

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22427

研究課題名(和文) 胚体特異的遺伝子変異マウス胚の高速作製法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for rapid production of embryo specific mutant mouse.

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異マウスは遺伝子機能の解析に広く用いられているが、胎生致死になる変異体の7割が胎盤の異常による発生異常を示す。本研究では、遺伝子の胚特異的機能を解析するために、着床前胚の細胞分化機構を制御することにより、胚特異的に遺伝子変異をもつマウス胚を簡便に作り出す技術の開発を目的とした。4細胞期胚の1割球にPARD6BとGATA6の機能を抑制し、初期胚盤胞期まで培養後に子宮に移植して発生させたところ、胎生10.5日において胚が操作割球に由来する細胞のみからなるものが43%の効率で得られた。今後、この方法をゲノム編集と組み合わせることで、胚特異的な遺伝子破壊マウスを簡便に作成できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎生致死になる変異体の7割が胎盤の異常による発生異常を示す。胚特異的な遺伝子機能を解析するためには胚特異的な変異体を作成する必要があるが、既存の方法で作成するには多くの労力と時間が必要なため、あまり解析されていないのが現状である。本研究では、4細胞期胚に対して胚操作を行うことで、操作した割球に由来する細胞のみからなる胚を効率よく作ることに成功した。この方法をゲノム編集と組み合わせることにより、F0で胚特異的な変異体を簡便に作る事が可能になると期待される。そのような技術が確立できれば、胎生致死になる変異マウスについて胚特異的な遺伝子機能を迅速に解明できるようになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mutant mice are widely used for analysis of gene function, but 70% of embryonic lethal mutants show developmental abnormalities due to placental defects. In this study, aiming for analysis of the embryo-specific function of genes, we tried to develop a technology which easily and efficiently produces mouse conceptuses with embryo-specific gene mutations by modulating the cell differentiation mechanisms of preimplantation embryos. PARD6B and GATA6 were suppressed in one blastomere of the 4-cell stage embryos, and the manipulated embryos were cultured until the early blastocyst stage and then transferred into the uterus. At E10.5, 43% of the embryos consisted only of the cells derived from the manipulated blastomere. By combining this method with genome editing, embryo-specific mutant mice will be easily created.

研究分野：発生生物学

キーワード：初期発生 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

現在、遺伝子変異マウスを用いた遺伝子機能の解析は、生命科学研究において広く用いられている。遺伝子変異マウスの作成は、当初は効率の低い胚性幹細胞での相同組換えによる変異導入とキメラマウスの作製を行なうため、多大な労力と約1年という長い期間を要した。しかし、近年、CRISPR/Cas9によるゲノム編集法が開発されたことにより、1細胞期胚(受精卵)に直接ゲノム編集を行うことで、交配せずにF0での解析も可能になる(文献)など遺伝子変異マウスの作製に要する労力・時間は大幅に軽減・短縮された。その一方で、遺伝子変異マウスの3割は胎生致死になるが、胎生致死になる変異体の7割は胚体外の組織である胎盤の異常に起因する発生異常を示す事が報告された(文献)。従って、単純な遺伝子変異マウスでは約2割の遺伝子が胚体や個体における機能を解析できない。また既に胎生致死として報告されている変異体の表現型にも、胎盤の異常に起因する2次的な異常が多く含まれている可能性があり、胚体特異的な機能が再検証される必要がある。これらの遺伝子について胚体や個体における機能を解析するためには、胎盤の遺伝子は正常で胚体特異的に遺伝子を破壊する必要がある。現在の技術では、胚体特異的に遺伝子組換え酵素 Cre を発現するマウス系統を用いたコンディショナルノックアウト法を行うため、多くの時間と労力が必要である。そのため実際にはほとんど解析されることはなく、変異マウスを用いた遺伝子機能研究を進めるうえで大きな障害となっている。

2. 研究の目的

本研究では、マウス着床前胚の細胞分化制御機構の知見を活用することにより、F0において胚体特異的に遺伝子変異をもつマウス胚を簡便かつ効率よく作り出す技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は以下の考え方に基づいて行った。まず、マウス卵割期胚の1つの割球に対して着床前胚の細胞分化機構を操作することで、任意の割球を選択的に胚体にする技術を開発する。その技術が開発されたら、その方法をCRISPR/Cas9によるゲノム編集法と組み合わせることにより、胚体特異的に遺伝子変異を持つマウス胚を作成する。

