

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19270

研究課題名（和文）原腸陥入を開始させる少数細胞の同定と解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the cell initiating gastrulation process.

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：原腸陥入を開始させる細胞を同定するために、原腸陥入が開始される6日目胚のエピブラストの細胞を可視化し、その挙動をライブイメージングで観察することをおこなった。ライブイメージングによって、個々の細胞の挙動を区別して追跡することが可能となった。この手法によって、原腸陥入時にエピブラスト層から、中内胚葉層へ移動する最初の細胞を捉えることができた。さらに光刺激によってその細胞を標識することに成功した。標識した細胞を単離して、他の細胞と異なる遺伝子発現がないか解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初期胚発生には、体軸（前後軸・左右軸など）の決定や原腸陥入など「対称性の破れ」となる局面が多く存在する。いずれもが「わずかな数細胞の変化」が「大多数の細胞の変化」を引き起こす現象である。原腸陥入に関するこれまでの研究の多くは、後者の大多数の細胞の変化（移動）についてであり、その結果、原腸陥入する細胞に共通した仕組みが明らかになりつつある。一方で、それらを引き起こす最初の細胞に注目した例はほとんどない。

そこで本研究では、原腸陥入する最初の細胞を研究対象として、それに続く細胞との違いを明らかにする。本研究は、「わずかな数細胞」によって主導される生命現象を理解するための研究モデルとなる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I tried to identify a cell that initiates gastrulation. I visualized cells in the epiblast of day 6 embryos at the onset of gastrulation and observed their behavior using live imaging. I succeeded in distinguishing and tracking the behavior of individual cells. This approach allowed us to identify the first cells migrating from the epiblast layer to the mesendoderm layer at the time of gastrulation. Furthermore, we succeeded in labeling the cells with PA-mCherry, which expresses fluorescence upon light stimulation. The labeled cells (assumed to be the leader cells) are now being isolated and analyzed for gene expression that differs from other 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

将来の体を構成する体細胞は、すべて胚発生初期の一層の多能性細胞集団(エピプラスト)に由来する。一層のエピプラストは、原腸陥入に伴う細胞移動によって複雑な三次元構造を作り出す。エピプラスト層から胚の内側に潜り込んだ細胞の一部は、体節中胚葉として将来の骨や筋肉を形成し、エピプラスト層に留まった細胞は神経系や表皮を形成する。このように原腸陥入は胚の形づくりのトリガーとなる重要なイベントであり、古くから精力的に研究がなされてきた。機能阻害や強制発現などの研究により、原腸陥入の細胞移動に関連する遺伝子群や、上皮から間葉へと細胞の形態変化に関連する遺伝子群などが数多く報告されている。

一方で、原腸陥入を開始させる細胞と、それに続く細胞集団がどのように異なるのかを明らかにした研究はない。エピプラストから胚の内側に潜り込む(原腸陥入する)予定中胚葉・内胚葉細胞は数多いが、その多くが先に移動した細胞に続いて移動するにすぎない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、原腸陥入開始時に基底膜に穴をあけ、あるいは基底膜の間隙を広げて、胚の内側に潜り込む最初の細胞(1~数細胞)を同定するとともに、他の予定中・内胚葉の集団との違いを明らかにする。さらに、「最初の細胞」を特徴付ける遺伝子の機能に介入することで、どういった仕組みで原腸陥入が開始されるのかを明らかにすることを目的とした。

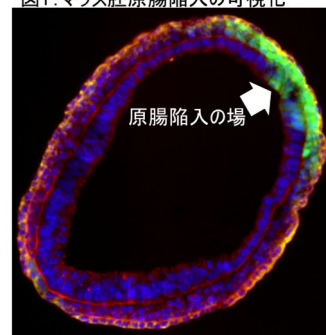
3. 研究の方法

本研究では、遺伝的操作が可能なマウス胚を用いて、原腸陥入する細胞や基底膜を可視化しつつ研究を進めた。マウス胚の原腸陥入は、円筒形をした2層の細胞層(内側=エピプラスト層、外側=近位内胚葉層)を出発点として、エピプラスト層の一部の細胞が裏打ちする基底膜層を破って、エピプラスト層と近位内胚葉層の間へ移動することで開始される(図1)。

原腸陥入を開始させる細胞の同定を行うことを目的として、マウス胚ライブイメージングを行った。Brachyury 遺伝子はエピプラストの一部の細胞で発現し、その細胞が将来原腸陥入することが知られている。そこでゲノム編集技術を用いて、EGFP 遺伝子を Brachyury 遺伝子座にノックインすることで原腸陥入する細胞を可視化できる Brachyury-EGFP マウスを作製して、EGFP 発現細胞の動向を観察した。並行してエピプラストの個々の細胞を異なる蛍光タンパク質で可視化できるマウスを活用して、原腸陥入時の細胞移動を解析した。具体的には、Cre の作用によって3つの異なる蛍光のいずれかが発現する R26-MGK マウスを用いた。

