

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22247033

 研究課題名（和文）マウスとニワトリのキメラを用いた器官形成過程に行われる
複雑な相互作用の分子解剖

 研究課題名（英文）Molecular analysis of the interaction of different tissues during
organogenesis using mouse-chicken chimera

研究代表者

阿形 清和（AGATA KIYOKAZU）

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70167831

研究成果の概要（和文）：プラナリアが全能性幹細胞から脳を再生する過程で、幹細胞は周辺の分化細胞と複雑な相互作用を繰り返して秩序ある形と機能をもつ脳を形成していくことが分かった。そこで全能性幹細胞であるマウス ES 細胞の細胞シートを、ニワトリ胚の予定脳領域に移植して周囲の細胞と相互作用させたところ、ニワトリ胚の中でマウスの ES 由来細胞を含む脳をつくることに成功した。そこで、本研究では、マウス ES 細胞をニワトリ胚へ移植後、脳の形成過程の各ステップから mRNA を精製して、次世代シーケンサーで mRNA をシーケンスし、バイオインフォマティクスでマウス由来の mRNA とニワトリ由来の mRNA を仕分けし、同時進行的に起きている幹細胞の反応と周辺細胞の反応を遺伝子発現レベルで解析することを行った。

研究成果の概要（英文）：To investigate the interaction of stem cells and the surrounding cells during brain development at the molecular level, we produced mouse ES cell/ chicken embryo chimeras by transplantation of the mouse ES cells into the future brain-forming region of chicken embryos. And then we collected mRNAs from the developing brains and tried to sequence these transcripts using next generation sequencers and to categorize them into mouse- and chicken-derived mRNAs by bioinformatic analysis. We spent a lot of time to collect enough amount of the mRNAs from the developing chimera brains. Thus, we are now trying to sequence them using Illumina Miseq.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	14,700,000	4,410,000	19,110,000
2011 年度	12,900,000	3,870,000	16,770,000
2012 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
年度			
総計	34,000,000	10,200,000	44,200,000

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：器官形成・ニワトリ胚・ES 細胞・キメラ解析・トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

プラナリアが全能性幹細胞から脳を再生する過程で、幹細胞は周辺の分化細胞と複雑な相互作用を繰り返して秩序ある形と機能をもつ脳を形成していくことが分かった。そこで全能性幹細胞であるマウス ES 細胞をニワトリ胚に移植してみたところ、マウス ES 細胞が周囲の細胞と相互作用しながら、ニワトリ胚の中でキメラ脳をつくることに成功した。

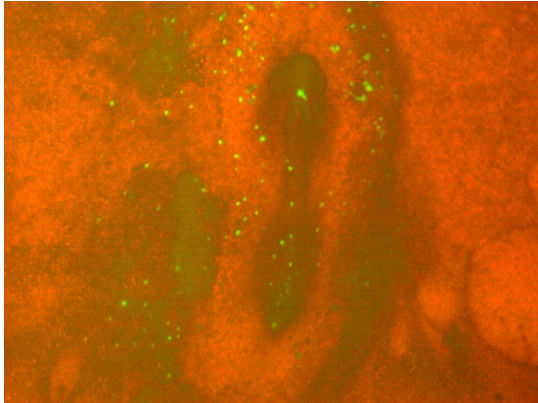


図 1. EGFP/マウス ES 細胞を胚盤葉ステージで移植して発生したキメラ胚。後脳部分に発生した EGFP マウス ES 細胞が見られる。

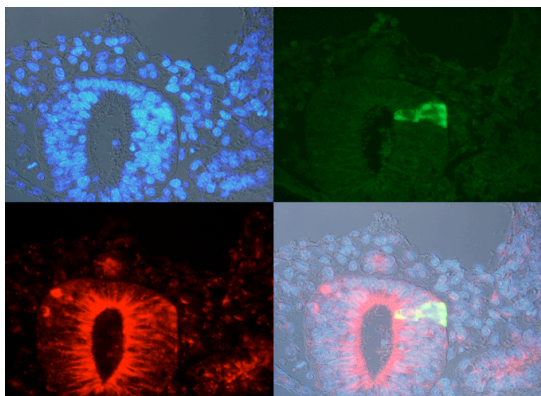


図 2. ニワトリ神経管内で神経幹細胞マーカーを発現している EGFP マウス ES 細胞。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ニワトリ胚の胚盤葉ステージで予定運命地図を作成し、マウス ES 細胞のシートをニワトリ胚の脳の予定領域へ移植してキメラ脳を作成する。そして、その脳の形成過程の各ステップから mRNA を精製して、次世代シーケンサーで mRNA を大量シーケンスし、バイオインフォマティクスでマウス由来の mRNA とニワトリ由来の mRNA を仕分けし、同時進行的に起きている幹細胞の反応と周辺細胞の反応をデ

