

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17H03682  
研究課題名(和文) 初期胚における隣接細胞のHippoシグナル状態を認識した細胞間コミュニケーション

研究課題名(英文) Intercellular communications in embryos that recognizes Hippo signaling of the neighboring cells

研究代表者  
佐々木 洋 (Sasaki, Hiroshi)  
大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10211939  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：正確性は発生の特徴であるが、発生中の胚内の個々の細胞の挙動や状態には、ばらつきがあり、胚がどのようにしてばらつきを克服して正確に発生するのかが謎であった。本研究では、着床前マウス胚における多能性細胞組織であるエピプラストが形成される際に、細胞間でHippoシグナルのばらつきにより多能性因子の発現にばらつきが生じること、そして細胞競合という隣接細胞間のコミュニケーションにより、多能性因子の発現の低い低品質な細胞を細胞死により排除する品質管理機構が存在することを見出した。これは、発生における細胞分化のばらつきを克服して正確な発生を可能にする一つの仕組みであると考えられる。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの体を作る発生という現象の正確性がなぜ担保されるのか、というのは大きな疑問であったが、本研究の成果は、細胞競合という隣接間の細胞間のコミュニケーションが、発生が内包する細胞分化過程の揺らぎを乗り越えて、正確な発生を可能にする一つの仕組みであることを、世界に先駆けて示したものであり、発生学の分野における重要な研究成果である。また、本研究は多能性細胞の品質管理機構が存在することを示したものであり、その仕組みを応用することにより、iPS細胞などの多能性細胞の品質管理機構の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Correctness is an important feature of development. In developing embryos, however, behaviors and states of individual cells are highly variable. Thus, it has been a question how embryos achieve correct development by overcoming developmental variations/fluctuations. In this study, we have found that during formation of pluripotent epiblast cells in preimplantation mouse embryos, variations in Hippo signaling cause variable expression of pluripotency factors among cells, and that a quality control mechanism, which eliminates the low-quality/low pluripotency factor cells by apoptosis through short-range inter-cellular communication known as cell competition, is present. We propose that this is a mechanism, which overcomes variations during cell differentiation and supports correct development.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞競合 エピプラスト 多能性細胞 着床前胚 マウス胚 品質管理 Hippoシグナル 細胞分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胚内の個々の細胞の挙動や状態は、均一ではなく揺らぎ(ばらつき)がある。その一方で、細胞は集合体として常に正確に体や器官をつくり上げる。このように、揺らぎのある細胞集団が正確に体を作るためには、隣接する細胞同士がその状態を認識するコミュニケーションを行い、集団としての調和を取ることが必要であるが、そのしくみについては未だ多くが不明である。

細胞周囲の状態の認識に関わるシグナル経路の一つに Hippo シグナルがある。Hippo シグナルは、元々ショウジョウバエでがん抑制シグナル経路として同定されたシグナル経路であるが、哺乳類にも存在し、細胞間の接着、細胞にかかる力など、周囲の細胞等から受ける様々な情報によって制御され、遺伝子発現を制御するシグナル経路である。私は Hippo シグナルが胚内の隣接細胞間のコミュニケーションに重要な働きをしていると考え、これまでに、Hippo シグナルの制御機構とマウス初期胚発生における Hippo シグナルの役割とを明らかにしてきたが、これらの研究をさらに発展させる中で、最近、培養細胞や着床後の初期胚において、隣接細胞の Hippo シグナルの活性化状態の認識に基づく、新しい細胞間のコミュニケーション機構が働いていることを見出した。すなわち、マウス胚由来の線維芽細胞 NIH3T3 で、Hippo 経路の転写因子 TEAD の活性を増減すると細胞増殖が増減する(Ota & Sasaki, Development 2008)が、その様な TEAD 活性を操作した細胞を正常細胞と混ぜて共培養すると、相対的に TEAD 活性の低い細胞が敗者となり細胞死によって排除され、相対的に TEAD 活性の高い細胞が勝者となり増殖して失われた細胞を補う、「細胞競合」と呼ばれる細胞間コミュニケーションが起こることを見出した(Mamada et al, J Cell Sci 2015)。さらに Hippo 経路因子を欠損した胚性幹(ES)細胞を作成し、正常細胞とのキメラマウス胚を作製すると、胎生 7.5-8.5 日の着床後の初期胚において、TEAD 活性が低い *Tead1* の変異細胞は細胞競合の敗者になり正常細胞に排除された。TEAD 活性が低い *Tead1* の単独変異胚は発生できるため、キメラ胚でこれらの変異細胞が排除されたのは、自律的な細胞死ではなく、TEAD 活性の高い正常細胞とのコミュニケーションの結果であると考えられた。

