナルに応答しながら、位置に応じた運命を辿ることになる。前方正中領域は神経外胚葉になるが、その周囲は表皮になる。Wnt シグナルの標的転写因子 *Grhl* がこの運命決定に重要な役割を果たすことが明らかになった。さらに、*Dkk1* と *Grhl* 欠損胚の解析から、Wnt シグナル抑制による前脳領域の形成は、*Grhl* による表皮化を抑制することで神経誘導を促進することが明らかになった（公募研究・松尾）。核内因子 *Sall4* を欠失する始原生殖細胞（7.5 日胚）では体細胞プログラムが脱抑制されること、これは *Sall4* が HDAC 複合体をリクルートして、*Prdm1* と共に体細胞プログラム遺伝子を抑制するためであることを解明した（計画研究分担・西中村）。

・細胞集団の統御機構

細胞集団からなる初期胚の発生を統御する機構の一つに分泌因子による制御がある。例えば、エピプラストで産生される FGF は、拡散して隣接した組織の胚体外外胚葉に FGF-ERK シグナルを入力する。*Ext2* は、プロテオグリカンコアタンパクにヘパラン硫酸鎖を重合する活性を担うが、*Ext2* 欠損変異胚ではヘパラン硫酸が付加されず FGF シグナル不全が生じることを見出した。さらに、細胞膜上に局在するヘパラン硫酸鎖が細胞非自律的な FGF シグナル伝達に関与することが明らかになり、FGF リガンドとヘパラン硫酸がコアタンパク質の複合体と共にセリンプロテアーゼで切断されることで、周辺細胞で FGF シグナルを活性化することが示唆された（公募研究・松尾）。胚後方の未分節中胚葉においては、Notch シグナルが組織内を協調的に振動することによって体節が形成される。細胞集団における動的な細胞間相互作用の意義を明らかにするため、Notch シグナル伝播のダイナミクスを単一細胞レベルで *in vitro/in vivo* において可視化し解析した。また、Notch シグナル伝達の動態を改変した遺伝子改変マウスを作製した（公募研究・下條）。マウス神経管閉鎖過程で生じる多数のアポトーシスの生体内動態を捉えることに成功した。これらの実験系を用いて、アポトーシス細胞の振る舞いが複数存在することを明らかにした。さらに、アポトーシスが形態形成の円滑な促進に働くこと、モルフォゲン産生細胞の除去に働いていることを明らかにした（公募研究・山口）。培養細胞において細胞形態が Hippo シグナルを制御すること、Tead 活性の異なる細胞が細胞競合を起こすことを明らかにした。着床後胚内で、Tead 活性を操作した胚をモザイク状に持つ細胞を作製するためのマウスを作製し、細胞間の接触によるコミュニケーションが細胞動態の制御に果たす役割を解析した。さらに、羊膜腔の膨張力が脊索の形態形成を制御することを見出した（計画研究・佐々木）。

4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1ページ程度）

研究推進時に問題が生じた場合には、その問題点とそれを解決するために講じた対応策等について具体的に記述してください。また、組織変更を行った場合は、変更による効果についても記述してください。

中間評価において、評価A（領域研究の設定目的に照らして、期待通りの進展が認められる）という評価をいただいた。一方で、評価コメントにおいて、広範な細胞生物学領域との緊密な連携、画像解析アルゴリズムなどの技術開発の活用をより一層注力するべきであるという助言があった。

これらの点に関しては、総括班においてもこれらの点をどのように改善するべきか工夫をこらす必要があるという認識を共有していた。その一つとして、領域全体で、この意識を共有することを目的として、領域班会議（2泊3日）の内、半日を使って本領域で目指す研究にどのように細胞生物学、画像解析・モデリングなどの数理的な手法を取り込むことができるかを議論する機会を設けた。領域外から、細胞生物学者、生物研究に数理的な手法を上手く取り込んでいる研究者を招聘し、班員に混ざって研究発表をお願いすると共に、領域内での議論に加わっていただいた。その議論を通して、実際の初期胚研究にどのようなニーズがあり、どのようにこれらの研究手法を持ち込み連携につなげるべきか考える機会となった。その後の領域研究において、細胞生物学的視点にたった研究や画像解析を用いて初期胚を考察する論文が発表された。また、未発表ではあるが、哺乳類初期胚の解析用マイクロデバイスの開発なども積極的にすすめられ、実用段階に至っている。

本領域では二回に渡って公募研究募集を行った。第二回目の公募研究募集の際に急遽科学研究費補助金のルール改訂により、採択率の上限が50%から35%に縮小された。本領域は、哺乳類初期発生というフォーカスされた研究領域であるため、応募件数が比較的少なく、重要と思われる公募研究も一部不採択となった。領域活動としての継続性を維持するとともに、更に領域研究を広げることを目的として、前半2年間公募研究で本領域に参加した研究者を班友として迎えるとともに、領域で活用するマイクロデバイス作製を担当する木村に関しては、藤森班に分担者として加えた。これらの研究者にも領域班会議にも継続して出席してもらい、研究の進捗状況を報告、相互に助言することによって、公募期間前半に準備を進めていた研究も成果へとつながっている。

5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1ページ程度）

研究領域内での若手研究者育成の取組及び参画した若手研究者の研究終了後の動向等を記述してください。

【若手研究者育成の取組】

本領域では研究代表者として若手研究者が多く研究に参画しており、領域会議は合宿形式をとることにより、若手研究者が年齢や研究内容を超えて自由に議論・交流する機会を作ってきた。また、総括班において、班員を含む若手研究者の自主的な研究集会の開催を積極的に支援した：建設的に考える会、Dev. Biol. Just Do It の会（2012年、2013年）、定量生物学の会年会（2009年—2013年の5回）。本領域内で研究を進める若手研究者の参加も多く、刺激をうける機会となった。

【参画研究者（研究代表者・研究分担者）の異動】

若手研究者を中心に、研究室主催者（PI）以外から新たにPIになったものが4名（内1名非公開）、PIからPIへの昇進・異動が2名、それ以外の昇任・異動が3名あった。

計画研究・小林：東京大学生産技術研究所にて講師から准教授へ（いずれもPI）（2011年10月）

公募研究・竹本：大阪大学生命機能研究科助教（非PI）から徳島大学藤井節郎記念医科学センター特任助教（PI）へ（2013年12月）

公募研究・木村：東京大学生産技術研究所特任助教（非PI）から東海大学工学部機械工学科講師（PI）へ（2012年4月）

公募研究・國府：大阪大学大学院医学系研究科特任講師から准教授へ（2013年1月）

公募研究・二木：大阪大学蛋白質研究所助教から大阪医科大学医学部解剖学教室助教へ（2014年4月）

公募研究・下條：京都大学ウイルス研究所研究員から京都大学 iCeMS 特定拠点助教へ（2013年4月）

以下2名は若手ではないが、研究期間中にPIのポジションを獲得した。

計画研究・佐々木：理研 CDB チームリーダーから熊本大学発生医学研究所教授へ（2010年9月）、さらに大阪大学生命機能研究科教授へ異動予定（2015年4月頃）（いずれもPI）

