

機関番号：63904

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370088

研究課題名 (和文) ライブイメージングによるマウス体軸形成機構の解析

研究課題名 (英文) Live imaging analysis of axis formation in mouse embryo

研究代表者

藤森 俊彦 (FUJIMORI TOSHIHIKO)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授

研究者番号：80301274

研究成果の概要 (和文)：

本研究においてはライブイメージング観察を第一の方法とし、マウス胚の受精卵から体軸が明確になるまでのステージについての包括的な理解を目指した。核だけでなく、細胞膜、初期胚の前側を蛍光タンパク質で標識するマウスを準備し、受精から体軸形成の時期までの観察方法を開発した。特に細胞の分裂、移動といった細胞の挙動を着床前胚、着床後胚において連続観察を可能とした。

研究成果の概要 (英文)：

The aim of this project was to understand early events during early mouse embryonic development, from fertilization to formation of initial axis, by the continuous imaging of developing animals. In addition to a transgenic mouse line to visualize nuclei by fluorescent proteins, lines to visualize cell membrane, and future anterior region during initial axis formation were established. Techniques to observe embryonic development throughout early stages from fertilization to axis formation have been developed. With this combination, cell behavior including cell division and migration were analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	16,000,000	4,800,000	20,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：マウス、軸形成、イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生物学の面白さは時間ともなう生き物の変化を知ることであり、発生生物学における醍醐味は時間ともなう生み出される多種類の細胞の配置と、胚の形態の変化である。申請者はマウス初期胚において細胞系譜解析を主なアプローチとして胚軸の形成について考えてきた。ほ乳類の受精卵には将来

の胚軸に関連する形態や分子の偏りが見られないが、マウスでは受精後 6.5 日目には前後、背腹軸を形態的に見ることができる。ほぼ対称な状態から非対称性を生み出し、胚の軸を形成する最初のイベントが何であるかを同定したいと考えている。また、ほ乳類胚が調節能に非常に富んでいることは周知の事実であるが、外から攪乱されていない正常

発生においてどのようなプログラムに従って形作りが進められるかを知りたいと考えた。

カエルなどでは、第一卵割面が将来の正中線に対応し、割球が体の左右それぞれに寄与する。では、ほ乳類ではどうだろうか？キメラマウスなどから考えると同様ではないことが想像されるが、正常発生を調べた。Cre-LoxP システムを応用した細胞の不可逆的標識によって、マウス胚における2細胞期から8.5日目までの細胞系譜解析を進めたところ、マウス胚では4細胞期までの細胞系譜と将来の体軸との関連が無いこと、胚の中で細胞をダイナミックに混ざり合わすメカニズムが存在することが示唆された。4細胞期からの標識では、胚自身と胚体外組織への寄与の違いが4つの割球間で現れる可能性を示唆する結果であった。(Development, 2003)。そこでこの可能性の検証も含めて、着床前の胚盤胞に至るまでの3.5日間について更に詳細に検討した。胚の中のすべての細胞を連続して観察するために、GFPによって染色体を標識したマウス(R26H2BEGFP)を作製し、その胚を *in vitro* で培養して連続的に3次元画像を取得するシステムを開発した。取得した画像を利用して、胚盤胞から時間を遡るようにすべての細胞の挙動を追跡し、細胞系譜を解析した。胚盤胞において将来体自身に寄与する細胞群(内部細胞塊、ICM)は偏って存在しており、ICMのある側(Embryonic 領域)とその反対側(Ab-embryonic 領域)を通る軸(E-Ab 軸)と細胞系譜系譜との関係を調べた。その結果、E-Ab 軸の形成は初期の細胞系譜に依存していないことが明らかになった。タイムラプス像を詳しく解析した所、胚を取り囲む透明帯が球ではなく3次元的に歪んでおり、E-Ab 軸はそれに沿うように形成されることが明らかになった (Science, 2007)。

これらの実験の経験から、胚発生を顕微鏡下で再現し、胚の中での細胞の形、分裂様式、分布などを連続的なイメージとして捉えることが、胚発生を考える上で非常に重要な方法の一つであることを実感した。これまでに蓄積されている固定サンプルから得られた情報を断片としてではなく、それらを連続的に理解する上でも重要である。

ヒトを含むほ乳類の発生は母親の卵管、子宮の中で進む為他の動物と異なって、連続的にその発生を観察することは極めて難しい。また、胚発生に必要な栄養分を卵黄などとして蓄える訳ではなく、胎盤を通して母親からの栄養が供給され、その結果として胚のサイズが大きく変わるという特殊性を持つ。その意味で、これまでに研究が進められてきた他の動物と異なるシステムを発生に利用している可能性が高く、発生学一般としても興味