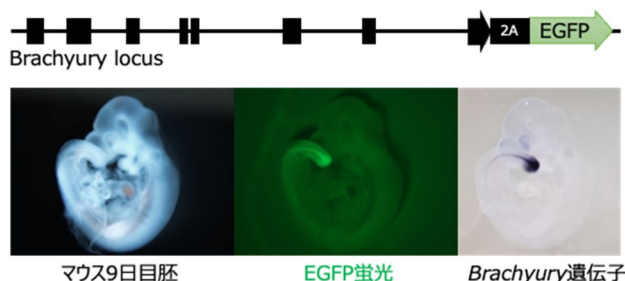
原腸陥入前の6日目マウス胚を顕微鏡下で培養して、共焦点顕微鏡を用いて、細胞の動向を観察した。観察された原腸陥入の「最初の細胞」であろう細胞を、Photoactivatable (PA)-mCherry を用いて標識したのちに細胞を採取して、遺伝子発現解析をおこなった。

図1: マウス胚原腸陥入の可視化



原腸陥入の場では基底膜がなく、内側のエピプラスト細胞が外側へと移動する。緑: 予定中胚葉細胞 (Brachyury-EGFP) 赤: 基底膜 (Nidgen1-mCherry) 青: 核

図2: Brachyury遺伝子発現の可視化



4. 研究成果

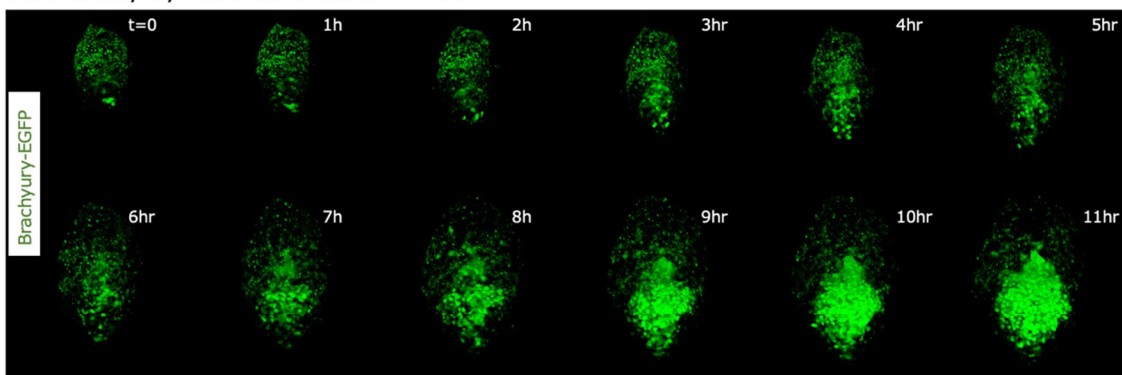
(1) Brachyury-EGFP マウス系統の樹立
Brachyury タンパク質のC末端に蛍光タンパク質 EGFP が融合するように EGFP 遺伝子をノックインしたマウス系統を作出した。樹立したマウス系統は、内在の Brachyury 遺伝子の発現と同じ領域で EGFP を発現していることを確認した(図2)。

(2) Brachyury-EGFP マウス系統の樹立

樹立した Brachyury-EGFP マウスを用いて、原腸陥入が起こる6日目胚を観察した。Brachyury は、将来原条を通過して中胚葉へと分化するエピプラスト細胞で発現が開始されることが報告されており、Brachyury-EGFP マウスにおいてその細胞集団で EGFP 発現が観察された。そこで、共焦点顕微鏡および2光子顕微鏡下で胚培養を行いながら、細胞の移動を解析した(図2)。しかしながら、EGFP の発現が弱く、はっきりとした細胞観察には強い励起光を照射する必要があることが判明したが、一方で強い励起光を照射すると胚および細胞に光毒性が現れてしまうことがわかった。この観察から、胚本来の細胞移動を計測するこ

とは困難であると考えて、より弱い励起光でも蛍光が観察できる R26-MGK システムを使う研究(3)を行うこととした。

図3: Brachyury-EGFPマウス胚のライブイメージング

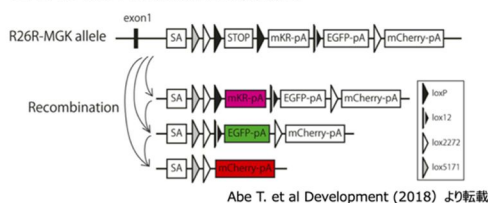


6日目マウス胚の観察：原条領域の腹側から観察。t=0で観察される数細胞が、発生に伴って、腹側側方へ移動する。追従する細胞群も蛍光タンパク質を発現して移動、中胚葉を構成する。

