

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03607

研究課題名（和文）頭尾軸に沿って異なる体幹部組織を産み出す体軸幹細胞の制御

研究課題名（英文）Regularion of axial stem cells producing various types of somatic cells

研究代表者

竹本 龍也（TAKEMOTO, Tatsuya）

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：30443899

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：胚発生過程において、発生時間の進行と共に、頭尾軸に沿って異なった分化細胞が体軸幹細胞より産み出される仕組みを、体軸幹細胞が存在する原条周辺（より後期では尾芽周辺）の細胞外環境と、その環境下におかれる体軸幹細胞の遺伝子制御ネットワーク（遺伝子発現状態およびエピゲノム状態）の変化という視点から研究を行い、体軸幹細胞を出発点とした新たな細胞系譜の分岐点を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の初期胚は多能性幹細胞から構成されるが、原腸陥入によって多種多様な体細胞系列が生み出される。こういった、体細胞系列がこういった仕組みで生み出されるかは不明であった。私たちが行なっている一連の研究では、こういった体細胞系列を産み出される仕組みについて、遺伝子制御の観点から明らかにしてきた。胚発生における細胞分化の仕組みを正確に理解することは、理学的な観点のみならず、幹細胞を出発点とした再生医療研究からも重要である。

研究成果の概要（英文）：We studied the mechanism how various types of differentiated cells are produced from the axial stem cells along the head-tail axis during embryogenesis. We especially focused on the extracellular environment, which acts the gene regulatory network of the axial stem cells (gene expression status and epigenomic status), and elucidated that the nephric mesenchyme (a part of future kidney) is derived from the axial stem cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：原腸陥入

1. 研究開始当初の背景

発生時間の進行と共に産み出される特徴的な組織として、脊椎動物の体幹部がある。脊椎動物の発生の初期過程は、まず、頭部領域(脳領域)が成立し、その後、体幹部が発生の進行と共に形成される。

研究代表者は、転写因子 SOX2 が神経系の原基である神経板に局限して発現することに注目して、その転写制御機構の研究を行い、それを発展させて次のことを示した [Takemoto T. et al. Nature (2011); Takemoto T. et al. Development (2006)]

- ・ 体幹部の神経板は、原条の両側に存在する、神経系と中胚葉への分化能力を持つ「体軸幹細胞」から、中胚葉と分離されることによって成立する。体軸幹細胞では、ひとたび Sox2 エンハンサーN1 が活性化されるが、このなかで N1 活性を保持して、SOX2 を発現したものが神経板を形成する。
- ・ 体軸幹細胞の中で、原条を通過して中胚葉領域へと移動する細胞群では、転写因子 TBX6 の作用によって N1 エンハンサー活性を失うとともに、中胚葉へと発生する。
- ・ この研究結果は、体幹部の組織が、神経系と中胚葉との共通前駆体である「体軸幹細胞」の維持と、SOX2 に依存した神経板細胞、TBX6 に依存した中胚葉細胞のバランスのとれた産出によって成し遂げられることを示している。
- ・ 後者の制御が乱れた例に、Tbx6 遺伝子変異胚がある。この変異胚では、体軸幹細胞から中胚葉への分化が起こらず、代わりに Sox2 遺伝子が発現し、神経系へと分化する。

研究代表者はこの研究によって、「三胚葉が形成され分離した後に、外胚葉から神経系が誘導される」という古典的なモデルには大きな変更が必要であり、むしろ「体幹部の神経系は、神経系と中胚葉との共通前駆体である『体軸幹細胞』から、中胚葉と分離されることによって生みだされる」ことを示した。

2. 研究の目的

体軸幹細胞は、頸部から尾端にかけて、その幹細胞状態を維持しながら、それぞれの頭尾軸に沿った分化細胞(神経板細胞・体節中胚葉細胞)を供給することで脊椎動物の体幹部領域を形成する。本研究では、体軸幹細胞が、発生時間の進行と共に、頭尾軸に沿って異なる分化細胞を産み出す仕組みを、体軸幹細胞が存在する原条周辺(より後期では尾芽周辺)の細胞外環境と、その環境下におかれる体軸幹細胞の遺伝子制御ネットワーク(遺伝子発現状態およびエピゲノム状態)の変化という視点から解析する