深い対象である。

子宮内での着床後の胚を連続して観察するためには、子宮内の胚を何らかの方法によって観察するか、あるいは子宮外で人工的に発生を再現しそれを観察するかのいずれかしか方法がない。現状においては、子宮外から超音波顕微鏡で観察する方法があるが、こちらは解像力が10マイクロメートル以上とかなり悪い。また子宮内に挿入するタイプの顕微鏡は依然開発途上である。そこで、子宮外で発生を再現することになる。これまでに、器官形成の見られる後期の胚については全胚培養の系が開発されているが、同様の技術を着床直後の初期に応用することは胚の性質上不可能である。過去に胚盤胞からの培養を開始し、数日間の発生を再現した報告があるが、依然正常に発生させられる効率が大変悪い。

## 2. 研究の目的

本研究においてはライブイメージング観察を第一の方法とし、この観察によって得られる知見を他の方法で検証するアプローチにより、マウス胚の受精卵から体軸が明確になるまでのステージについての包括的な理解を目指す。本研究では、発生を *in vitro* で再現する培養技術、ダメージ無くそれを観察する技術に更に磨きをかける。単に明視野観察だけでは、それぞれの細胞の状態がよくわからないため、これに加えて幾つかの可視化用のトランスジェニックマウスの作製を進め、対象となるステージを着床から前後軸の形成までに絞り、達成目標へ向けて研究を進める。これによって、胚盤胞から前後軸の形成までのステージにおいて、細胞の分化様式、細胞の形と極性の形成機構、体軸の成立過程の現象について包括的な理解を深める。

マウスの体軸で、最初に能動的に決められる軸は前後(頭尾)軸である。形態的には、受精後6.5日目に後ろ側で原腸陥入が開始するのが明確になる。これまでの研究で、それより前の5.5日目に、臓側内胚葉(VE)の一部が移動を開始し、移動した先が将来の前側になることが知られている。また、この前側臓側内胚葉(AVE)で発現する遺伝子が幾つか同定されている。しかし、AVEの移動前に胚の中で前側がすでに決まっていたりそちらへ向かって移動するのか、あるいはランダムな向きにAVEが移動を開始しそれがトリガーとなって前側が決まるのかは未だ不明である。5.5日目以前に、将来の体軸と関連して決定的な意味のある発現が見られる遺伝子はまだ知られていない。AVEで発現が見られる遺伝子のうち、最も解析が進んでいると考えられる *Lefty1* は、胚盤胞の中で偏って存在する可能性が示唆されているが、将来の前後軸との関連に関しては依然不明である。ま

た、胚盤胞は完全な球ではなく、ゆがんだ形をしていること、着床直前の時期には、胚盤胞の中で ICM が少し角度を持って存在することが知られているが、それらとの関係と将来の前後軸との関係は未解明である。そこで前後軸の形成を解明するために、特定の遺伝子の解明から進むのではなく、細胞の形態や、増殖、移動といった細胞の挙動を解析することによって得られるグローバルな情報から理解を進める。

本研究は、ようやく個体での解析における実用化が進みつつあるライブイメージング技術を積極的に取り入れることで、比較的古くから残されている発生生物学の問題に対して正面からアプローチする事が最大の特徴である。得られる情報は膨大であることが予想されるが、これまでの経験なども生かし、観察用レポーターマウスの充実、培養技術の開発、画像取得・画像処理の自動化を含め技術的な開発と生物学の基本問題の解決を融合的に広げる点に独自性を見いだすことができる。分化マーカーの発現や、変異マウスの解析ではそれぞれの現象に関わる遺伝子や分子が明らかにされたが、実際の細胞の機能の具現化という点でこれらの分子群が細胞の機能にどのように影響し、どのようなメカニズムによって胚発生が進むかと言う点が依然として不明瞭であり、その問題に切り込むことができると期待している。また、本研究で用いる一群のレポーターマウスは申請者自身の興味の対象である初期発生の解析に限らず、広くライブイメージングに利用してもらうことが可能である。また、イメージング技術に関しても、今後他の領域にも応用されることが期待できる。

### 3. 研究の方法

マウスの胚盤胞から前後軸の形成までの段階で、細胞の分化様式、細胞の形と極性の形成機構、体軸の成立過程の現象について *in vitro* でのライブイメージングを主なアプローチとする細胞の振る舞いの解析により包括的な理解を深めることを研究目的にする。この目的を達成するために、以下の項目の実験を行った。

