

## 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011~2012

課題番号：23657047

研究課題名(和文) ツメガエルの未分化細胞群を用いた胚の全体構造を創るアッセイの開発

研究課題名(英文) New assay to develop whole structure of embryo using presumptive epidermal region in Xenopus

## 研究代表者

黒田 裕樹 (Kuroda Hiroki)

静岡大学・教育学部・准教授

研究者番号：70402229

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエルにおいて分化万能性を有した細胞群である AC 細胞を用いて、脊椎動物の全体構造を創る手法の開発を行った。まず、人為的にオーガナイザー領域を創り出す手法を検討し、それが BCNE センターと Nieuwkoop センターの両方の存在によって効果的に導かれることが示された。そして人工的に誘導されたオーガナイザーによって、頭尾軸構造を有した胚の全体の基本構造は構築できた。

研究成果の概要(英文)：Using animal cap cells, which have pluripotency like ES and iPS cells, we tried to create overall structure of vertebrate embryo. First, we developed new method to create region having Spemann organizer activity by combination of the BCNE and Nieuwkoop centers. Then, we showed that this induced organizer enabled animal cap explants to generate anteroposterior axis formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：6706

キーワード：疑似生命体、胚様構造、ツメガエル、BCNE センター、Nieuwkoop センター

## 1. 研究開始当初の背景

再生医学の世界では、ES 細胞や iPS 細胞などから特定の器官や組織を創る研究が盛んに行われている。アフリカツメガエルの AC 細胞群を用いた器官・組織を分化させる系は、多量のサンプル数、容易な胚操作などの理由から、これらの実験の参考とされることが多い。本申請内容の未分化細胞から一個体全体を創出する試みも、ツメガエルの系でこそ開始することが理想的と言える。

## 2. 研究の目的

人為的に準備した材料から創り出された恒久的に機能する胚の全体構造は「疑似生命体」とも喩えられよう。本プロジェクトは、皮膚になる発生運命を持つ AC 細胞群だけを土壌として、疑似生命体の完成を目指すとも言える。同時に、この過程を分子発生生物学的手法を用いて評価することによって、ボディプランに関わる単位の明示化、各単位の相互作用の知見の蓄積、そして位置情報や体積調節に関する新知見の発見、といった様々な成果を生み出すことにもつなげていく予定である。

用いる材料は、本来の AC 細胞群、BCNE センター化させた AC 細胞群、ニューコープセンター化させた AC 細胞群を第一に想定している。

論理的には、内在性の BCNE センターとニューコープセンターの組み合わせによって誘導される胚構造までは、近づけることが可能であろう。それを、研究期間内の目標とし、マーカー等を用いた十分な分子の評価を伴って完成させることを目指していく。

## 3. 研究の方法

初年度は、胞胚期の両シグナルセンターを人工的に誘導する系を完全に整えることが主となる。まず、AC 細胞群において、Canonical Wnt シグナルや VegT、そしてその標的分子などを分子発生生物学的手法を用いて調節し、作成背景の異なるいくつかの人工 BCNE、ニューコープセンターを作成していく。続けて、分子マーカーの発現や正常胚における互換性を確認することによってその活性を評価していく。同時に二年目以降に向けた試験的な組み合わせ培養実験も行っていく。二年目は、人工的に誘導したセンターの組み合わせによる胚様構造の誘導実験と評価を徹底して行っていく。まず例数を増やし、再現性の確認を十分に行った上で、外観上最も完成度が高い胚様構造を誘導する選択する。続けて、胚発生の順路に適合したチェック項目について、その状態を時間軸に沿って精査し、胚の完成度を評価していく。さらに、完成度が高い場合には、長期培養も行い、臓器形成、変態、生殖能力など種とし

ての生活史を全うする上で必要となる要素についても観察を行っていく。

## 4. 研究成果

### (1) 疑似 BCNE と疑似 Nieuwkoop の確立

高等動物の胚全体を未分化細胞のみから創出したという報告はない。まず、ツメガエルのアニマルキャップ (AC) 細胞群だけを用いて、その系の構築を目指した。胞胚期には 2 つのシグナルセンターが存在し、両センターによって胚全体の誘導にほぼ十分な状態が導かれるはずである。研究の結果、AC 細胞群において、Canonical Wnt シグナルや VegT、そしてその標的分子などを分子発生生物学的手法を用いて調節し、作成背景の異なるいくつかの人工 BCNE、ニューコープセンターを作成していくことに成功した。次に分子マーカーの発現や正常胚における互換性を確認することによってその活性を評価していった。その結果、予想された分子マーカーが発現していることが確認できた。

### (2) 胚葉構造の確立

十分に誘導能力、分化能力を期待できる両センターの人工誘導に成功したため、それらをコンビネーションした全体構造の誘導を目指す実験に取り組んだ。その結果、誘導された BCNE と Nieuwkoop 領域が存在する状態で培養した場合にのみ、頭部神経構造、背側中胚葉構造、を有する胚様構造が得られるという画期的なデータを得ることができた。それは、物理的刺激に応じて反応して動くことから原始的な反射弓構造も成立していることがわかった。一部の胚では眼の構造も確認された。しかし、消化管構造などは確認することができず、オタマジャクシとして泳動する前の段階で成長が止まることが判明した。

以上のことから、最終年度の目標としていた完成度の高い胚様構造の試験管内での構築については、十分とまでは言えないが、将来的にそれが実現されることを期待させる段階の成果を得られたと考えている。

## 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 2 件)

- (1) Shoko Mori, Yuki Moriyama, Kumiko Yoshikawa, Tomoyo Furukawa and Hiroki Kuroda  
beta-adrenergic signaling promotes posteriorization in *Xenopus* early development

*Develop. Growth Differ.* (2013) 55,  
350-358.

査読有

(2) Shinya Matsukawa, Yuki Moriyama,  
Tadayoshi Hayata, Haruka Sasaki, Yuzuru  
Ito, Makoto Asashima, and Hiroki Kuroda  
KDEL tagging: a method for generating  
dominant-negative inhibitors of the  
secretion of TGF-beta superfamily  
proteins

*Int. J. Dev. Biol.* (2012) 56, 351-356.

査読有

〔学会発表〕(計1件)

黒田裕樹

KDEL tagging: a method for generating  
dominant-negative inhibitors of the  
secretion of TGF-beta  
superfamily proteins  
Xenopus Conference

2012年9月11日

ジアン半島、フランス

〔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

黒田裕樹 (KURODA HIROKI)

静岡大学・教育学部・准教授

研究者番号: 70402229

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: