

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770176
 研究課題名 (和文) イメージング解析を用いたマウス着床前胚発生における細胞分化メカニ
 ズムの解明
 研究課題名 (英文) The imaging analysis of the mechanism of cell differentiation during
 mouse blastocyst formation
 研究代表者
 小松 紘司 (KOMATSU KOUJI)
 基礎生物学研究所 初期発生研究部門 特別協力研究員
 研究者番号：40456893

研究成果の概要 (和文)：マウスの胚盤胞では内部細胞塊において Oct3/4 (Oct4)、Nanog、栄
 養外胚葉では Cdx2 という転写因子が特異的に発現する。我々は、着床前胚発生過程における
 これらの分子マーカーの発現変化と細胞の位置関係を詳細に観察し、内部細胞塊と栄養外胚葉
 の細胞分化メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、Cdx2 の発現は細胞の位置による制
 御を受けている事が明らかになった。一方、Nanog の発現は、8～16 細胞期の間、細胞の
 位置に関係なくランダムに上昇し、16～32 細胞期には胚の外側よりも内側の細胞において
 発現が上昇する事が分かった。

研究成果の概要 (英文)： We analyzed the localization of Oct3/4 (Oct4), Nanog and Cdx2, which
 are expressed in ICM and TE respectively in the late blastocyst. relating to the precise position
 of cells within the embryo to study early steps of differentiation of cells. From results of this
 analysis, it was suggested that the initiation and the maintenance of Cdx2 expression is relating
 to the relative positions of cells in the embryo after 8-cell stage. On the other hand, Nanog
 expression was randomly upregulated regardless of cell position from 8-cell to early 16-cell
 stage, and the expression was preferentially upregulated in inner cells from late 16-cell to
 32-cell stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：細胞分化

1. 研究開始当初の背景

マウスの着床前胚では、受精からおよそ

3日程度で内部細胞塊 (inner cell mass; ICM) と栄養外胚葉 (trophectoderm; TE) と

いう性質の異なる細胞集団を形成し、その後の発生進行の基準となる胚側-非胚側軸が形成される。マウス着床前胚における ICM、TE 細胞への細胞分化に関しては、不明な点が多い。その理由としては

○ 両生類のような胚の実験的操作が困難である。

○ 8 細胞期に起こるコンパクションの影響で、通常の観察では個々の細胞の識別が難しい。

○ ICM、TE 細胞の細胞分化過程における明確な分子マーカーが確立されていない。等が挙げられる。特に、細胞間の接着が強まるコンパクション以降の桑実胚では胚中の細胞の識別が難しく、分子レベルの解析以前に「どのステージのどの細胞から ICM、TE 細胞への細胞分化が始まるのか」という基礎的な点において疑問点が多く残されている。そのため、着床前胚発生過程における細胞分化メカニズムに関して様々な説が提唱されており、未だ不明のままである。

2. 研究の目的

本研究ではイメージング技術を用いて細胞動態、分子マーカーの発現変化を連続的に観察する事により、マウス着床前胚における細胞分化メカニズムを解明することが目的である。これまでの研究成果から、着床前胚発生過程における ICM、TE 細胞の分化には細胞の位置情報が重要であると考えられている。そこで細胞の位置情報と ICM、TE の分子マーカーの発現を照らし合わせながら、観察する事によって、細胞分化メカニズムの起点を明らかにするための解析を行った。

3. 研究の方法

トランスジェニックマウスの着床前胚をタイムラプス撮影する前に、細胞膜を染色するファロイジン染色と Oct4、Nanog、Cdx2 の抗体染色を行い、細胞の位置関係と分化マーカーの発現に関する基礎的なデータの取得、解析を行った。その後、ヒストン H2B に EGFP を融合させる事により細胞核を可視できるトランスジェニックマウス、Src 型チロシンキナーゼ Lyn の膜移行シグナル配列と Venus の融合タンパク質遺伝子(Lyn-Venus) を Rosa26 遺伝子座に組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、細胞動態の観察を行った。分子マーカーに関しては、Nanog のプロモーターに GFP を結合したトランスジェニックマウスを用いて発現変化のタイムラプス観察を行った。