- (1) 胚盤胞以降のステージの培養法の確立
- (2) AVE で Venus を特異的に発現するマウスの開発
- (3) 核を可視化した胚のイメージングによる細胞の分裂、移動パターンの解析
- (4) 細胞膜を可視化した胚を使ってのイメージングによる細胞の形の解析
- (5) 胚盤胞の形と将来の胚軸の関係の解析
- (6) 胚の軸と関連する細胞の振る舞いの解析
- (7) 既存の軸形成異常を持つ変異体を使って、細胞の振る舞いを解析

### 4. 研究成果

上記の研究の方法に従って研究を進めた。

(1) 胚盤胞以降のステージの培養法の確立  
本項目については、研究期間中を通じて繰り返し実験を行った。受精後 3 日目の胚盤胞を子宮から回収し、ただちに培養を開始した。培養条件としては、基本となる培養液、血清（牛、ラット、胚抽出液等）の種類と濃度を変更し、更に培養に用いる基質（コラーゲン等）を検定した。まずは、発生する胚の形態を指標に培養条件の最適化をはかることを進めた。培養後 3 日～5 日後に形態を確認し、培養液中で確認して比較的良いと思われるものについては、パラフィン切片を作製、HE 染色で確認を行った。糖分の濃度の比較的高い通常の培養細胞に用いる培地を用いた場合は、特に胚胎外外胚葉の領域が巨大化し Epiblast の上皮構造が上手く出来なかったが、培養条件を改善することにより、Epiblast の上皮構造がみられるようになり、胚体外外胚葉との比も比較的良好になった。しかしながら依然として、成功率が低いため、更に改善を進める必要がある。

(2) AVE で Venus を特異的に発現するマウスの開発

AVE を可視化するために、AVE で特異的に発現する遺伝子の一つである *Cer1* のプロモーターに蛍光タンパク質 Venus の cDNA をつないだ発現プラスミドを用いてトランスジェニックマウスを作製した。複数とれたトランスジェニックマウスラインを、AVE の移動した 6 日目に調べた結果、移動した AVE の領域で強い蛍光が見られるラインが得られた。このトランスジェニックマウスラインを維持し、以降の実験にも用いた。

(3) 核を可視化した胚のイメージングによる細胞の分裂、移動パターンの解析

既に作製している全ての細胞の核が GFP で標識されるマウス (R26H2BEGFP) を用いて、5 日目前後の培養を行った。コンフォーカル顕微鏡上のインキュベータ内で約 24 時間に渡り安定した培養が可能となり、細胞の分裂、移動のパターンを解析した。その結果、細胞分裂が時間・空間的にある程度同調してみられることが判明した。現在この解析を更に進める為に画像からの核の抽出、位置の測定を自動化することを目標として共同研究をスタートした。

(4) 細胞膜を可視化した胚を使ってのイメージングによる細胞の形の解析

細胞膜を可視化するために、Lyn の膜移行シグナルと融合した蛍光タンパク質 Venus を発現するマウスを作製した。このマウスを用いて、タイムラプス撮影を行った。着床前胚を用いて長期間撮影を行うと、H2BEGFP マウスに比較して SN 比が悪く、長時間の撮影に

より褪色することや、蛍光タンパク質が凝集することが見られた。この結果に対応するために、励起光のエネルギーをより下げることが試された。その結果画像としては劣るが、蛍光タンパク質の細胞内での局在は改善された。この画像を用いて、胚盤胞に至る時期の細胞の挙動を解析した。コンパクト以降胚の中で内側に存在する細胞が ICM, 外側に存在する細胞が TE へと分化することが提唱されているが、実際の胚の中での細胞の位置と将来の運命の関係を直接見た例はない。そこで細胞形態の連続観察を行った。その結果、内側の細胞が現れるのは 13 細胞期頃からであった。また 16 細胞期には外側に面していた細胞が内側に入り込む現象が観察された。

本研究によって開発した LynVenus, アクチンを可視化するための VenusActin, Venus mosein actin binding site (VMA) マウスについては、論文未発表であるが、既に共同研究の材料として他の研究者に供与しており、初期発生研究以外でも利用が開始された。