計画研究・鈴木：横浜市立大学生命医学部准教授（非PI）から医科学研究科准教授（PI）へ（2013年4月）

【表彰等】

公募研究・高岡：文部科学大臣表彰・若手科学者賞を受賞（2012年4月）

公募研究・竹本：文部科学大臣表彰・若手科学者賞を受賞（2013年4月）

公募研究・杉本：日本遺伝学会奨励賞（2013年9月）ならびに理化学研究所研究奨励賞（2014年4月）を受賞

公募研究・山口：JSTのさきがけ研究者に採択（2012年度から）

【連携研究者その他研究参画者の異動】

計画研究鈴木班・廣瀬智威：横浜市立大学医学部助教から講師へ（2014年4月）

計画研究小林班・Kd. Khayrul Bashar：東京大学生産技術研究所特任助教から御茶ノ水大学特任准教授（2014年4月）

公募研究松尾班・平松竜司：日本学術振興会特別研究員（SPD）から国立感染症研究所研究員（2013年1月）

計画研究藤森班・小松紘司：基生研研究員から、医療法人葵鐘会研究開発部課長へ（2011年4月）

計画研究佐々木班・平手義和：熊本大学発生医学研究所助教から東京医科歯科大学動物実験施設講師へ（2014年4月）

6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1 ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

各研究代表者は、責任を持ち適正な研究費の使用を行った。計画研究班では以下に示す高額の備品を購入した。胚操作の為のマイクロマニピュレータシステムは領域内で活用される遺伝子改変マウスの作製に用いられた。作製された遺伝子改変マウスは領域内外の研究者に提供されている。また、特に高額な光学顕微鏡類は、初期胚のダイナミズムを研究するのに欠くことのできないものとして研究期間の前半に特に集中的に計画班に設備し、総括班員が中心となって領域内での共同研究に活用した。ライブイメージング装置などで撮影された画像は、積極的に画像解析に用いられるように、総括班として共同研究を推進した。随時講習会などの機会を設け、初期胚の取り扱い、タイムラプス画像の取得、画像処理などの技術を広めるのに活用された。なお、総括班においては、公開シンポジウム（2011.1 福岡）、国際シンポジウム（2013.7 岡崎）を開催し、内外に研究成果発表を行うと共に、領域研究とその関連学問分野の将来像について議論した。

目野

- ・ 共焦点レーザー顕微鏡システム（ライカ・TCS-SP5）（平成 22 年度）
- ・ マイクロインジェクション用倒立顕微鏡（ニコン・Ti-U）（平成 23 年度）

佐々木

- ・ 倒立顕微鏡・マイクロマニピュレーションシステム（平成 21 年度）
- ・ ピエゾインパクトマニピュレーター、マイクロピペット作成装置（平成 22 年度）
- ・ 共焦点レーザー顕微鏡システム（ニコン・A1）（平成 23 年度）
- ・ マルチモードプレートリーダー（ベルトールド・LB941T）（平成 23 年度）
- ・ ライブイメージング用インキュベーター付き倒立顕微鏡システム（ツァイス・AxioobserverZ1.）（平成 25 年度）

鈴木

- ・ 共焦点スキャナ波長固体レーザー（横河・CSU10）（平成 21 年度）
- ・ 電動正立蛍光顕微鏡システム（ツァイス；平成 23 年度）

藤森

- ・ 共焦点顕微鏡（ニコン・A1）（平成 21 年度）
- ・ 培養装置一体型共焦点顕微鏡（横河・CV1000）（平成 22 年度）
- ・ ライトサイクラー（ロッシュ・480）（平成 22 年度）
- ・ マイクロマニピュレーションシステム（ライカ）（平成23年度）
- ・ スライドスキャナ（ライカ・SCN400）（平成24年度）

小林

- ・ 画像解析用計算機サーバーシステムおよび画像解析用 GPU サーバー（平成 21 年度）

7. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

本領域においては、新学術領域発足当初の科学研究費補助金のルールに則って、総括班に評価者はおいていない。領域班会議やシンポジウム等に講師として招聘した研究者に、班会議にも全日参加をお願いし、その都度評価・助言をお願いした。また、班会議で領域研究全般にわたる議論を行ったが、その議論にも参加いただいた。この評価方法については、中間評価においても「総括班に評価者を置いていないことで、定点観測的な外部の意見が入らないことを危惧する意見もあったが、若手研究者同士の自由闊達な議論を重視し、さらに必要に応じて外部意見を取り入れている領域代表の姿勢は評価できる」との評価であった。従って、ここに記載する評価コメントはない。

8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）[研究項目毎または計画研究毎に整理する]

（3ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、現在から順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

研究項目 A01: 哺乳類初期胚細胞コミュニティの基本メカニズム

計画研究

目野班 エピブラスト幹細胞の中内胚葉への分化傾向が、Wnt カノニカル経路を抑制するだけで、劇的に安定維持・樹立が可能になることを明らかにした (PLoS One 2013)。左右軸初期決定における分泌性シグナルの形成とその機能の解明に取り組み、長らく謎だった *inv* 変異の左右逆転の表現型はノードにおける *Cer12* 発現の逆転に由来するものであることを明らかにした。そして左右軸が *Nodal* と *Cer12* の発現のバランスで決定されるという新しいモデルを提唱した (PLoS One 2013, Development 2009)。さらに、*Wnt3* がノードで左右非対称に発現することを見出し、この発現を担うノードエンハンサーを同定することで、ノードにおける左右軸関連遺伝子に共通の転写制御機構を明らかにした (Dev. Biol. 2013, 2012)。また、原腸陥入期から左右軸形成にかけての原条領域 Fgf シグナルは、持続的な *Tbx6* 発現を促進しており、この発現が *Dll1* を介するノード *Nodal* 発現を誘導し、このカスケードによって Fgf 変異マウスの左右関連の表現型が説明出来ることを解明した (Dev. Dyn. 2010)。(分担研究者の和田) マウス初期胚の膜輸送の実態を詳細に解析し、臓側内胚葉のエンドサイトーシス機能に欠損をもつ変異胚は細胞内シグナル伝達の制御異常から、原腸陥入期前後のパターン形成が乱れること、特に *mVam2* に依存した膜輸送経路が BMP シグナルの時空間的制御に重要な役割を果たすことを見出した (Dev Cell. 2012、山本との共同研究)。臓側内胚葉のエンドサイトーシス経路はマイクロオートファジーとして知られるユニークな膜ダイナミクスを伴うことを見出し、マイクロオートファジーの欠損が原腸陥入期の形態形成に必須であることを見出した。(Nat. Communi. 2012)。

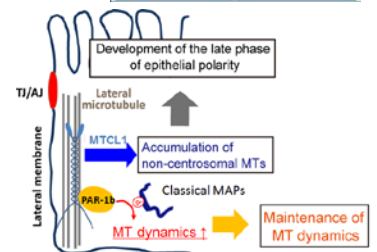
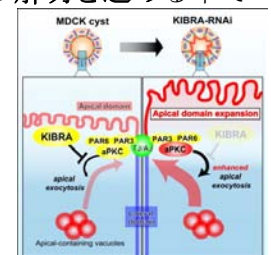
佐々木班 着床後胚の脊索の細胞動態の観察を可能にする系を確立した (Genesis 2013) 上で、脊索の収斂伸長時細胞の挙動は羊膜腔の膨張により脊索を前後に引っ張る力によって制御されることを示した (Mech. Dev. 2014: 藤森との共同研究)。着床前胚の細胞の分化制御には、内外の細胞における上皮細胞極性の有無とそれに依存した Hippo 経路の位置依存的な抑制が関わっていることを具体的に明らかとした (外側の細胞では、Par-aPKC システムによって Amot の接着結合への局在が阻害され、内側の細胞で見られる Lats との結合を介した Hippo 経路の活性化が抑制される) (Curr. Biol 2013: 鈴木との共同研究、PNAS 2012)。また、細胞が密度を感知して Hippo シグナルを制御するしくみとして、細胞の形態の変化による細胞骨格 F アクチン量の変化があることを明らかにした (Development 2011)。(分担研究者の西中村) 腎臓の細胞が胎生 8.5 日胚の体軸幹細胞由来であることを示し、多能性幹細胞から腎組織を試験管内で構築することに成功した (Cell Stem Cell 2014: 佐々木との共同研究)。