4. 研究成果

ファロイジンと Oct4、Nanog、Cdx2 の抗体染色の結果、Oct4 は胚盤胞形成後期まで全ての

細胞に発現し、胚盤胞後期以降、ICM のみで発現する事が分かった。Cdx2 は 8 細胞期から発現し始め、16 細胞までは inner cell (周囲を細胞に囲まれ、胚の外側の環境に接点をもたない細胞、ICM を形成すると考えられている) で微弱な発現が見られる個体もあるが、大部分の個体は発生進行に伴って outer cell (胚の外の環境に接する面をもつ細胞、TE を形成すると考えられている) のみで発現が上昇する事が分かった (図 1)。Nanog に関しては Oct4、Cdx2 と異なり、発現する細胞は胚中の位置に関係なく、inner cell、outer cell 共に発現し、各細胞における発現の有無、強弱に関しては顕著な傾向は見られなかった (図 2)。以上の結果から、Cdx2 に関しては胚盤胞形成過程で細胞の位置情報が、その発現制御に重要な役割を果たしている事が明らかになった。

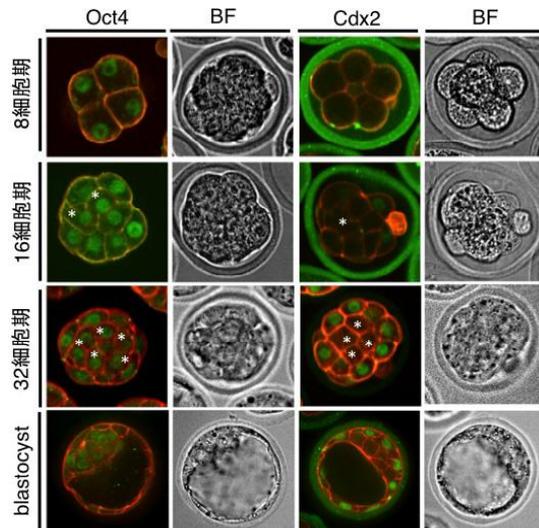


図 1 抗 Oct4、Cdx2 抗体による着床前胚染色画像

Oct4 は胚盤胞 (blastocyst) 形成段階まで全ての細胞で発現している。一方、Cdx2 は 16 細胞期以降、outer cell のみで発現している様子が分かる。赤：ファロイジン、緑：Oct4、Cdx2
BF：明視野画像、*：inner cell

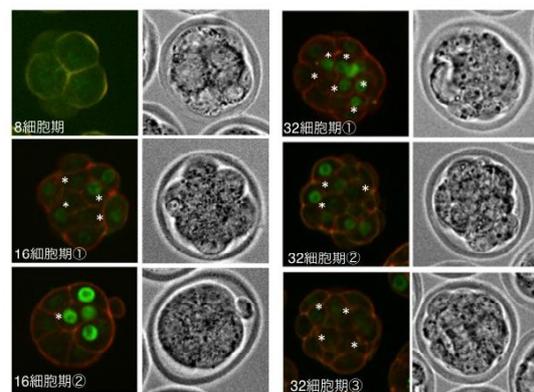


図 2 抗 Nanog 抗体による着床前胚染色画像

Nanog は 8 細胞期以降、発現し始めるが胚発生過程では発現パターンに特徴は無く、個体によって(①-③)は別個体)多様な発現パターンを示す。右は明視野画像。赤：ファロイジン、緑：Nanog、*：inner cell

Oct4, Cdx2 に関しては、抗体染色の結果から胚盤胞形成過程での発現変化の推測は可能であるが、Nanog に関しては個体によって発現パターンが異なる事から、解析には発現変化の連続的な観察が必要である。そこで、Nanog プロモーターに GFP を結合したトランスジェニックマウス (以下、Nanog-GFP マウスと略す) を用いて発生過程における発現変化をタイムラプス撮影した。そのタイムラプス画像から GFP の発現強度を測定し、各細胞における GFP の発現変化を解析した。その結果、Nanog は 16 細胞期までは細胞の位置に関係なく発現変化するが、32 細胞期以降では inner cell において outer cell よりも発現の上昇度が高くなる傾向にある事が分かった (図 3)。