これらの知見は、着床後のマウス初期胚には隣接細胞との TEAD 活性(=Hippo シグナルの活性化状態)の違いを認識する細胞間コミュニケーション機構が働いていることを示唆している。この様な隣接細胞の Hippo シグナルの活性化状態の認識に基づく細胞間のコミュニケーションは、正確な発生を可能にする細胞間コミュニケーション機構の一つであると考えられ、その仕組みや役割を明らかにできれば発生の正確性の分子基盤の解明につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、将来的に発生の正確性の分子基盤の解明につなげることを目指し、着床後のマウス初期胚における隣接細胞の Hippo シグナル状態を認識する細胞間コミュニケーションについて、そのしくみと発生学的な意義とを明らかにすることを目的とする。その目的達成のため、以下の4つの研究を行う。

#### (1) 着床後初期胚で起こる細胞間コミュニケーションの詳細な記述

この細胞間コミュニケーション研究の基盤となる基本的情報を得るため、TEAD 活性の違いによる細胞競合が、着床後初期胚のいつ、どこで、どのように起こるのかを明らかにする。

#### (2) Hippo シグナルの差と細胞競合との関係の解析

胚内の細胞の Hippo シグナル(=TEAD 活性)の差による細胞競合が、どのような性質を持った細胞の排除につながるのかを明らかにする。

#### (3) Hippo シグナルの違いによる細胞競合の正常発生への関与と意義の解析

Hippo シグナルの違いによる細胞競合が、正常なマウス胚の発生でも起こっていることなのかどうか、また、起こっているとすれば、発生においてどのような役割を持っているのかを明らかにする。

#### (4) TEAD 活性の違いによる細胞競合誘導機構の解析

TEAD 活性の違いによる細胞競合が、どのような因子によって制御されているのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス胚操作

2細胞期胚の1つの割球に Cas9 タンパクと sgRNA 複合体のマイクロインジェクションを行うことでゲノム編集により *Tead1* 遺伝子を破壊し、野生型細胞と *Tead1*<sup>-/-</sup>細胞からなるモザイク胚(野生型 *Tead1*<sup>+/+</sup>胚)を作成した。全細胞で赤色蛍光タンパク質 DsRed を発現するトランスジェニックマウス系統(R26RR)を用いて、蛍光タンパク質遺伝子も同時にゲノム編集で破壊することで *Tead1*<sup>-/-</sup>細胞を蛍光を持たない細胞として標識した。胚を *in vitro* で培養したり、偽妊娠マウスに移植して、様々な発生段階の胚を得た。実験に応じて *Myc* 遺伝子など他の遺伝子についても同様にゲノム編集によるモザイク胚の作製を行った(図1)。

細胞死を抑制する実験では、胚を pan-caspase inhibitor の Z-VAD-fmk を含む培地の中で培

養した。2i 処理では Mek 阻害剤 PD0325901 と Gsk3 阻害剤 CHIR99021 を含む培地で培養した。コントロール胚は溶媒として用いた DMSO のみを含む培地で培養したものを用いた。