着床前胚

では、発生の進行と共に2段階の細胞分化を行い、最終的に3種類の細胞からなる後期胚盤胞をつくり子宮に着床する(図1)。1回目の細胞分化では栄養外胚葉と内部細胞塊

がつくれ、2回目の細胞分化では内部細胞塊がさらにエピプラストと原始内胚葉へと分化する。栄養外胚葉は胎盤の胚由来部分を作り、エピプラストは胚体を、原始内胚葉は臓側内胚葉などの胚体外の組織を作る。

我々はこれまでの研究から、これらの細胞分化機構について以下のような知見を得ている(図2A)。1回目の細胞分化は Hippo シグナルが制御しており、Hippo 経路の転写因子 TEAD4 変異胚またはノックダウン胚では栄養外胚葉が形成されず、全ての細胞が内部細胞塊になる(文献、)。また、Hippo シグナルの制御には PAR-aPKC システムによる細胞

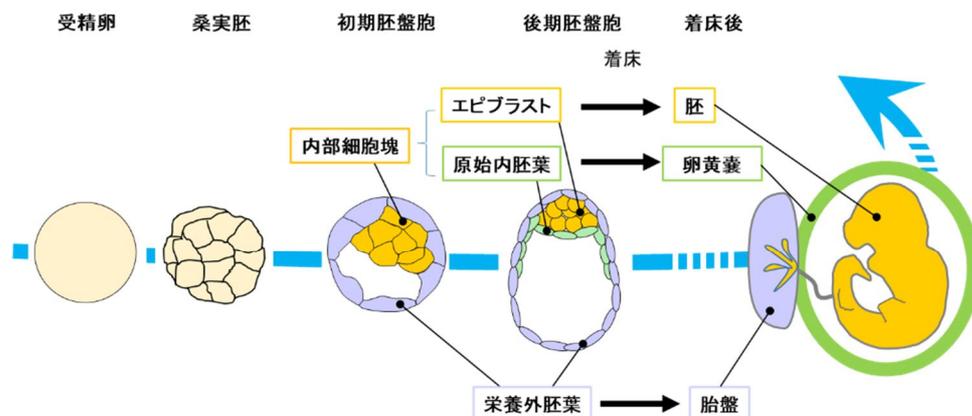


図1. 着床前胚における細胞分化

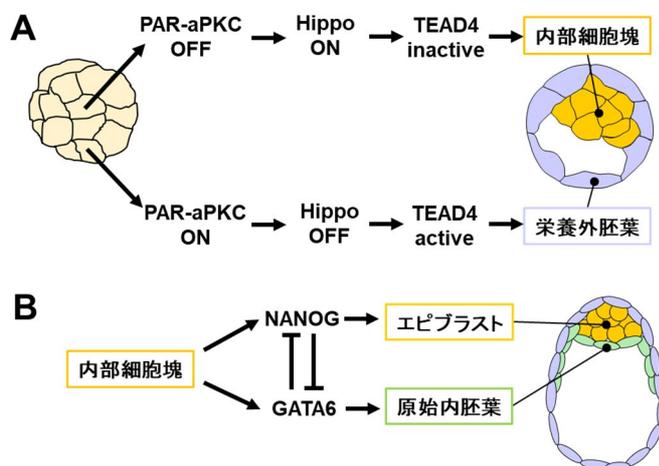


図2. 細胞分化の制御機構

の極性化が重要な役割をしており、極性を持たない細胞が Hippo シグナルを活性化して内部細胞塊へと分化する(文献)。一方、2 回目の細胞分化で作られるエピプラストには、細胞間で多能性遺伝子の発現に大きなばらつきがあり、遺伝子発現の高い細胞が勝者となって生存し、発現の低い細胞が敗者となり細胞死を起こして排除される細胞競合による品質管理機構があることも見出している(文献)。また Rossant らや Hadjantonakis らによる先行研究により、2 回目の細胞分化では、転写因子 NANOG と GATA6 とがエピプラストと原始内胚葉の分化をそれぞれ制御しており、これらの転写因子は互いの発現を抑制していることが示されている(図 2B)。