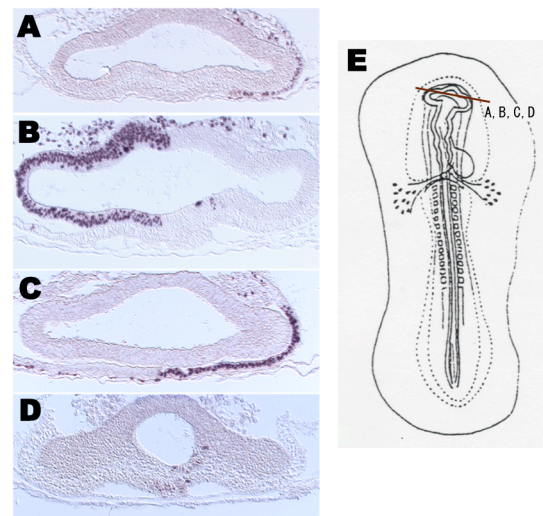
ータベース化して、脳形成過程で起きている複雑な分子イベントの全容を明らかにし、脳形成の作戦を立てることを目的とした。

3. 研究の方法

①ウズラ/ニワトリ胚のキメラ胚を作成し、ニワトリ胚盤葉の脳予定領域を同定する。②EGFP 標識されたマウス ES 細胞シートをニワトリ胚盤葉の脳予定領域に移植して、キメラ脳をつくる。③キメラ胚の脳の各発生段階から脳と脳周辺組織ごと mRNA を精製し、④それらを次世代シーケンサーで mRNA を網羅的に読み(トランスクリプトーム解析)、⑤バイオインフォマティクスでマウス由来 mRNA (幹細胞由来) とニワトリ由来 mRNA (周辺組織由来) に分けて整理し、⑥マウス由来 mRNA の変化を幹細胞の反応/ニワトリ由来の mRNA の変化を脳周辺部の細胞の反応として切り分けし、⑦複雑な幹細胞と周辺細胞との相互作用の分子実体を明らかにする。

4. 研究成果

①ウズラ/ニワトリ胚のキメラ胚を作成し、ウズラ特異抗体を用いてウズラ胚由来の細胞を免疫染色して、ニワトリ胚盤葉の脳予定領域を同定することに成功した。脳の予定領域は胚盤葉の中央部から後方にマップされた。



域は胚盤葉の中央部から後方にマップされた。

図 3. ニワトリ胚盤葉の中央部分に移植されたウズラ全能性細胞の発生運命の追跡結果一例。ウズラ/ニワトリのキメラ胚からウズラ細胞だけを染色してある。

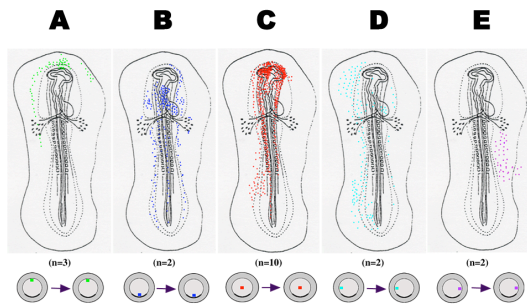


図 4. ウズラ/ニワトリのキメラ胚解析によって得られたニワトリ胚の胚盤葉ステージの予定発生運命地図。

(Tominaga et al., in preparation)