(2) 着床前マウス胚の遺伝子発現の定量的解析  
初期から後期の胚盤胞を YAP, SOX2, NANOG, OCT3/4, SOX17, Myc, cleaved-caspase 3 に対する抗体で蛍光免疫染色を行い共焦点顕微鏡で画像を取得した。画像解析ソフト IMARIS を用いてそれら因子の内部細胞塊・エピプラストの核における発現(シグナルの強さ)を定量した。また、核を Hoechst で染色し、そのシグナル強度で割ることで、Z 軸の違いによるシグナル強度の違いを補正した。SOX2 は内部細胞塊とエピプラストに特異的に発現するため、SOX2 発現細胞について、解析を行った。

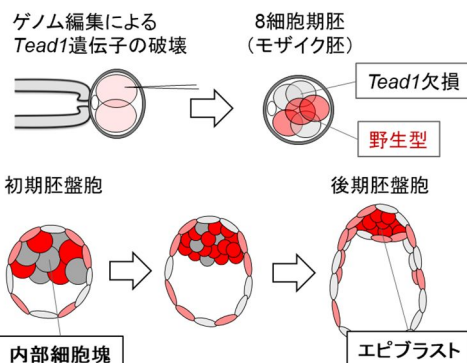


図1. 2細胞期胚へのゲノム編集によるモザイク胚の作製

#### 4. 研究成果

(1) 着床後初期胚で起こる細胞間コミュニケーションの詳細な記述

野生型 *Tead1*<sup>-/-</sup> モザイク胚は着床後の胎生 6.5 日(E6.5)において *Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞をエピプラストからほぼ完全に排除していた。そこで、発生を次第にさかのぼって解析したところ、初期胚盤胞(E3.5)の内部細胞塊(エピプラストの前駆細胞)では野生型、*Tead1*<sup>-/-</sup> 両方の細胞が同数存在したが、次第に *Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞の割合が減少し、着床直前の後期胚盤胞(E4.5)のエピプラストでは *Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞がほとんど消失していた(図2)。また、胚盤胞期のモザイク胚を薬剤(Z-VAD-fmk)処理により細胞死を抑制したところ、*Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞の排除が抑制された。したがって、着床前の胚盤胞において、内部細胞塊からエピプラストが形成される過程で、細胞競争が起こり、TEAD 活性が低い *Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞を細胞競争の敗者として細胞死により排除することが分かった。

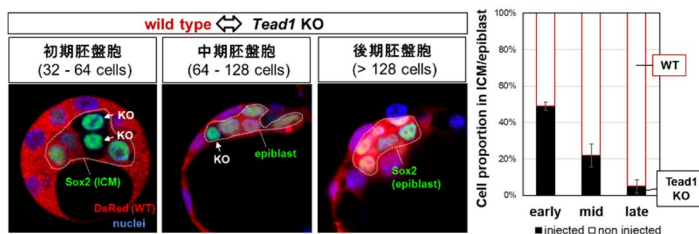


図2. モザイク胚におけるエピプラスト形成過程の細胞競争

(2) Hippo シグナルの差と細胞競争との関係の解析

E3.5 から E4.5 のエピプラスト形成過程において、TEAD の転写活性に必要なコアクチベーターYAP の細胞内分布を調べたところ、E3.5 の内部細胞塊では YAP は細胞質に存在したが、発生の進行とともに次第に核にも存在するようになり、E4.5 のエピプラストでは強い核局在を示した。すなわち、エピプラスト形成過程で TEAD が不活性な状態から転写活性が次第に増加することを見出した。この TEAD 活性(=YAP の核局在)が増加する時期は、多能性因子 SOX2, OCT3/4, NANOG の発現が増加する時期でもあり、実際に両者の間には有意な相関がみられた(図3)。さらに、細胞死を抑制した野生型 *Tead1*<sup>-/-</sup> モザイク胚では *Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞における多能性因子の発現は野生型細胞よりも有意に低かった。これらの結果は、TEAD 活性の上昇がエピプラスト形成時の多能性因子の発現に必要であり、細胞競争は TEAD 活性が低く多能性因子の発現の低い細胞を排除することが示唆された。