これらの知見を活用して、以下の方法で卵割期胚の任意の割球を胚体を作るエピプラストに分化させる(図 3、図 4)。卵割期胚の1つの割球に栄養外胚

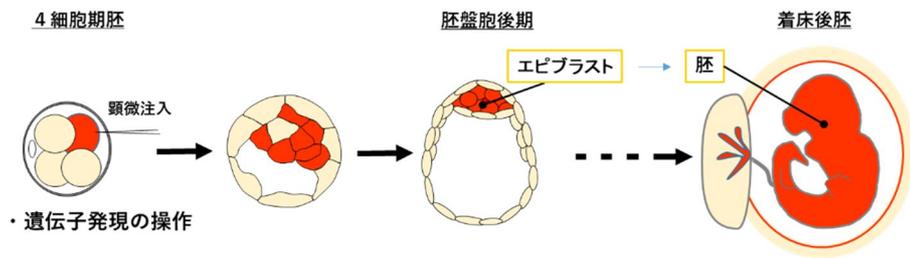


図3. 細胞分化機構の操作によるエピプラストへの選択的な分化

葉の分化に必要な転写因子 TEAD4 あるいは極性化因子 PARD6B に対する dsRNA あるいは siRNA を注入して機能抑制(ノックダウン)することで、1 回目の細胞分化において操作した割球に由来する細胞を内部細胞塊へと分化させる。また、同時に2 回目の細胞分化において原始内胚葉の分化に必要な転写因子 GATA6 に対する dsRNA を注入して機能抑制することで、相互抑制関係にある NANOG の発現を誘導し、操作した割球に由来する細胞をエピプラストへと分化させる。Gata6 変異胚では NANOG の発現が正常胚に比べて早く上昇するため、エピプラスト形成過程で、GATA6 ノックダウン細胞は野生型細胞に対して細胞競合の勝者となって野生型細胞を排除するため、全てのエピプラスト細胞(胚体)が変異細胞からなる胚を作成することができる。

また、2 細胞期の1つの割球に CRISPR/Cas9 システムの注入によるゲノム編集を行うことで、胚の半分の細胞で遺伝子が破壊されたモザイク胚を100%に近い高効率で作成する技術も確立している(文献)。上記の操作した割球を選択的に敗退にする技術が確立されたら、その技術を高効率のゲノム編集技術と組み合わせることにより、胚特異的に遺伝子変異を持つマウス胚を作成する。

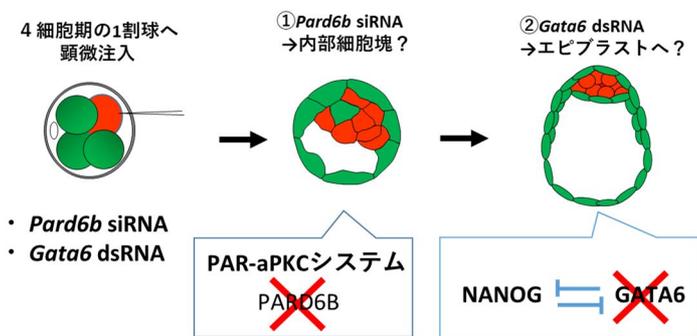


図4. 4細胞期胚における遺伝子機能抑制によるエピプラストへの分化

4. 研究成果

(1) 2細胞期胚における TEAD4 と GATA6 のノックダウン実験

研究の方法において説明した原理によって、実際に細胞分化機構を操作することにより、操作した割球に由来する細胞を効率よくエピプラスト(胚体)に分化させることができるかどうかを検証することを目的として、まず2細胞期胚の1つの割球に対して、栄養外胚葉の分化に必要な転写因子 TEAD4 と原始内胚葉の分化に必要な転写因子 GATA6 に対する dsRNA を注入して機能を抑制した。また、操作した割球を識別するために、DNA 組換え酵素 Cre のレポーターマウス系統 Rosa26GRR を用いて、Cre mRNA を同時に注入することにより、操作した割球と操作していない割球に由来する細胞がそれぞれ赤色と緑色の蛍光で標識されるようにした。コントロール実験として EGFP に対する dsRNA と Cre mRNA を注入した。操作胚を後期胚盤胞期まで培養し、SOX2 抗体により免疫蛍光染色しエピプラスト細胞を可視化した。コントロール胚では、操作した割球に由来する赤い細胞は胚全体に存在しており、エピプラストの細胞すべてが操作した細胞になった胚は約 15%であった。一方、TEAD4, GATA6 の機能抑制胚ではエピプラストの細胞すべてが操作した細胞になった胚は約 30%であった。操作胚ではエピプラストにおける操作細胞の割合が増加していたが、その一方で、操作胚では細胞数が100未満で胚の大きさが小さい異常胚が多く、コントロール胚では80%が正常に発生していたのに対して、操作胚では正常発生をしていた胚は44%しかなかった。このことから、2割球期における TEAD4 と GATA6 の機能抑制は不十分であると考えられた。