鈴木班 細胞生物学的観点で PAR-aPKC システムを介した上皮細胞極性制御の分子機構の解明を進める中で、Hippo 系の上流制御因子、KIBRA が、aPKC のキナーゼ活性を内在的に阻害するタンパク質としても働いていることを発見した。そして、KIBRA がこの活性を通じて、上皮細胞のアピカル膜ドメイン形成を適切な状態に維持していることを明らかとした (Curr. Biol. 2011) (右図)。一方、aPKC と相対して機能する PAR-1 キナーゼについては、新規の微小管制御タンパク質、MTCL1 を結合タンパク質として同定し、上皮極性の確立に必須な微小管の組織化にこれらのタンパク質が協同して決定的な役割を果たしていることを明らかとした (Sato et al. J. Cell Sci. 2013)。また、PAR-1 が微小管の動的状態を維持するキナーゼであることを始めて明らかとする (J. Neurosci. 2012) とともに、細胞外基質ラミニン受容体であるジストログリカン複合体に結合し、ユートロフィンをリン酸化することを介して細胞外へのラミニンの集積を inside out に制御していることを報告した (BBRC 2010、Genes Cells 2009)。

公募研究

(高岡) マウス胚における前後軸形成において、前後方向を決める細胞群 AVE の起源は少なくともマウス胚受精後 4 日であり、DVE は前後方向を決定する細胞群であり、遅れて生じる頭部誘導細胞群 AVE を前側へ誘導する役割を持っていることを明らかにし、新たな前後軸形成モデルを提唱した (Development 2012, Nat. Cell Biol. 2011)。

(上野) ショウジョウバエにおいて平面内細胞極性をなうシグナル分子として知られる Prickle のマウスホモログ (Prickle2) がマウス初期胚においてはアピカル-ベールサル極性を担う PAR-6 や aPKC の局在を制御すること、そしてその結果、細胞分化に影響することで着床前胚の正常な発達に関わっていることを明らかとした (Dev. Biol. 2012: 佐々木との共同研究)。



(田ノ上) 原腸陥入における上皮細胞の陥入の機構を明らかとすることを目的として、原腸陥入に必須であることが知られていた Lulu という FERM 分子を研究し、この分子が p114RhoGEF に結合し活性化することで上皮細胞の周縁体内のミオシンを活性化し、細胞頂端部のアクチオミオシンの収縮を引き起こすこと、そしてこの経路が aPKC によって負に制御されることを明らかとした (J.C.B. 2011, Small GTPases 2012)。

(杉本) 初期胚発生に異常を示す自然発症突然変異マウス *lps* の原因遺伝子産物が *Vps52* であることを発見し、この欠損マウス胚が原始外胚葉の著しい発育不全を示すこと、また、*Vps52* は細胞間相互作用を介し ES 細胞などの多能性幹細胞の分化制御にも重要な役割を果たしていることを明らかとした (2012 Cell Reports)。

(遠藤) ヒストン修飾に関わるポリコームタンパク質の各欠損 ES 細胞の表現系解析と標的遺伝子同定を進める中で、ポリコーム群 PRC1 複合体が、発生関連遺伝子の転写制御を通じた未分化性の維持に寄与しており、そのメカニズムとして標的クロマチンのヒストン H2A モノユビキチン化修飾が重要であることを明らかにした (PLoS Genet. 2012)。

(松尾) 着床直後胚をマイクロデバイスで作製した空洞内で培養し前後軸形成 (DVE の出現) 機構を解析した結果、縦方向の力学的な圧迫に依存した遠位側での基底膜の破断が、エピプラストの臓側内胚葉への侵入、DEV の構成に結びつくことを発見した。このことによって、分泌性シグナル経路など従来提唱されてきた細胞動態制御機構とは独立に、子宮内膜からの圧力がマウス初期胚の成長方向を規定し、力学的な機構で、前後軸が形成されることが強く示唆された (Dev. Cell 2013)。一方、ヘパラン硫酸鎖の合成欠損胚の胚体外外胚葉形成における表現系を単一細胞レベルで解析することにより、局所的なヘパラン硫酸鎖の発現とそれへの結合が標的細胞特異的な FGF の局在に必須であることを発見した。また、こうした FGF の遊離、活性化には、ヘパラン硫酸化コアタンパク質のプロテアーゼによる切断が必要であることから、初期胚における FGF 標的細胞の動態は、細胞非自律的な制御 (周辺細胞による制御) も受けていることを明らかとした (Dev. Cell 2011)。

(竹本) 脊椎動物の体幹部組織である神経板と体節中胚葉が共通前駆体である体軸幹細胞から産み出されていることを発見した。そして、体軸幹細胞が神経板細胞として発生するか、体節中胚葉として発生するかはそれぞれ転写因子 SOX2 と TBX6 によって制御されており両者のせめぎあいによって分化方向が規定されるという機構を明らかにした (Congenit Anom 2013, Curr. Opin. Genet. Dev. 2012, Nature 2011)。

(柘) 確率的、不均一的に進むマウス着床前胚細胞の分化過程に法則性を見出すために、内部細胞塊内の個々の細胞の遺伝子発現プロファイルを定量的、統計学的に解析し、細胞系統特異的に発現する分化マーカー、分化開始期にそれぞれの細胞系統に優位に発現をおこなう最初期の分化マーカーを同定した。さらにそのうちのひとつ、FGF4 の変異マウスを解析することにより、初期の遺伝子発現のゆらぎが細胞系譜分化に重要な役割を果たすというモデルを提唱した (Nat. Cell Biol 2014)。

(山口) マウス初期胚の神経管閉鎖過程で生じる多数のアポトーシスの生体内動態をライブイメージングによって詳細に解析することに成功し、この過程におけるアポトーシス細胞の振る舞いが複数存在し、モルフォゲン産生細胞の除去などを通じて、これらのアポトーシス過程が形態形成の円滑な促進に働くことを明らかとした (Dev Cell 2013, J Cell Biol, 2011; 公募班員、中里との共同研究)。

(原) 初期胚発生過程における細胞膜タンパク質の動態観察を行い、エンドサイトーシス・リソソーム経路を介した大規模な分解が 4~8 細胞期に起こることを発見した。また、機能阻害実験から、こうした活性が 4~8 細胞期移行の胚発生の進行に不可欠であることを明らかにした (Sci. Rep. 2014, J. Reprod. Dev. 2013)。

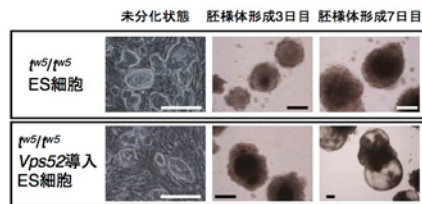
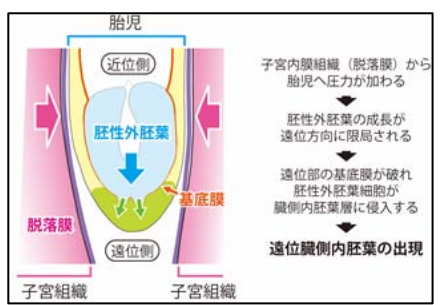
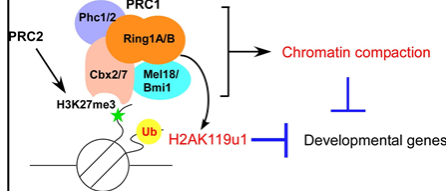
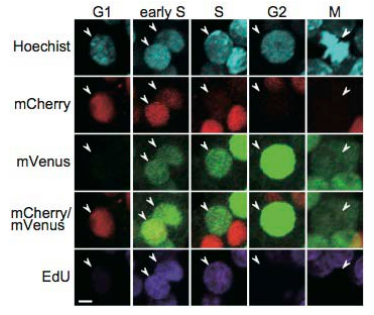