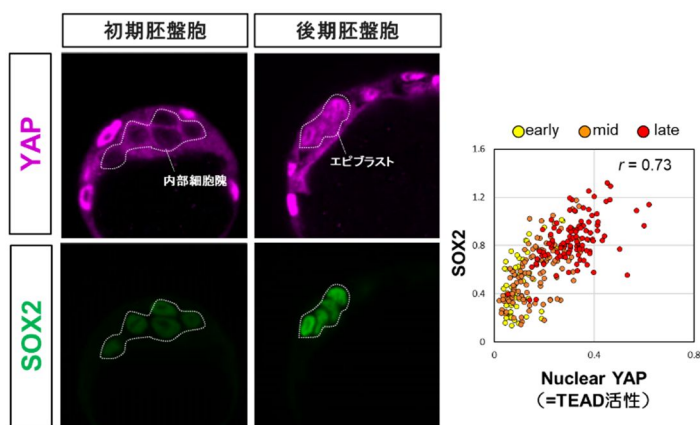


図3. エピプラスト形成過程における核YAP(TEAD活性)と多能性因子の変化

(3) Hippo シグナルの違いによる細胞競争の正常発生への関与と意義の解析

ここまでの実験は、野生型 *Tead1*<sup>-/-</sup> モザイク胚を作成して、人為的に TEAD 活性の異なる細胞を持つ胚を作成すると、エピプラスト形成時に細胞競争が起こることを示したものである。そこで、次に、正常な発生過程においても細胞競争が起こるのかを解析した。まず、野生型胚の初期から後期胚盤胞期における細胞死の有無を解析したところ、すべての時期で細胞死が起こっており、特に、中期胚盤胞期の前半(64~95細胞、以下、中期胚盤胞期と略す)において内部細胞塊において高頻度の細胞死が見られた。この時期の胚の内部細胞塊における YAP の分布と

多能性因子 SOX2 の発現を詳細に調べたところ、一つの胚の中でも、内部細胞塊の個々の細胞の YAP の核局在(=TEAD 活性)と SOX2 の発現には大きなばらつきがあり、TEAD 活性の差による細胞競合が起こっている可能性が考えられた。実際、この発生段階で細胞死をしている細胞は、他の細胞より顕著に TEAD 活性が低く SOX2 の発現も低いものであった。したがって、正常胚においては、中期胚盤胞期に TEAD 活性と多能性因子の発現に大きなばらつきがあり、細胞競合によって TEAD 活性が低く多能性因子の発現が低い細胞を細胞死によって排除していることが示唆された(図4)。

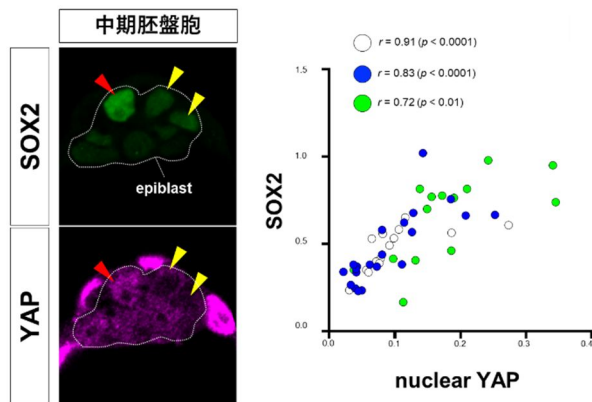


図4. 中期胚盤胞の核YAP(TEAD活性)と多能性因子のばらつき

初期胚盤胞の内部細胞塊からエピプラストだけでなく原始内胚葉も作られる。そこで、細胞競合で排除される細胞がどのような細胞なのかを明らかにするために、エピプラスト特異的な SOX2 と同時に原始内胚葉特異的な転写因子 SOX17 の発現を解析した。正常な後期胚盤胞では、すべての細胞が、SOX2 あるいは SOX17 のどちらか一方を強く発現しており、どちらかの細胞に分化していたが、細胞死を抑制した胚では、分化した細胞に加え、正常胚には存在しない SOX2 と SOX17 とを同時に弱く発現する分化途中の分化が決まっていなかった細胞が存在した。このことは、細胞競合は、発生過程で作られる分化が決まっていなかった細胞を排除することで、正しく分化した細胞を選別する、品質管理機構の役割を担っていることが分かった。