#### (5) 胚盤胞の形と将来の胚軸の関係の解析

本課題に関しては、直接的なデータを得られなかった。

#### (6) 胚の軸と関連する細胞の振る舞いの解析

Cer1-Venus のマウスを用いて、明視野観察と平行して、将来の体軸形成と細胞の振る舞いに関する解析を開始している。5 日目胚を回収後ただちに培養を開始し、同時にタイムラプス観察を行っている。現時点では、既に報告されている Cer1 発現細胞の移動は見えているが、それ以外にグローバルな細胞の挙動について新しい知見を得るに至っていない。

#### (7) 既存の軸形成異常を持つ変異体を使って、細胞の振る舞いを解析

野生型マウスを用いた細胞の一般的な挙動の解析システムの構築が不十分であるため、変異体の解析まで進むことが出来なかった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件) 全て査読あり

- ① Shi, D., Komatsu, K., Uemura, T., Fujimori, T., Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes to Cells*, 16, 282-90, (2011)
- ② Nakagawa, T., Izumino, K., Ishii, Y., Oya, T., Hamashima, T., Jie, S., Tomoda, F., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Inoue, H., Sasahara, M., Roles of PDGF receptor-beta in the structure and function of postnatal

kidney glomerulus. *Nephrol Dial Transplant*. 26, 458-68 (2011)

③ Toshihiko Fujimori, Preimplantation development of mouse: A view from cellular behavior. *Development, Growth & Differentiation* 52, 253-262, (2010)

④ Hitoshi Niwa, Toshihiko Fujimori, Stem cell systems in development of mammals. *Development, Growth & Differentiation* 52, 251-251, (2010)

⑤ Zheng, L., Ishii, Y., Tokunaga, A., Hamashima, T., Shen, J., Zhao, QL., Ishizawa, S., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Mori, H., Kondo, T., Sasahara, M., Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved. *J Neurosci. Res.*, 88, 1273-84, (2010)

⑥ Fadel Tissir, Yibo Qu, Mireille Montcouquiol, Libing Zhou, Kouji Komatsu, Dongbo Shi, Toshihiko Fujimori, Jason Labeau, Donatienne Tyteca, Pierre Courtoy, Yves Poumay, Tadashi Uemura, Andre M Goffinet. Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nature Neuroscience*, 13, 700-707, (2010)

⑦ Fujimori, T., Kurotaki, Y., Komatsu, K., Nabeshima, Y., Morphological organization of the mouse preimplantation embryo. *Reprod Sci.*, 16, 171-7, (2009)

Ishii, Y., Matsumoto, Y., Watanabe, R., Elmi, M., Fujimori, T., Nissen, J., Cao, Y., Nabeshima, Y., Sasahara, M., Funahashi, K., Characterization of neuroprogenitor cells expressing the PDGF beta-receptor within the subventricular zone of postnatal mice. *Mol Cell Neurosci*, 37, 507-18, (2008)

⑧ Tokunaga, A., Oya, T., Ishii, Y., Motomura, H., Nakamura, C., Ishizawa, S., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Umezawa, A., Kanamori, M., Kimura, T., Sasahara, M., PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res*, 23, 1519-28, (2008)

⑨ Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y. I., Noda, T., Tsukita, S., Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells. *Mol Biol Cell*, 19, 2465-2475, (2008)

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ① Kouji Komatsu, Toshihiko Fujimori  
Single cell level analysis of the changes of Nanog gene expression in living preimplantation mouse embryos. 第 16 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム, Dec. 1-2 2010, (Tokyo) (poster)
- ② 藤森俊彦, ほ乳類初期発生の理解に向けて求めるもの, 定量生物学の会第 3 回年会, Nov. 26-28 2010, (Tokyo) (poster)
- ③ 石東博, 小松紘司, 平尾真由美, 上村匡, 藤森俊彦, マウス卵管上皮における膜タンパク質の局在の極性定量化, 定量生物学の会第 3 回年会, Nov. 26-28 2010, (Tokyo) (poster)
- ④ Toshihiko Fujimori, Cellular behaviors in early mammalian embryonic development, 第 48 回日本生物物理学会年会, Sep. 20-22 2010 (Sendai)
- ⑤ 藤森俊彦, マウス初期胚における細胞と遺伝子の挙動の解析, 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, Sep. 4-5, 2010 (Tokyo) (invited)
- ⑥ Kouji Komatsu, Toshihiko Fujimori, Analysis of Nanog expression during blastocyst formation in mouse, 第 43 回日本発生生物学会年会 Jun. 20-23, 2010 (Kyoto) (poster)
- ⑦ Dongbo Shi, Kouji Komatsu, Tadashi Uemura, Toshihiko Fujimori, Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in mouse oviduct, 第 43 回日本発生生物学会年会, Jun. 20-23, 2010 (Kyoto) (poster)
- ⑧ 藤森俊彦, 新たに広がる哺乳類初期発生研究の可能性, 第 62 回日本細胞生物学会大会 May 19-21 2010 (Osaka)
- ⑨ Toshihiko Fujimori, Behaviors of Cell and Gene Expression during the Preimplantation Mouse Embryo, The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology, May 8-12, 2010 (Beijing, China) (invited)
- ⑩ Dongbo Shi, Kouji Komatsu, Tadashi Uemura, Toshihiko Fujimori, Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport activity in mouse oviduct. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology, May 8-12 2010 (Beijing, China) (poster)
- ⑪ 藤森俊彦, マウス初期発生研究における定量化, 定量生物学の会 第 2 回年会, Jan. 9-11 2010 (Osaka) (poster)
- ⑫ 藤森俊彦, マウス初期胚のライブイメージング, 奈良先端科学技術大学院大学シンポジウム「視る生物学 4」, Nov. 24-25 2009 (Nara) (invited)
- ⑬ Toshihiko Fujimori, Cell divisions