図2. ES細胞の分化にはVps52が不可欠である



研究項目 A02: 哺乳類初期胚細胞コミュニティを理解するための新規解析法
計画研究

藤森班 細胞周期を可視化する Fucci 技術を発展させ、一般的な研究者が使いやすいレポーターマウスを作製、公開した。また、初期胚に本マウスを適用した (Development 2013)。ほ乳類初期胚を培養しながらライブイメージングする方法を確立した (Dev. Growth Differ. 2013, Methods. Mol. Biol. 2013)。それを応用して核の自動追跡アルゴリズム開発に適した画像取得を行った (Plos One 2012, 小林との共同研究)。ライブイメージングに用いる為の細胞の様々なオルガネラを蛍光標識した一連のマウスを作製し、共同研究に供した (Genesis 2011, 2011)。着床前胚の発生の場となる卵管における繊毛の活動を解析し、性周期に関係無く常に輸送可能であることを明らかにした (Genes to Cells, 2011)。(分担研究者、丹羽) 簡便に誘導型ノックアウト ES 細胞を作成するための



ベクターを構築する方法、および改変アレルのホモ接合型 ES 細胞作成方法を開発し (BRC Biotechnol 2013)、ES 細胞の分化に関わると報告されているいくつかの転写因子について、機能的な再検証を行った (FEBS Lett. 2014, Sci. Rep. 2013)。また、転写因子 Klf2, Klf4, Klf5, Tbx3 についてその組み合わせを網羅する 15 種類の誘導型ノックアウト ES 細胞を作成し、Tbx3 については、共同研究を通じて成果を発表した (Cell Stem Cell 2014)。他方、転写因子のホルモン依存的活性化によって雄 ES 細胞を用いて初期胚内部細胞塊の多能性幹細胞において、X 染色体の選択的不活化に必要な X 染色体上のエピジェネティックマークがすでに消失している可能性を示唆した (Development 2011)。

小林班 哺乳類着床前胚の 4D バイオイメージングデータに対し、その核の動態を 99%の精度で自動同定し、1%のエラーを補正する GUI (グラフィカル・ユーザー・インターフェース) を構築した。それらを用いて細胞系譜を複数の胚で *in silico* 再構成することに成功し、得られた系譜の解析から分裂の時間が割球毎に世代をわたり継承されている傾向を見つけ出した (PLoS One 2012; 藤森との共同研究)。また、細胞膜形状の時間発展、組織内で遊走する細胞を同定・追跡するアルゴリズムを開発した (PLoS Biol. 2013, Developmental Cell 2010)。タンパク質のアミノ酸など 3D 空間内での複数物体の配置を解析する統計物理的手法などを開発した (Front. Physiol. 2012, 舟橋との共同研究)。

公募研究

(山縣) 発生過程で与えられる種々の摂動を緩衝しながら発生を進める哺乳類着床前胚の頑強性、不均一性の基盤・生物学的な意義を理解することを目指し、着床前胚の発生速度を自動的に定量化しうる系を独自に開発してきた初期胚ライブセルイメージング技術の上に構築し、酸素やホルモンなどといった摂動の影響の解析を進めた (Dev. Growth Differ. 2013, Cell Cycle 2013)。

(中里) マウス着床後胚 (6.5 日胚) の細胞運動を撮影した 4 次元画像データを元に、手動・自動で細胞を追跡するソフトウェアを開発して公開するとともに、統計的な解析から、このステージで見られる細胞核のエレベーター運動が受動的ではないこと、また、中胚葉形成における細胞運動はシート状ではなくランダム様の運動をすることを明らかにした (Nature Protocols 2014, PLoS One 2013)。

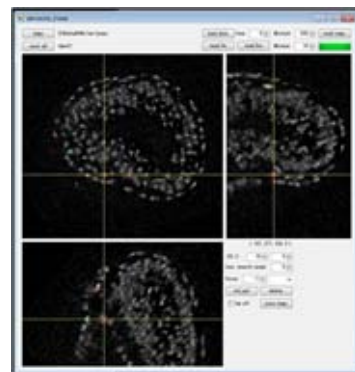
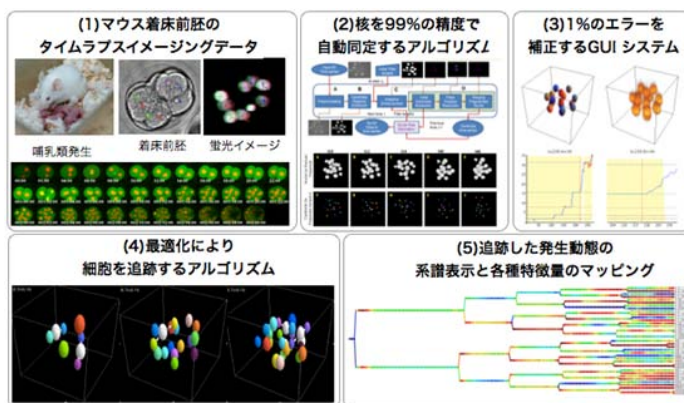
(国府) トランスポゾン挿入部位を網羅的に同定することを通じて ES 細胞の 3 次元ゲノム構造を解析する方法論の確立をめざし、いくつかの基盤的検討に関する結果を報告した (Gen. Res. 2013, STEM CELLS Translational Medicine 2014)。

(木村) 哺乳類胚の培養操作やアッセイ操作の自動化を実現するために、各々の胚を個別に管理できるマイクロ流体デバイスの開発を行った。マウス iPS 細胞胚様体の分化動態をタイムラプス観察することで、液性因子制御による胚様体の物質曝露制御が実現可能であることが示唆され (J. Robo. Mech. 2013, Lab on a Chip 2012)、下記 2 件の特許を申請した (出願番号特願 2011-215851、出願番号特願 2010-224131)。

(山本) 受精から形態形成期に起こる各現象と照らし合わせて細胞内 ATP 濃度と細胞分化・移動の関係を明らかにするために、マウス生体内で ATP の分布や変動を測定できるシステムを構築した (出願番号特願 2014-005429)。

(下條) 細胞集団における Notch シグナル伝達ダイナミクスの伝達を単一細胞レベルで可視化し、細胞集団において刻々と変化する隣接細胞間の関係のモニターを行った (Cell Mol Life Sci 2012)。

本領域の研究成果を含み、領域で取り組んでいる研究 (Mammalian Stem Cells)、技術開発 (Bioimaging in Developmental Biology) に関して英文雑誌に特集号を編纂した (藤森、丹羽) Dev Growth Differ. 2010, 2013)。



9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、現在から順に発表年次をさかのぼり、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