3. 研究の方法

これまでの研究から、体軸伸長が停止する尾端形成段階(12日目胚)の体軸幹細胞を、より早い発生段階(8日目胚)の原条領域に移植すると、移植された細胞はあらゆる頭尾軸の分化細胞を産み出すことが分かっている。すなわち、体軸幹細胞は、場の環境に反応して自らの幹細胞状態・分化状態を変化させていることが予想される。

本研究では、発生時間の変化に伴って体軸幹細胞がどのように変化し、その結果として、頭尾軸に沿って多彩な体細胞系列が産み出される仕組みを明らかにする。研究代表者は、この場の中心的な役割をする因子として、Wnt シグナルに着目している。研究代表者が Wnt3a 変異胚を用いて行った予備研究で、Wnt シグナルは、その強度(量)によって、異なる制御機構を差別的に作動させて、体軸幹細胞の維持・分化を制御していることを見出した。具体的には、Wnt シグナルが一定水準を超えた細胞群では、神経板細胞の発生が抑制され、その水準を下回った Wnt シグナルでは、時期尚早に SOX2 を発現させて、神経板細胞の産出を促進すると同時に、幹細胞が枯渇する。また、細胞場(原条領域や尾芽)の Wnt シグナルの強度は一定ではなく、発生の進行と共に低下することから、体軸幹細胞の Wnt シグナル強度に対する応答も発生時間と共に変化していると考えられる。実際に、Wnt3a 発現量が低下する変異胚を用いた解析では、Wnt3a 低下度合いに対応して異なる頭尾軸領域で体軸伸長が停止する。

そこで本研究では、細胞場がつくり出し発生時間の進行と共に変化する Wnt シグナルが、体軸幹細胞の維持や、頭尾軸に沿って異なる分化細胞を産み出す過程で、こういった遺伝子制御ネットワークを作動・変化させているかを解析する。

4. 研究成果

脊椎動物の胚発生では、まず頭部の原基の形成についで、体幹部が前方から後方へ順次作られる。先行研究において、後者の過程が神経系と中胚葉への2つの分化能力をもつ「体軸幹細胞」が前駆体となって進行することを示した。この体軸幹細胞は、頸-胸-腰-尾部といった頭尾軸に沿って異なる性質を持つ分化細胞を供給する。本研究では、「体軸幹細胞」がこういった遺伝子制御ネットワークによって維持されるのか、また、発生の進行とともに、こういった遺伝子制御ネットワークの変化によって頭尾軸に沿って異なる神経板または中胚葉細胞を産み出すのかを明らかにする。本研究は、細胞分化の仕組みを核内ゲノム状態の変化としてとらえるという特徴がある。本研究によって、新しい細胞運命の制御機構を明らかにできると考えている。

- ・ 胚を細かく解剖することで、体軸幹細胞が存在する領域(原条周辺のエピプラスト)と、そこか

ら派生する細胞が存在する領域(神経板および中胚葉)とを分離して RNA-seq によって遺伝子発現プロファイルを解析した。それぞれの領域で特徴的に発現する遺伝子の抽出を行い、その発現を詳細に解析した。並行して、レーザーマイクロディセクションおよびセルソーターを用いて、体軸幹細胞の指標である Sox2 エンハンサー-N1 を活性化する細胞を分離して、発現解析を行なった。

・体軸幹細胞および神経板細胞・中胚葉細胞で特徴的に発現する遺伝子群を第一の研究対象として、これら遺伝子群をゲノム編集技術を活用して欠損させた。体軸幹細胞の維持・分化に関与している Wnt3a 遺伝子、および、Tbx6 遺伝子の機能欠損マウス胚で発現が変化した 6 遺伝子を欠失させたゲノム編集胚を作成・解析し、うち 1 つで体軸の発生に影響が見られた。

・並行して体軸幹細胞状態、および、分化状態における遺伝子制御状態の解析を行っている。それぞれの細胞状態で特徴的に発現している転写因子に注目して、その標的ゲノム、標的遺伝子の同定を実施した。ChIL 法および Cut&Run 法を初期胚に最適化して活用することで、少数細胞での遺伝子制御解析を行なった。これらの被制御遺伝子群やその制御配列についてさらなる解析を行なっている。