relating to the morphogenesis of the early mouse embryo, マウス初期発生における細胞の分裂と形態形成, 第 82 回日本生化学会大会, Oct. 21-24 2009 (Kobe) (invited)

⑬ Toshihiko Fujimori, Cell behaviors and the differentiation of cells during preimplantation mouse development. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 28-31 2009 (Niigata, Japan) (invited)

⑭ Toshihiko Fujimori, Analysis of Cell Behaviors in Early Mouse Development. 第 9 回 NIBB-EMBL Symposium, Apr. 20-22 2009 (Okazaki, Japan)

⑮ Toshihiko Fujimori, Analysis of cell behaviors during preimplantation mouse development. Keystone Symposia, "Frontiers in Reproductive Biology and Regulation of Fertility" Feb. 1-6 2009 (Santa Fe) (Invited)

⑯ Toshihiko Fujimori, Analysis of cell behaviors in early mouse embryos., San Francisco-Japan Joint Meeting on Vertebrate Organogenesis, Nov. 24-25, 2008 (San Francisco) (invited)

⑰ Toshihiko Fujimori, Analysis of cell behaviors in early mouse embryos. Joint Symposium: Vertebrate Development and Organogenesis, Nov. 20-21, 2008 (Houston) (invited)

⑱ Kouji Komatsu, Yo-ichi Nabeshima, Toshihiko Fujimori, The analysis of cell movement and expression of Oct4, Nanog and Cdx2 during mouse blastocyst formation. Joint meeting of the French and Japanese Society for Developmental Biology, Sep. 13-17 2008. (Giens peninsula, France) (poster)

⑲ Kouji Komatsu, Yo-ichi Nabeshima, Toshihiko Fujimori, The expression of Cdx2 changes according to the position of cells in mouse blastocyst formation. 第 41 回日本発生生物学会大会, 2008 年 5 月 28-30 日 (徳島) ポスター発表

⑳ 藤森俊彦, 胚の形作りと関連する局所的細胞周期, 日本分子生物学会第 31 回年会シンポジウム「細胞周期制御と高次生命現象」, 2008 (神戸) (招待講演)

〔図書〕 (計 3 件)

① 小松紘司, 藤森俊彦, ライブセルイメージングによる着床前胚発生研究, HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 18, No. 1, 13-18, (2011)

② 藤森俊彦, マウス初期胚における細胞分裂と発生, 細胞周期フロンティア, 共立出版 168-173, (2010)

③ 藤森俊彦, マウス着床前胚のライブイメー

ジング、実験医学 26, No.17, 2778-2783  
(2008)

〔その他〕

ホームページ等

アウトリーチ活動

①基礎生物学研究所一般公開、体作りの始まりー卵から体ができるまでー、Oct. 2, 2010(Okazaki)

②藤森俊彦、哺乳類初期発生の理解の為のライブイメージング、第9回自然科学研究機構シンポジウム、ビックリ4Dで見るサイエンスの革新、Mar. 21 2010 (Tokyo)

③ 藤森俊彦、基礎生物学研究所・生物学オリンピック選手合宿講義（発生学）「脊椎動物の発生」、Dec. 25, 2009.

④ 藤森俊彦、愛知県立岡崎高等学校スーパーサイエンスハイスクール出張講義、「哺乳類の体の形作りの始まり」Dec. 8, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤森 俊彦 (FUJIMORI TOSHIHIKO)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授

研究者番号：80301274