1) 主な論文

計画研究（査読論文 104 報のうち、主な物をリストした）

- Hirate, Y., *Sasaki, H. (2014). The role of angiotensin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development. *Tissue Barriers*, 2, e28127.
- Imuta, Y., Koyama, H., Shi, D., Eiraku, M., Fujimori, T., *Sasaki, H. (2014). Mechanical control of notochord morphogenesis by extra-embryonic tissues in mouse embryos. *Mech Dev* 132, 44-58.
- Taguchi, A., Kaku, Y., Ohmori, T., Sharmin, S., Ogawa, M., Sasaki, H., and *Nishinakamura, R. (2014) Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14: 53-67
- *Wada, Y., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., and Aoyama, M. (2014). Role of autophagy in embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 27C, 60-66.
- Ito, S., Yamane, M., Ohtsuka, S. and *Niwa, H. (2014) The C-terminal region of Xpc is dispensable for the transcriptional activity of Oct3/4 in mouse embryonic stem cells. *FEBS Letters*, 588, 1128-1135.
- Kitajima, K., Oki, S., Ohkawa, Y., Sumi, T., and *Meno, C. (2013). Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. *Dev Biol* 380, 222-232
- Sumi, T., Oki, S., Kitajima, K., and *Meno, C. (2013). Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/ β -catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. *PLoS One* 8, e63378
- Takasuga, S., Horie, Y., Sasaki, J., Sun-Wada, G.H., Kawamura, N., Iizuka, R., Mizuno, K., Eguchi, S., Kofuji, S., Kimura, H., Yamazaki, M., Horie, C., Odanaga, E., Sato, Y., Chida, S., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., Wada, Y., Ohnishi, H., and *Sasaki, T. (2013). Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 1726-1731.
- *Wada, Y. (2013). Vacuoles in mammals: A subcellular structure indispensable for early embryogenesis. *BioArchitecture* 3, 13-19.
- *Wada, Y. and Sun-Wada, G.-H. (2013). Positive and negative regulation of developmental signaling by the endocytic pathway. *Curr Opin Genet Dev* 23, 391-398.
- *Wada, Y. Sun-Wada, G.H., and Kawamura, N. (2013). Microautophagy in the visceral endoderm is essential for mouse early development. *Autophagy* 9, 252-254.
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K.-i., Suzuki, A., Alarcon, V.B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, S., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A., *Sasaki, H. (2013). Polarity-dependent distribution of angiotensin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol* 23, 1181-1194.
- Imuta, Y., Kiyonari, H., Jang, C.W., Behringer, R.R., *Sasaki, H. (2013). Generation of knock-in mice that express nuclear EGFP and tamoxifen-inducible Cre recombinase in the notochord from *Foxa2* and *T* loci. *Genesis*. 51, 210-218.
- Sato Y, Akitsu M, Amano Y, Yamashita K, Ide M, Shimada K, Yamashita A, Hirano H, Arakawa N, Maki T, Hayashi I, Ohno S, *Suzuki A (2013). A novel PAR-1-binding protein, MTCL1, plays critical roles in organizing microtubules in polarizing epithelial cells. *J Cell Sci*. 126, 4671-4683
- Shi, D., Fujimori, T., and *Uemura, T. (2013). Atypical cadherin negotiates a turn. *Dev Cell* 26, 1-2.
- Abe, T., Sakaue-Sawano, A., Kiyonari, H., Shioi, G., Inoue, K., Horiuchi, T., Nakao, K., Miyawaki, A., *Aizawa, S., and Fujimori, T. (2013). Visualization of cell cycle in mouse embryos with Fucci2 reporter directed by Rosa26 promoter. *Development* 140, 237-246.
- Abe, T., and *Fujimori, T. (2013). Reporter mouse lines for fluorescence imaging. *Dev Growth Differ*. 55, 390-405.
- Abe, T., Aizawa, S., and *Fujimori, T. (2013). Live imaging of early mouse embryos using fluorescently labeled transgenic mice. *Methods in molecular biology* 1052, 101-108.
- Shigeta, M., Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S., Yamane, M., Fujii, S. (2013) Murakami, K. and *Niwa, H. Maintenance of pluripotency in mouse ES cells without Trp53. *Sci Rep*, 3: 2944
- Adachi, K., Nikaido, I., Ohta, H., Ohtsuka, S., Ura, H., kadota, M., Wakayama, T., Ueda, H.R. and *Niwa, H. (2013) Context-dependent wiring of Sox2 regulatory networks for self-renewal of embryonic and trophoblast stem cells. *Mol Cell*, 52, 380-392.
- Nakatake, Y., Fujii, S., Masui, S., Sugimoto, T., Torikai-Nishikawa, S., Adachi, K. and *Niwa, H. (2013) Kinetics of drug selection systems in mouse embryonic stem cells. *BMC Biotechnol*, 13, 64.

- Noda, T., Oki, S., Kitajima, K., Harada, T., Komune, S., and *Meno, C. (2012). Restriction of Wnt signaling in the dorsal otocyst determines semicircular canal formation in the mouse embryo. *Dev Biol* 362, 83–93.
- Aoyama, M., Sun-Wada, G.-H., Yamamoto, A., Yamamoto, M., Hamada, H., and *Wada, Y. (2012). Spatial restriction of bone morphogenetic protein signaling in mouse gastrula through the mVam2-dependent endocytic pathway. *Dev Cell* 22, 1163-1175.
- Kawamura, N., Sun-Wada, G.-H., Aoyama, M., Harada, A., Takasuga, S., Sasaki, T., and *Wada, Y. (2012). Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. *Nat Commun* 3, 1071.
- Hirate, Y., Cockburn, K., Rossant, J., *Sasaki, H. (2012). Tead4 is constitutively nuclear, while nuclear vs. cytoplasmic Yap distribution is regulated in preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E3389-90.
- Yoshida, S., Shiratori, H., Kuo, I.Y., Kawasumi, A., Shinohara, K., Nonaka, S., Asai, Y., Sasaki, G., Belo, J.A., Sasaki, H., Nakai, J., Dworniczak, B., Ehrlich, B.E., Pennekamp, P., *Hamada, H. (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. *Science* 338, 226-231.
- Tao, H., Inoue, K.I., Kiyonari, H., Bassuk, A.G., Axelros, J.D., Sasaki, H., Aizawa, S., *Ueno, N. (2012). Nuclear localization of Prickle2 is required to establish cell polarity during early mouse embryogenesis. *Dev Biol* 364, 138-148.
- Hayashi K, *Suzuki A, Ohno S. PAR-1/MARK: a kinase essential for maintaining the dynamic state of microtubules (2012). *Cell Struct Funct.* 37, 21-25
- *Bashar, M.K., Komatsu, K., Fujimori, T., and Kobayashi, T.J. (2012). Automatic extraction of nuclei centroids of mouse embryonic cells from fluorescence microscopy images. *PLoS One* 7, e35550.
- Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S. and *Niwa, H (2012) E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS One*, 7, e45220.
- *Kamimura, A., Kobayashi, T.J. (2012). Information processing and integration with intracellular kinetics near critical point. *Frontiers in Physiology* 3, 203
- *Hiroi, N., Okuhara, T., Kubojima, T., Iba, K., Tabira, A., Yamashita, S., Okada, Y., Kobayashi, T.J., Funahashi, A. (2012) Physiological intracellular crowdedness is defined by perimeter to area ratio of subcellular compartments. *Frontiers in Physiology* 3, 293.
- Murakami, K., Araki, K., Ohtsuka, S., Wakayama, T. and *Niwa, H. (2012) Choice of random rather than imprinted X inactivation in female ES cell-derived extra-embryonic cells. *Development* 138, 197-202,
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., *Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 138, 3907-3914.
- Hayashi K, *Suzuki A, Ohno S. A novel function of the cell polarity-regulating kinase PAR-1/MARK in dendritic spines (2011). *BioArchitecture* 1, 261-266, 2011.
- Hayashi K, *Suzuki A, Hirai S, Kurihara Y, Hoogenraad CC, Ohno S. Maintenance of dendritic spine morphology by partitioning-defective 1b through regulation of microtubule growth (2011). *J Neurosci.* 31, 12094-12103.
- Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, Hakuno F, Takahashi S, Ohno S, *Chida K. KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells (2011). *Curr Biol* 21, 705-711
- Shi, D., Komatsu, K., Uemura, T., and *Fujimori, T.. (2011). Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes to cells* 16, 282-290.
- Abe, T., Kiyonari, H., Shioi, G., Inoue, K., Nakao, K., *Aizawa, S., and Fujimori, T.. (2011). Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging. *Genesis* 49, 579-590.
- Hiroi N, Lu J, Iba K, Tabira A, Yamashita S, Okada Y, Flamm C, Oka K, Köhler G, Funahashi A, (2011), Physiological Environment Induces Quick Response–Slow Exhaustion Reactions, *Frontiers in Physiology*, 2
- *Sasaki, H.. (2010). Mechanisms of trophectoderm fate specification in preimplantation mouse development. *Dev Growth Differ* 52, 263-273
- Oki, S., Kitajima, K., and *Meno, C. (2010). Dissecting the role of Fgf signaling during gastrulation and left-right axis formation in mouse embryos using chemical inhibitors. *Developmental Dynamics* 239, 1768–1778.
- Hashimoto, M., Shinohara, K., Wang, J., Ikeuchi, S., Yoshida, S., Meno, C., Nonaka, S., Takada, S., Hatta, K., Wynshaw-Boris, A., and *Hamada, H. (2010). Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia. *Nat Cell Biol.* 12, 170–176.
- *Fujimori, T.. (2010). Preimplantation development of mouse: a view from cellular behavior. *Dev Growth Differ.* 52, 253-262.
- †Cong, W., †Hirose, T., Harita, Y., Yamashita, A., Mizuno, K., Hirano, H., and *Ohno, S. (†同等貢献). (2010). ASPP2 Regulates Epithelial Cell Polarity through the PAR Complex. *Curr Biol.* 20, 1408-1414.
- Oki, S., Kitajima, K., Marques, S., Belo, J.A., Yokoyama, T., Hamada, H., and *Meno, C. (2009). Reversal of left-right asymmetry induced by aberrant Nodal signaling in the node of mouse embryos. *Development*

- Sun-Wada, G.H., Tabata, H., Kawamura, N., Aoyama, M., and *Wada, Y. (2009). Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci* 122, 2504-2513.
- Mori D, Yamada M, Mimori-Kiyosue Y, Shirai Y, Suzuki A, Ohno S, Saya H, Wynshaw-Boris A, *Hirotsune S. An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway on neurite elongation by modulation of microtubule dynamics (2009). *Nat Cell Biol.* 11, 1057-1068
- Horikoshi Y, Suzuki A, Yamanaka T, Sasaki K, Mizuno K, Sawada H, Yonemura S, *Ohno S (2009). Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J Cell Sci.* 122, 1595-1606
- *Fujimori, T., Kurotaki, Y., Komatsu, K., and Nabeshima, Y. (2009). Morphological organization of the mouse preimplantation embryo. *Reproductive Sciences* 16, 171-177.
- *Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. and Adachi, K. (2009) A parallel circuit of LIF signaling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460, 118-122.
- 公募研究 (査読論文 57 報のうち、主な物をリストした)
- Ueda, J., Maehara, K., Mashiko, D., Ichinose, T., Yao, T., Hori, M., Sato, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., and *Yamagata, K. (2014) Heterochromatin dynamics during differentiation process revealed by the DNA methylation reporter mouse, MethylRO. *Stem Cell Rep.* (in press).
- *Igawa, K., Kokubu, C., Yusa, K., Horie, K., Yoshimura, Y., Yamauchi, K., Suemori, H., Yokozeki, H., Toyoda, M., Kiyokawa, N., Okita, H., Miyagawa, Y., Akutsu, H., Umezawa, A., Katayama, I. and *Takeda, J. (2014). Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *STEM CELLS Translational Medicine* (in press).
- Ohnishi, Y., Huber, W., Tsumura, A., Kang, M., Xenopoulos, P., Kurimoto, K., Oleś, A. K., Araúzo-Bravo, M. J., Saitou, M., Hadjantonakis, A.-K. and *Hiiragi, T. (2014). Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. *Nat Cell Biol.* 16, 27–37
- Yoshida, M., Uchikawa, M., Rizzoti, K., Lovel-Badge, R., Takemoto, T., and Kondoh, H. (2014). Regulation of mesodermal precursor production by low-level expression of B1 Sox genes in the caudal lateral epiblast. *Mech Dev.* 132, 59-68
- Ichikawa, T., Nakazato, K., Keller, P. J., Kajiura-Kobayashi, H., Stelzer, E. H. K., Mochizuki, A., and *Nonaka, S. (2014). Live imaging and quantitative analysis of gastrulation in mouse embryos using light-sheet microscopy and 3D tracking tools. *Nature Protocols* 9, 575-585
- Kokubu, C., and *Takeda, J. (2014). When Half Is Better Than the Whole: Advances in Haploid Embryonic Stem Cell Technology. *Cell Stem Cell* 14, 265-267
- *Tsukamoto, S., Hara, T., Yamamoto A, Kito S, Minami N, Kubota T, Sato K, Kokubo T. (2014). Fluorescence-based visualization of autophagic activity predicts mouse embryo viability. *Sci Rep.* 4
- *Tsukamoto, S., Hara, T., Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato K, Kokubo T. (2013). Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development. *J Reprod Dev.* 59
- Nonomura, K., *Yamaguchi, Y., Hamachi, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Nakazato, K., Mochizuki, A., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Yoshida, H., Kuida, K., *Miura, M. (2013) Local Apoptosis Modulates Early Mammalian Brain Development through the Elimination of Morphogen-Producing Cells. *Dev Cell* 27, 621-634
- *Yamaguchi, Y., *Miura, M. (2013). How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cell Mol Life Sci*, 70, 3171-3186
- Hiramatsu, R., Matsuoka, T., Kimura-Yoshida, C., Han, S.-W. Mochida, K. Adachi, T., Takayama, S., and *Matsuo, I. (2013). External mechanical cues trigger the establishment of the anterior-posterior axis in early mouse embryos. *Dev Cell* 27, 131-144
- *Matsuo, I. and Kimura-Yoshida, C. (2013). Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* 23, 399-407
- Takemoto, T. (2013) The mechanism of cell fate choice between neural and mesodermal development during early embryogenesis. *Congenit Anom.* 53, 61–66
- Ichikawa, T., Nakazato, K., Keller, P. J., Kajiura-Kobayashi, H., Stelzer, E. H. K., Mochizuki, A., and *Nonaka, S. (2013). Live Imaging of Whole Mouse Embryos during Gastrulation: Migration Analyses of Epiblast and Mesodermal Cells. *PLoS One* 8, e64506
- *Terashita, Y., Yamagata, K., Tokoro, M., Itoi, F., Wakayama, S., Li, C., Sato, E., Tanemura, K., *Wakayama, T. (2013) Latrunculin A treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One* 8, e78380.
- Sato, Y., Mukai, M., Ueda, J., Muraki, M., Stasevich, T.J., Horikoshi, N., Kujirai, T., Kita, H., Kimura, T., Hira, S., Okada, Y., Hayashi-Takanaka, Y., Obuse, C., Kurumizaka, H., Kawahara, A., Yamagata, K., Nozaki, N., *Kimura, H. (2013) Genetically encoded system to track histone modification in vivo. *Sci Rep.* 3, 2436.