(2) 4細胞期胚における PARD6B と GATA6 のノックダウン実験

2細胞期胚への操作では操作細胞のエピプラストへの貢献率が低いことと細胞数の少ない異常胚の割合が多いという問題があった。これらの問題が生じる原因として TEAD4 の機能抑制細胞

胞の多くが最初の細胞分化の時期にも胚の外側に存在し続け、胚盤胞期に栄養外胚葉に分化できずに死んでしまい、栄養外胚葉の細胞数が減ってしまうことが原因であると考えられた。そこで、この問題を解決するために TEAD4 の上流で栄養外胚葉への分化を制御している PAR-aPKC システムに注目し、その構成因子の PARD6B のノックダウンを行うことにした(図4)。この操作により、極性を持たない操作割球由来の細胞は胚の内側に入って内部細胞塊へと分化することが期待される。また、栄養外胚葉に十分な細胞数を確保するために、4細胞期胚の1つの割球だけに操作をすることで、内部細胞塊になる細胞の割合を減らし、残りの3つの割球に由来する細胞が栄養外胚葉に分化できるようにした。また GATA6 の機能抑制により4細胞来胚の1割球に Pard6b の siRNA と Gata6 の dsRNA、Cre mRNA を顕微注入し、後期胚盤胞期まで培養して SOX2 の蛍光免疫染色によりエピプラスト細胞を識別して解析した。コントロールとして、標的を持たない siRNA と EGFP に対する dsRNA、Cre mRNA を顕微注入した。

コントロール胚では、操作割球由来の赤い細胞が胚全体に分布しており、エピプラスト全体が操作した細胞でできている胚は全体の2%しかなかった。一方で、PARD6B と GATA6 のノックダウン胚では、赤い細胞はほとんどエピプラストのみに存在しており、エピプラスト全体が操作した細胞に由来する胚は、正常な発生を示した胚のうち75%であった(図5)。コントロール胚と操作胚とで、胚全体の細胞数に有意差は見られなかった。エピプラストの細胞数は、操作胚で平均値が1割程度増加し、分散も増大していたが、この方法により操作した割球を効率よくエピプラストに分化させる方法が確立できたといえる。

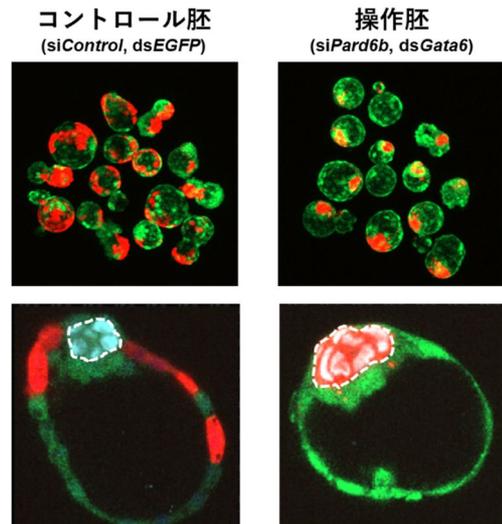


図5. 遺伝子操作によるエピプラストへの分化

(3) in vitro と in vivo の細胞分化の違い

4細胞期で(2)の操作を行った胚が、実際に着床後に操作した割球に由来する細胞のみからなる胚になるかどうかを確認するために、操作した胚を8細胞期に輸卵管に移植して着床後の10.5日で解剖して解析したところ、操作割球に由来する赤い細胞のみからなる胚を得ることはできなかった。この原因を調べるために、4細胞期に操作した胚を、半分は in vitro で培養し、残り半分は8細胞期に輸卵管に移植して in vivo で3日間発生させて後期胚盤胞で回収した。その結果、in vitro で培養した胚はエピプラストが操作割球由来の細胞のみになっていたものが54%存在したのに対して、in vivo で発生させた胚ではエピプラストが操作割球由来の細胞のみからなる胚は存在しなかった。理由は不明であるが、in vivo では遺伝子ノックダウンによる細胞分化の制御が不十分になることが分かった。