さらに、細胞死を抑制した胚では、遺伝子発現の低い細胞が存在するだけでなく、正常にエピプラストと原始内胚葉に分化している細胞が分離せず、混在しており、組織構築も異常になっていた。したがって、細胞競合による分化途中の細胞の排除は、正しい細胞分化だけではなく正しい組織構築にも必要であることが分かった。

#### (4) TEAD 活性の違いによる細胞競合誘導機構の解析

TEAD 活性の違いによる細胞競合が、どのように制御されているのかを明らかにするために、以下の点に注目した。まず、TEAD 活性の低い細胞は多能性因子の発現が低いため、TEAD 活性と多能性因子のどちらが競合に関与しているのかを明らかにするために、胚を 2i (Mek 阻害剤と Gsk3 阻害剤)処理することで、多能性因子の発現を増加させた。野生型胚を 2i 処理すると、全ての内部細胞塊の細胞が強い多能性因子の発現を示し、内部細胞塊での細胞死は消失した。また、野生型 *Tead1*<sup>-/-</sup> モザイク胚を 2i 処理した場合も、全ての内部細胞塊の細胞が強い多能性因子の発現を示し *Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞は排除されなかった。したがって、TEAD 活性によって制御される、多能性因子の発現が細胞競合に重要であることを示唆する。一方、ショウジョウバエや着床後マウス胚のエピプラストでは、MYC の発現量の違いが細胞競合に重要であることが報告されている。そこで、MYC の関与について調べたところ、野生型 *Tead1*<sup>-/-</sup> モザイク胚では *Tead1*<sup>-/-</sup> 細胞は MYC の発現レベルが低いこと、また野生型 *Myc*<sup>-/-</sup> モザイク胚ではエピプラスト形成過程で *Myc*<sup>-/-</sup> 細胞が細胞競合の敗者となって排除されることを見出した。これらの結果から、TEAD による細胞競合は、その下流で発現する多能性因子と MYC の発現レベルの違いが引き金となって細胞競合が起こっていることが示唆された。

#### (5) まとめと考察

上記の4つの研究より、着床前マウス胚発生におけるエピプラストの形成と細胞競合について、以下のことがあきらかになった。多能性細胞のエピプラストは後期胚盤胞につくられる時には10~20程度の細胞しかなく、これら少数の細胞が胚全体を作るため、すべての細胞が高い品質を持つことが大切である。しかし、初期胚盤胞の内部細胞塊からエピプラストが作られる過程では、個々の細胞の Hippo シグナル・TEAD 活性にばらつきがあり、多能性因子の発現にばらつきが生じ、多能性因子の発現が強くエピプラストに分化した細胞と遺伝子発現が弱く分化途中の細胞とが混在する状態になる。そして、それら細胞間で多能性因子や MYC の発現レベルの差による細胞競合が起こり、分化途中の細胞を細胞死で排除することにより、正しく分化した高品質の細胞のみからなるエピプラストが作られる(図5)。細胞分化過程における遺伝子発現のばらつきは特に初期胚においてよく見られることから、細胞