②EGFP 標識されたマウス ES 細胞シートをニワトリ胚盤葉の脳予定領域に移植して、キメラ脳を作成することに成功した。

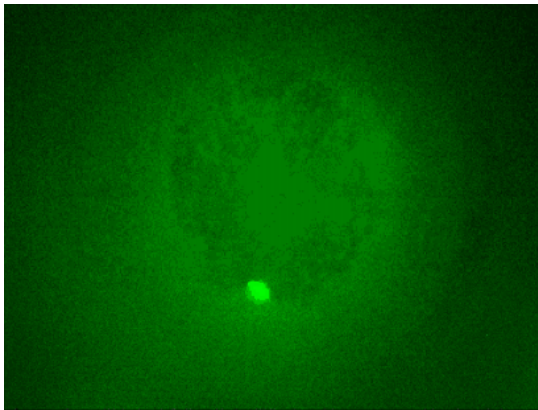


図 5. ニワトリ胚盤葉ステージの予定後脳領域に移植された EGFP マウス ES 細胞。

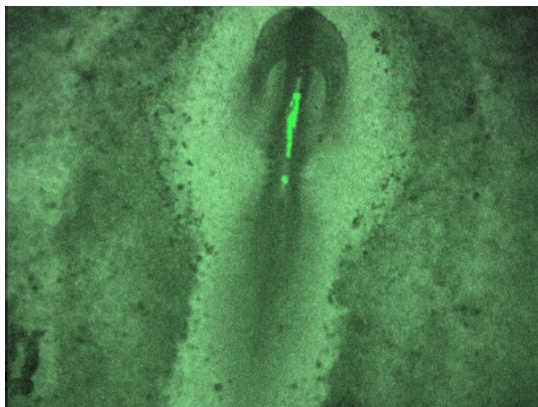


図 6. 後脳へと発生した EGFP マウス ES 細胞。

③バイオインフォマティクスのパイロット実験として、種々の発生段階のウズラ胚から mRNA を精製し、次世代シーケンサーでトランスクリプトーム解析をし、ウズラ由来とニワトリ由来の mRNA が識別可能かを行ったところ、マウス/ニワトリのキメラ胚のみならず、ウズラ/ニワトリのキメラ胚であっ

ても、バイオインフォマティクスで約 95% の遺伝子が、どちら由来の mRNA かを同定できることを明らかにした。その結果、キメラ成功率の高いウズラ/ニワトリのキメラ胚をコンスタントに作製するために、ウズラ胚由来の ES 細胞株の樹立について実験を行った。その結果 2i 培地で ES-like なドーム様の構造を保ちながら増殖する鳥類細胞の培養法を樹立することに成功した。

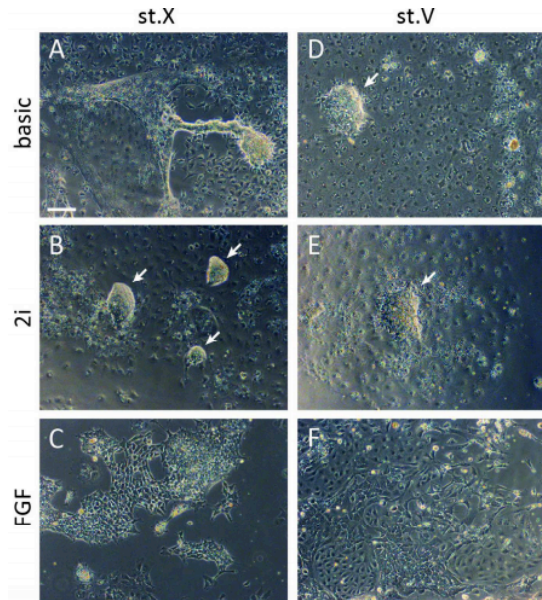


図 7. ウズラ胚盤葉ステージ胚から得られた ES-like コロニーと細胞 (Nakanoh et al., 2013)

④それらマウス/ニワトリのキメラ胚、ウズラ/ニワトリのキメラ胚を多数作製している異なるステージのキメラ胚から mRNA を精製した。が、次世代シーケンサーにかけるだけの十分量の mRNA をなかなか得るに至らず、期限内に各段階のトランスクリプトーム・データ作成に至らなかった。現在も引き続き、実験を行い、近々実験を貫徹する予定である。

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 1 件)

- ① Shota Nakanoh, Kenji Okazaki and Kiyokazu Agata
Inhibition of MEK and GSK3 supports ES cell-like domed colony formation from avian and reptile embryos
Zool.Sci. 査読有 in press

[学会発表] (計 5 件)

- ① Shota Nakanoh & Kiyokazu Agata
Evolutionary background of molecular

mechanisms of pluripotency -
FGF/ERK-independent proliferation to
maintain pluripotency in early
ISSCR 10th Annual Meeting
2012年6月13日,
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- ② Shota Nakanoh & Kiyokazu Agata
Evolutionary background of molecular
mechanisms of pluripotency seen from
birds and reptiles
Joint Meeting of The 45th Annual
Meeting of the Japanese Society of
Developmental Biologists & The 64th
Annual Meeting of the Japan Society
for Cell Biology
2012年5月29日,
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

- ③ Shota Nakanoh & Kiyokazu Agata
Investigation of evolutionary
background of pluripotency among
amniotes
CDB Seminars, 2011年11月30日,
理化学研究所発生・再生総合科学研究所
(兵庫県神戸市)

- ④ Shota Nakanoh & Kiyokazu Agata
The ground state and the primed state
of pluripotency among vertebrates
1st annual Cambridge stem cell
international symposium
2011年7月6日,
University of Cambridge (イギリス)

- ⑤ Shota Nakanoh & Kiyokazu Agata
Investigation of the evolutionary
background of pluripotency among
species
44th Annual Meeting of the Japanese
Society of Developmental Biologists
2011年5月19日,
沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜
野湾市)

- ⑥ Shota Nakanoh
Investigation of the ground state of
pluripotency among species
EMBO Conferemce Series 3rd in a series
<Molecular and cellular basis of
regerberation & tissue repair
2010年9月29日、ボルトガル・セジン
ブラ

[図書] (計 0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
阿形 清和 (AGATA KIYOKAZU)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：70167831

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：