(4) 着床後胚の解析

上記の結果を踏まえて、4細胞期胚の1割球に siPard6b, dsGata6, Cre mRNA を顕微注入した胚を、in vitro で初期胚盤胞まで発生させた後で子宮に移植し、胎生10.5日の胚を回収して解析した(図5)。その結果、胚の発生率は約80%であり、そのうち、胚全体が操作割球由来の赤い細胞のみからなるものが43%であった。胚對外組織の卵黄嚢や胎盤にはエピプラストに由来する臍側中胚葉や臍帯由来の血管が入っており、それらの部分には赤い細胞がみられた。

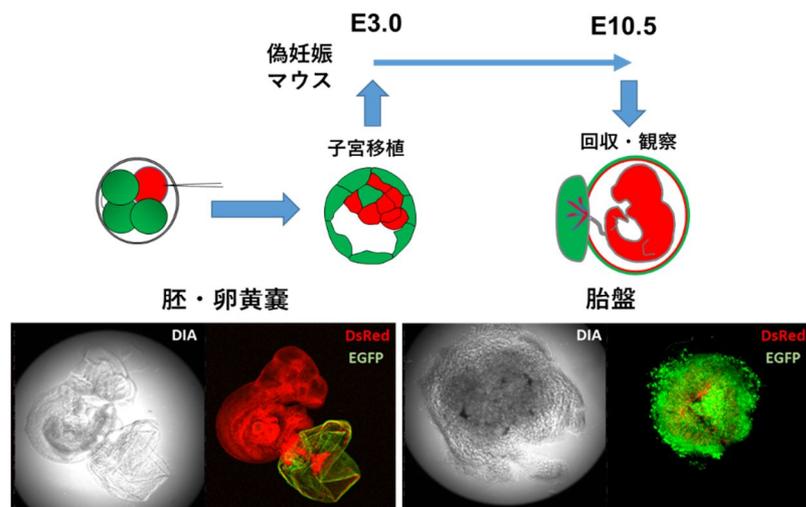


図5. 遺伝子操作による操作割球の胚への分化

(5) 結論と考察

本研究において、4細胞期胚の1つの割球に PARD6B と GATA6 の機能阻害を行うことにより、その割球をエピプラストへと分化させ、操作した割球のみからなる胚を効率よく作成できることが明らかになった。今後は、この胚操作を CRISPR/Cas9 による効率の良いゲノム編集と組み合わせることにより、胚特異的な遺伝子破壊マウスを簡便に効率よく作成し、胚体における遺伝子機能の解析を行うことができると考えられる。

<引用文献>

- Sunagawa GA, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Perrin D, Fujishima H, Ukai H, Nishimura O, Shi S, Ohno R-I, Narumi R, Shimizu Y, Tone D, Ode KL, Kuraku S, Ueda HR. Mammalian reverse genetics without crossing reveals Nr3a as a short-sleeper gene. *Cell Reports* 14(3) 662-677, 2016.
- Perez-Garcia V, Fineberg E, Wilson R, Murray A, Mazzeo CI, et al. Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. *Nature* 555, 463-468, 2018.
- Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, Nakao K, Sasaki H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev.* 125, 270–283, 2008.
- Nishioka N, Inoue K-I, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki EM, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, Sasaki H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* 16, 398–410, 2009.
- Hirate Y, Cockburn K, Rossant J, Sasaki H. Tead4 is constitutively nuclear, while nuclear vs. cytoplasmic Yap distribution is regulated in preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: E3389–90, 2012.
- Hirate Y, Hirahara S, Inoue K-i, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H. Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 23, 1181–1194, 2013.
- Hashimoto M, Sasaki H. Epiblast formation by TEAD-YAP-dependent expression of pluripotency factors and competitive elimination of unspecified cells. *Dev Cell* 50:139–154.e5, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hashimoto M, Sasaki H.	4. 巻 67
2. 論文標題 Cell competition controls differentiation in mouse embryos and stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Opin Cell Biol	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceb.2020.07.001.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増井大介、橋本昌和、佐々木洋
2. 発表標題 Development of a method for rapid production of embryo specific mutant mice
3. 学会等名 日本発生生物学会第55回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------