- *Yamagata, K., Ueda, J. (2013) Long-term live-cell imaging of mammalian preimplantation development and derivation process of pluripotent stem cells from the embryos. *Dev Growth Differ.*, 55, 378-89.
- Shimozawa, T., Yamagata, K., Kondo, T., Hayashi, S., Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., Takayama, J., Onami, S., Nakayama, H., Kosugi, Y., Watanabe, TM., Fujita, K., *Mimori-Kiyosue, Y. (2013) Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110, 3399-404.
- Yamagata, K., *FitzHarris, G. (2013) 4D imaging reveals a shift in chromosome segregation dynamics during mouse pre-implantation development. *Cell Cycle*, 12, 157-65.
- He, X., Kimura, H., and Fujii, T. (2013). A high-throughput device for patterned differentiation of embryoid bodies. *Journal of Robotics and Mechatronics* 25, 623-630
- Nonomura, K., *Yamaguchi, Y., Hamachi, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Nakazato, K., Mochizuki, A., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Yoshida, H., Kuida, K., and *Miura, M. (2013). Local Apoptosis Modulates Early Mammalian Brain Development through the Elimination of Morphogen-Producing Cells. *Dev Cell* 27, 621-634
- *Imayoshi, I., Shimojo, H., Sakamoto, M., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2012). Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70, 2045-57.
- Nakajima, H., and *Tanoue, T. (2012). The circumferential actomyosin belt is regulated by the Lulu2-p114RhoGEF system. *Small GTPases*. 3, 1-6.
- Endoh, M., Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE and Koseki H (2012) Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1 dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet.* 8, e1002774
- *Takaoka, K., and *Hamada H. (2012) Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development* 139(1) 3-14
- Iwafuchi-Doi, M. Matsuda, K., Murakami, K., Niwa, H., Tesar, P. J., Aruga, J., Matsuo, I., and *Kondoh, H. Transcriptional regulatory networks in epiblast cells and during anterior neural plate development as modeled in epiblast stem cells. *Development* 139, 3926-3937 (2012)
- Kondoh, H., and Takemoto, T. (2012) Axial stem cells deriving both posterior neural and mesodermal tissues during gastrulation. *Curr Opin Genet Dev.* 22, 1-7
- Sugimoto, M., Kondo M., Hirose M., Suzuki M., Mekada K., Abe T., Kiyonari H., Ogura A., Takagi N., Artzt K. and *Abe K. (2012). Molecular identification of *tw5*: *Vps52* promotes pluripotential cell differentiation through cell-cell interactions. *Cell Rep.* 2(5), 1363-1374
- Watanabe, Y., Zaffran, S., Kuroiwa, A., Higuchi, H., Ogura, T., Harvey, RP., Kelly, RG., and *Buckingham M. (2012). *Fgf10* regulation in the second heart field by *Tbx1*, *Nkx2-5* and *Islet1* reveals a genetic switch for down-regulation of transcription in the myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(45):18273-80.
- Kawada, J., Kimura, H., Akutsu, H., Sakai, Y., and Fujii, T. (2012). Spatiotemporally controlled delivery of soluble factors for stem cell differentiation. *Lab on a Chip* 12, 4508-4515
- Chowdhury, M.M., Kimura, H., Fujii, T., and Sakai, Y. (2012). Induction of alternative fate other than default neuronal fate of embryonic stem cells in a membrane-based two-chambered microreactor by cell-secreted BMP4. *Biomicrofluidics* 6, 014117
- Tao, H., Inoue, K., Kiyonari, H., Bassuk, A.G., Axelrod, J.D., Sasaki, H., Aizawa, S. and Ueno, N. (2012) Nuclear localization of Prickle2 is required to establish cell polarity during early mouse embryogenesis. *Dev Biol* 364, 138-148
- *Takaoka, K., Yamamoto, M., and *Hamada H. (2011) Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo. *Nat Cell Biol.* 13(7) 743-52
- *Yamaguchi, Y., Shinotsuka, N., Nonomura, K., Takemoto, K., Kuida, K., Yoshida, H., and *Miura, M. (2011). Live imaging of apoptosis in a novel transgenic mouse highlights its role in neural tube closure. *J Cell Biol.* 195, 1047-1060
- Shimokawa, K., Kimura-Yoshida, C., Nagai, N., Mukai, K., Matsubara, K., Watanabe, H., Matsuda, Y., Mochida, K., and *Matsuo, I. (2011). Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo. *Dev Cell* 21, 257-272
- Takemoto, T., Uchikawa, M., Yoshida, M., Bell, DM., Lovell-Badge, R., Papaioannou, VE., and Kondoh, H. (2011) *Tbx6*-dependent *Sox2* regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature.* 470, 394-398
- Nakajima, H., and *Tanoue, T. (2011). Lulu2 regulates the circumferential actomyosin tensile system in epithelial cells through p114RhoGEF. *J Cell Biol.* 195, 245-261
- Inoue K., Kohda T., Sugimoto, M., Sado T., Ogonuki N., Matoba S., Shiura H., Ikeda R., Mochida K., Fujii T., Sawai K., Otte A.P., Tian C., Yang X., Ishino F., Abe K. and *Ogura A. (2010). Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 330, 496-499
- Horie, K., Kokubu, C., and *Takeda, J. (2010) Functional genomics in the mouse using the Sleeping Beauty transposon system. *Methods in Enzymology* 477, 71-89

2) 書籍 (27 報のうち主なものをリストした)

- Sasaki, H. “Position-dependent Hippo signaling controls cell fates in preimplantation mouse embryos” (2014) Kondoh, H., Kuroiwa, A. (eds.) *New Principles in Developmental Processes*, Springer
- Suzuki, A. “PAR-1 kinase and Cell Polarity” (2014) Ebnet, K. (ed.) *Cell Polarity: Biological Role and Basic Mechanisms*, Springer (in press)
- 藤森俊彦, iPS 細胞を発生生物学ではどう捉えるかー発生生物学の常識と非常識 (2013) 科学 Vol.83 No1, 岩波書店 pp.73-78
- 小林徹也 定量データが切り開く生命科学 (2013) 実験医学 31, pp.1202-1208
- 小林徹也, 上村淳 細胞のふるまいを読み解く時系列に潜む情報量 (2013) 実験医学 31, pp.1239-1244
- 鈴木 厚, 普遍的細胞極性制御システム: PAR-aPKC システムの作用機構 (2012) 医学書院「生体の科学」63 巻 3号 pp.189-195
- 佐々木洋「初期発生ー体軸形成」(2011) 小幡祐一、城石俊彦、芹川忠夫、田中啓二、米川博通 編、生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール エル・アイ・シー pp.55-68
- 藤森俊彦, マウス初期胚における細胞分裂と発生 (2011) 共立出版 168-173
- Takaoka K. “Establishment of Anterior-Posterior in the mouse embryo” (2014) Kondoh, H., Kuroiwa, A. (eds.) *New Principles in Developmental Processes*. Springer pp.13-27
- Isao Matsuo, Chiharu Kimura-Yoshida and Kayo Shimokawa “Divergent roles of heparan sulfate in regulation of FGF signaling during mammalian embryogenesis” (2014) Kondoh, H., Kuroiwa, A. (eds.) *New Principles in Developmental Processes* Springer pp.239-251.
- Takemoto, T. “Regulation of axial stem cells deriving neural and mesodermal tissues during posterior axial elongation” (2014). Kondoh, H., Kuroiwa, A. (eds.) *New Principles in Developmental Processes* Springer, pp. 85-96
- 松尾 勲, 木村吉田千春、下川佳世「ヘパラン硫酸鎖を介した FGF シグナルの局所的な受容機構」(2012) 細胞工学 31, pp.426-431
- 遠藤充浩, 古関明彦 ポリコーム群によるヒストン修飾を介した発生分化制御 (2012) 実験医学 11月号, 30巻, pp.2902-2907
- 木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫 第4章, 第13節: マイクロ流体デバイス技術を応用した in vitro 生体モデルの構築 (2012) 先端バイオマテリアルハンドブック(エヌティーエス出版), pp.474-477