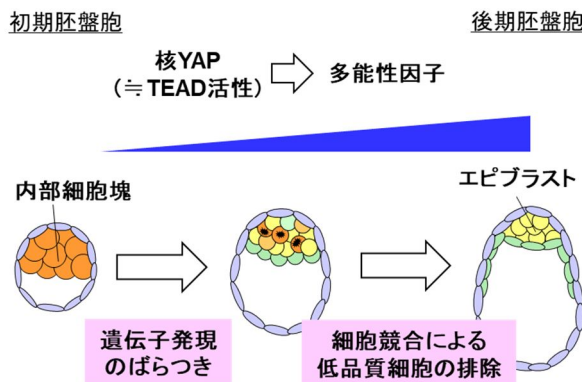


図5. エピプラスト形成過程における細胞競合の役割

分化における細胞競合による品質管理は正確な発生を可能にするための重要な仕組みの一つであると考えられる。

<引用文献>

Mamada H, Sato T, Ota M, Sasaki H. Cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts is controlled by the activity of Tead family proteins and Myc. *J Cell Sci.* 2015;128:790-803.

Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development.* 2008; 135:4059-69.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kamura K, Shin J, Kiyonari H, Abe T, Shioi G, Fukuhara A, Sasaki H.	4. 巻 505
2. 論文標題 Obesity in Yap transgenic mice is associated with TAZ downregulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 951-957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.037	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 Saito K, Kawasoe R, Sasaki H, Kawaguchi A, Miyata T.	4. 巻 43
2. 論文標題 Neural Progenitor Cells Undergoing Yap/Tead-Mediated Enhanced Self-Renewal Form Heterotopias More Easily in the Diencephalon than in the Telencephalon.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem. Res	6. 最初と最後の頁 171-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-017-2390-x	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 Hashimoto M, Sasaki H	4. 巻 50
2. 論文標題 Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Cell	6. 最初と最後の頁 139-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2019.05.024.	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10件（うち招待講演 7件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hiroshi Sasaki
2. 発表標題 Tead activity controls cell competition around implantation stage
3. 学会等名 3rd Cell Competition International Symposium: Cell Competition in Development and Cancer（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Sasaki
2. 発表標題 Tead activity-triggered cell competition as a safeguard during establishment of epiblast in mouse embryos
3. 学会等名 EMBO workshop on the Hippo pathway across species and disciplines (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木 洋
2. 発表標題 Tead活性の違いによる細胞競合がマウスの初期胚発生にはたす役割
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroshi Sasaki
2. 発表標題 Tead transcription factors control pluripotency and cell competition during formation of epiblast.
3. 学会等名 117th International Titisee Conference: From oocyte to embryo; illuminating the origins of life (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木 洋
2. 発表標題 細胞競合による多能性細胞形成時の品質管理
3. 学会等名 第5回 細胞生物学信州夏期セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木 洋
2. 発表標題 マウス胚エピブラスト形成時のHippoシグナルと細胞競合の役割
3. 学会等名 マウス胚エピブラスト形成時のHippoシグナルと細胞競合の役割 第91回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masakazu Hashimoto, Hiroshi Sasaki
2. 発表標題 Epiblast formation by Tead-Yap-dependent expression of pluripotency factors and competitive elimination of unspecified cells
3. 学会等名 Keystone symposia: Cell competition in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masakazu Hashimoto, Hiroshi Sasaki
2. 発表標題 Epiblast formation by Tead-Yap-dependent expression of pluripotency factors and competitive elimination of unspecified cells
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 第52回日本発生生物学会年会 Hiroshi Sasaki
2. 発表標題 Mechanisms of epiblast formation during preimplantation mouse embryos.
3. 学会等名 TEMTIA-IX (The 9th EMT International Association Meeting) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 佐々木 洋
2. 発表標題 Hippoシグナルと細胞競合によるエピプラスト形成
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学生命機能研究科初期胚発生研究室ホームページ  <a href="http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/sasaki/">http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/sasaki/</a></p> <p>プレスリリース          着床前胚での細胞同士のコミュニケーションで高品質に！？  <a href="http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/sasaki-20190613/">http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/events/achievement/sasaki-20190613/</a></p>
--

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
連携研究者	橋本 昌和  (Hashimoto Masakazu)  (60580496)	大阪大学・生命機能研究科・准教授    (14401)	2019年10月に助教から准教授に昇任