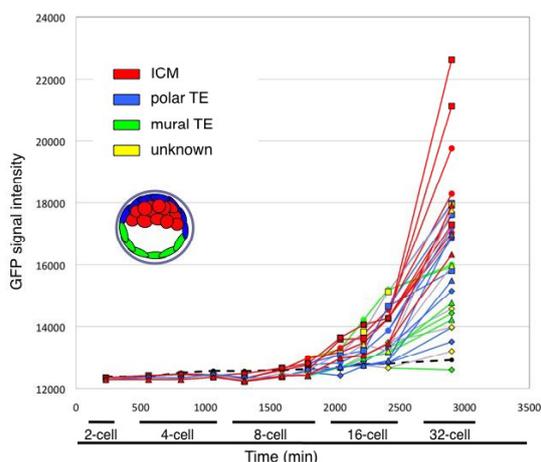


図 3 Nanog-GFP マウスのタイムラプス画像から GFP の強度を測定したグラフ

2 細胞期から 32 細胞期間の Nanog-GFP の発現変化を解析した。32 細胞期の段階で胚の内側 (ICM) に位置する細胞を赤、外側は青、緑、画像から細胞の位置の区別が困難であるものは黄色で示している。16 細胞期までは細胞の位置情報による発現変化の特徴は見られないが、16~32 細胞期は ICM の位置に存在する細胞において Nanog の発現上昇度が大きくなる。

通常、胚盤胞では TE 細胞には Cdx2 が発現し、Nanog は発現していないが、Cdx2 のノックアウトマウスでは、胚盤胞の段階で、全ての TE 細胞が Nanog を発現するようになる。この結果から、TE 細胞では Cdx2 が Nanog の発現を抑制する機能がある事が分かっている。8~16 細胞期の間は outer cell において

Nanog、Cdx2 両者を発現している細胞が存在している事から、この時期では Cdx2 の Nanog 抑制作用は働いていないと考えられる。一方、16~32 細胞期では Cdx2 が発現していない inner cell で Nanog の発現が大きく上昇し、Cdx2 が発現している outer cell の上昇度は低い (図 3)。この結果から、16 細胞期以降の段階から Nanog の発現は細胞の位置情報の影響を受けるか、もしくは Cdx2 の抑制作用が働き始める可能性が考えられる。この結果から、Nanog の発現制御は 16~32 細胞期を境界として変化している可能性が示唆される。Lyn-Venus トランスジェニックマウスを用いた細胞動態の観察結果からも、16~32 細胞期の間で細胞動態の様式に違いがある可能性を示すデータを得ている。以上の結果から、着床前胚発生過程において 16~32 細胞期は ICM、TE への細胞分化において重要な時期である事が示唆される。今後は、今回のデータを元に 16~32 細胞期を中心に、より詳細な細胞系譜トレースを行い、ICM、TE 細胞の起源を明らかにする事が、細胞分化メカニズムの解明には必要がある。

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 3 件、全て査読有り)

- ① Fadel Tissir, Yibo Qu, Mireille Montcouquiol, Libing Zhou, Kouji Komatsu, Dongbo Shi, Toshihiko Fujimori, Jason Labeau, Donatienne Tyteca, PierreCourtroy, Yves Poumay, Tadashi Uemura, AndreGoffinet
Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus
Nature Neuroscience, 13:700-707, 2010
- ② Toshihiko Fujimori, Yoko Kurotaki, Kouji Komatsu, Yo-ichi Nabeshima
Morphological organization of the mouse preimplantation embryo
Reproductive Science 16 (2): 171-177, 2009
- ③ Shuji Wakatsuki, Norihiro Yumoto, Koji Komatsu, Toshiyuki Araki, Atsuko Sehara-Fujiwasa
Roles of meltrin-beta / ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration
Journal of Biological Chemistry 284 (5): 1957-1966, 2009

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kouji Komatsu, Yo-ichi Nabeshima,

Toshihiko Fujimori

“The analysis of cell movement and expression of Oct4, Nanog and Cdx2 during mouse blastocyst formation”

Frontiers in Developmental Biology (Giens(France)) 2008年9月14日

② 小松紘司、鍋島陽一、藤森俊彦

“The expression of Cdx2 change according to the position of cells in mouse blastocyst”

第41回日本発生生物学会（徳島市）
2008年5月28日

6. 研究組織

研究代表者

小松 紘司 (KOMATSU KOUJI)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・

特別協力研究員

研究者番号：40456893