3) ホームページ <http://www.nibb.ac.jp/cellcom>

4) 主催シンポジウム 等 (全 14 件の内主なもの)

- 藤森, 佐々木 The 61st NIBB Conference “Cellular Community in Mammalian Embryogenesis” (2013.7 岡崎)、第 62 回細胞生物学会イブニングレクチャー「マウスの初期発生とその細胞生物学的理解に向けて」(2010.5 大阪)
- 佐々木: 日本分子生物学会ワークショップ「細胞運命を制御する Hippo および RASSF シグナル伝達系の最前線」(2011.12 横浜)
- 藤森 The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 “Quantitative Bioimaging” (2013.3 岡崎)
- 目野 新学術領域「細胞コミュニティ」公開シンポジウム「個体発生を細胞から理解する」(2011.1 福岡)
- 小林 「哺乳類着床前胚の定量生物学」研究会(2013.3 東京)、定量生物学の会 (第 2 回年会 (2010.1 大阪)、第 3 回年会 (2010.11 東京)、第 4 回年会 (2012.1 名古屋)、第 5 回年会 (2013.11 東京))

5) 一般向けのアウトリーチ活動 (全 25 件のうち主なもの)

- 目野 高校生への講話、福岡県高校教師への講演
- 佐々木 熊本県立八代中学による研究所見学。全体で講義を受けた後、班分けした中学生が各研究室に訪れた。研究室における研究内容を説明し簡単な体験実験を実施した。3回(2011年、12年、13年)。2012年は全体への講義も実施した。
- 鈴木 2013年度 「理化学研究所、横浜市立大学 (合同)一般公開」で、親子連れ向け体験型イベント「からだのしくみを見てみよう」
- 藤森 2013年10月 基礎生物学研究所一般公開(藤森、豊岡)(来訪者約1400名)、2012年12月岡崎高校講義、2011年6月小中高の理科教員向け国研セミナー、2011年10月基礎生物学研究所一般公開(来訪者約3300名)
- 山口 2012年2月 関東学院高等学校において出張講義
- 山縣 2013年8月奈良県生駒市桜ヶ丘1学童にて、小学生を対象に顕微鏡講習会「ケンピロー先生がやってくる!」を開催、2014年3月に放送されたNHKスペシャル「人体ミクロの大冒険」にて、我々の撮影した初期胚発生の動画が放映された。一般公開シンポジウム「DNAをあやつる生物のしくみ」(2013.8 大阪)
- 国府 仁川学院小学校同窓生授業 2012年6月および2010年6月西宮市80名、H22年度大阪大学いちょう祭施設公開「万能細胞をつかって生命現象を探索する」2010年4月大阪130名

10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1 ページ程度）

研究領域の研究成果が、当該学問分野や関連分野に与えたインパクトや波及効果などについて記述してください。

本領域においては、従来の発生生物学の研究手法にとらわれずに、細胞生物学、画像解析などを取り込み、初期胚を時間的・空間的に連続した細胞集団として哺乳類初期胚を包括的に理解することを目標とした。本領域活動によって得られた知見や、技術的成果は初期発生研究分野はもちろん広く関連分野にも貢献できたと考えられる。

初期胚発生の細胞生物学的、分子生物学的な動的理解

上皮細胞の細胞極性、細胞骨格制御の基盤となる分子メカニズムを解明することによって、細胞生物学的な視点を初期胚における細胞の挙動の理解につなげた。個々の細胞、細胞間相互作用を強く意識した研究により、マウスの着床前発生に関して大きく理解が進んだ。少量のサンプルから単一細胞レベルの遺伝子発現変動を解析することが可能となり、細胞集団における不均質性と細胞間相互作用を時空間的に理解できることになった。細胞極性、細胞間接着の組合せによる位置に依存した細胞分化の分子的基盤が明らかになった。着床前に現れる3つの細胞種に関して、細胞分化の階層性が明らかになった。従来考えられていたものに比較して遺伝子の発現や細胞の分化形質はよりダイナミックに制御されていた。

着床後の胚に関しても、細胞極性や細胞間の関係が個々の細胞の細胞動態（増殖、細胞分化、運命決定、体軸形成）に強く関与することが明確になった。子宮上皮による物理的拘束、機械的な力が、胚の体軸形成に強く関与すること、脊索形成に関して胚にかかる膨張力が細胞極性形成に反映されるという示唆も得られ、力学的視点が個体発生を考える一つの重要なパラメータとして具体的に示された。

マウス胚における FGF シグナルのヘパラン硫酸鎖の細胞外修飾の実体を解明し、細胞死による細胞外シグナル産生細胞の除去、BMP シグナルを負に制御する機構としてエンドサイトーシスが発見され、細胞生物学的な解析によって胚の中でのシグナルの新たな活性調節機構が明らかとなった。

これらから得られた細胞生物学的知見は、広く生命科学研究に活用される普遍的な物である。

ライブイメージング・画像解析の他の研究への応用

哺乳類初期発生というフォーカスした研究対象に対して、本研究領域ではライブイメージング用の遺伝子改変マウス、胚の培養装置、顕微鏡技術、画像解析技術を開発した。生物の動的な理解の為に細胞集団の中で個々の細胞を意識したライブイメージングの有効性が認知され、この5年間に発生に限らず様々な生命科学研究領域において適用が急速に増大し、本領域で開発した複合的な技術が広く波及し一般化した。特に細胞の特徴を可視化するレポーターマウスは国内外ともそれぞれのべ100件以上の配布を行った。生物画像からの特徴抽出を自動で行うアルゴリズム、それを高速化するためのハードウェアの活用などの技術が波及した。

幹細胞活用の為の基本的情報

ES細胞における分子間ネットワークの実体を解明した。EpiSC(エピプラストステムセル)の転写ネットワーク解析の為に独自に開発したアプリケーション SraTailor が簡便なゲノム情報解析技術として、幹細胞に限らず広くネットワーク解析に用いられている。また、発生プログラムの知見を応用することで幹細胞の制御に生かし、EpiSCを簡便に安定して維持・継代する方法の開発、ES細胞・iPS細胞を用いて腎臓に代表される組織構造の試験管内誘導に成功した。発生イベントの知見を応用することで、幹細胞学と、本領域がカバーする初期胚の発生学とが予想外につながって成果に結びついたものであり、幹細胞を活用する上で、基礎的な胚発生研究の重要性を示した。

基礎生物学から応用的な領域への貢献

マウス着床前胚の細胞分裂パターン、染色体分配様式、オートファジー・リソソーム活性などをモニターすることが、受精卵の品質を評価する新しい方法となり得ることを提案した。今後ヒトや家畜の胚の品質評価の基準へと広がる可能性がある。