(3) R26R-MGK マウスシステムを用いた細胞追跡

R26R-MGK は、Cre の作用によって 3 つの蛍光 (mKeima, EGFP, mCherry) のいずれかが発現するマウス系統であり、Abe らによって作製された(図4)。E6 における細胞を標識して、追跡を行うため、EIIa-Cre マウスと交配させて、エピプラストのすべての細胞を蛍光標識した。得られたマウス胚を、ゲルに埋めた状態で培養して、ライブイメージングを行った。

図4: R26R-MGKシステムの概略図

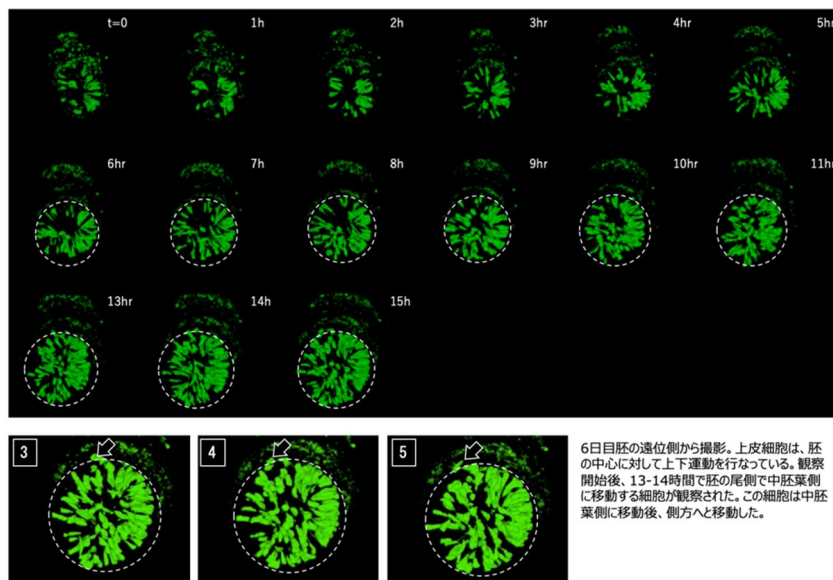


Abe T. et al Development (2018) より転載

このマウス胚では、Rosa26 遺伝子制御によって蛍光タンパク質が強く発現するため、課題となっていた光毒性を抑えながらの観察が可能であった。

原腸陥入前のエピプラスト細胞は、円筒形に配置されており、その核が、基底膜側(外側)とアピカル側(内側)との間をエレベーター運動しているように観察された。一定時間経過したのちに、胚の尾側において、より外側の中胚葉層と推定される領域に移動する細胞が観察された。この細胞は、エレベーター運動の向きとは直角に移動することが観察された。この細胞を原腸陥入の「最初の細胞」と考え、PA-mCherry を用いた細胞標識を行い、単離することを行った。

図5: 全細胞多色可視化 (R26-MGK x EIIa-Cre) のライブイメージング



6日目胚の遠位側から撮影。上皮細胞は、胚の中心に対して上下運動を行なっている。観察開始後、13-14時間で胚の尾側で中胚葉側に移動する細胞が観察された。この細胞は中胚葉側に移動後、側方へと移動した。

(4) 原腸陥入の「最初の細胞」の解析

ライブイメージングによって観察された細胞を単離することを目的として、PA-mCherry マウスを用いて細胞を標識した。標識細胞を FACS などによって単離することを試みたが、未だ単離するには至っていない。

単離を行う手法の開発、もしくは、単離を行わず細胞集団のままに 1 細胞解析を行うことを検討している。

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 1件）

1. 著者名 Shimizu Kenji, Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maruhashi Takumi, Takemoto Tatsuya, Okazaki Taku	4. 巻 118
2. 論文標題 PD-1 preferentially inhibits the activation of low-affinity T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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） 10.1073/pnas.2107141118	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 Hayashi Shinichi, Suzuki Hitomi, Takemoto Tatsuya	4. 巻 478
2. 論文標題 The nephric mesenchyme lineage of intermediate mesoderm is derived from Tbx6-expressing derivatives of neuro-mesodermal progenitors via BMP-dependent Osr1 function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2021.07.006	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 Sugiura Daisuke, Okazaki II-mi, Maeda Takeo K., Maruhashi Takumi, Shimizu Kenji, Arakaki Rieko, Takemoto Tatsuya, Ishimaru Naozumi, Okazaki Taku	4. 巻 23
2. 論文標題 PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 399 ~ 410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-021-01125-7	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0件

〔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
---------	---------