・一連の、遺伝子発現解析や遺伝子発現制御解析から、将来腎臓へと発生する中間中胚葉が、体軸幹細胞から発生することを見出した。また、中間中胚葉への分化を制御する分子メカニズムについても明らかにした(論文発表)。現在はこの研究を発展させ、これらの幹細胞および分化細胞において特徴的に発現している転写因子に注目して、その標的ゲノム、標的遺伝子の同定を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iida Hideaki, Furukawa Yoko, Teramoto Machiko, Suzuki Hitomi, Takemoto Tatsuya, Uchikawa Masanori, Kondoh Hisato	4. 巻 25
2. 論文標題 Sox2 gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 242-256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Teramoto Machiko, Sugawara Ryo, Minegishi Katsura, Uchikawa Masanori, Takemoto Tatsuya, Kuroiwa Atsushi, Ishii Yasuo, Kondoh Hisato	4. 巻 9
2. 論文標題 The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.048728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sugiura Daisuke, Maruhashi Takumi, Okazaki Hi-mi, Shimizu Kenji, Maeda Takeo K., Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 364
2. 論文標題 Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 558 ~ 566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aav7062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Shiori, Uchida Yuji, Ohtani Tomomi, Nozaki Erina, Yin Chunyang, Gotoh Yoshihiro, Yakushiji Kaminatsui Nayuta, Higashiyama Tetsuya, Suzuki Takamasa, Takemoto Tatsuya, Shiraishi Yo-ichi, Kuroiwa Atsushi	4. 巻 61
2. 論文標題 Hoxa13 regulates expression of common Hox target genes involved in cartilage development to coordinate the expansion of the autopodal anlage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 228 ~ 251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto Tatsuya	4. 巻 2050
2. 論文標題 Zygote Electroporation for CRISPR/Cas9 Delivery to Generate Genetically Modified Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 121 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9740-4_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada Akihito, Maehara Kazumitsu, Ono Yusuke, Taguchi Hiroyuki, Yoshioka Kiyoshi, Kitajima Yasuo, Xie Yan, Sato Yuko, Iwasaki Takeshi, Nogami Jumpei, Okada Seiji, Komatsu Tetsuro, Semba Yuichiro, Takemoto Tatsuya, Kimura Hiroshi, Kurumizaka Hitoshi, Ohkawa Yasuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Histone H3.3 sub-variant H3m7 is required for normal skeletal muscle regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03845-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanihara Fuminori, Hirata Maki, Nguyen Nhien Thi, Le Quynh Anh, Hirano Takayuki, Takemoto Tatsuya, Nakai Michiko, Fuchimoto Dai-ichiro, Otoi Takeshige	4. 巻 13
2. 論文標題 Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0206360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanihara Fuminori, Hirata Maki, Nguyen Nhien T., Le Quynh A., Hirano Takayuki, Takemoto Tatsuya, Nakai Michiko, Fuchimoto Dai-ichiro, Otoi Takeshige	4. 巻 90
2. 論文標題 Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-system into porcine zygotes via electroporation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 55 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takami N, Hayashi S, Takemoto T.
2. 発表標題 体軸幹細胞の制御におけるGreb1の役割
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimokita E, Suzuki H, Tsuruo Y, Takemoto T.
2. 発表標題 中胚葉細胞の移動は中胚葉誘導因子であるcTbx6Lに依存しない
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi S, Takemoto T.
2. 発表標題 マウス体軸形成において体軸幹細胞は中間中胚葉を産み出す
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saito S, Kanazawa U, Hibino N, Takemoto T, Matsuda Y, Kuroiwa A, Suzuki T.
2. 発表標題 後肢の位置を決定するGdf11のエンハンサーの同定とトランス因子の重要性
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 5.Saito S, Kanazawa U, Hibino N, Takemoto T, Matsuda Y, Kuroiwa A, Suzuki T.
2. 発表標題 後肢の位置を決定するGdf11のエンハンサーの同定と機能的解析
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学先端酵素学研究所発生生物学分野ホームページ http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp 徳島大学先端酵素学研究所 発生生物学分野 http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/embryology/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------