

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570240

研究課題名(和文) 成体組織に存在するOct60発現細胞の起源と多能性に関する研究

研究課題名(英文) Origin and multipotency of Oct60-expressing cells in the adult tissue of *Xenopus laevis*

研究代表者

木下 勉 (KINOSHITA, TSUTOMU)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：30161532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカツメガエルのOct60遺伝子はPOUファミリー・クラスVに属する転写因子をコードし、哺乳動物のOct3/4遺伝子のパラログの一つである。免疫組織化学的な解析により、Oct60を発現する細胞が成体の生殖腺以外に肝臓、腎臓、血球に広く存在することがわかった。このOct60発現細胞はBmi1を共発現し、貧血誘導により増加することから、造血前駆細胞に類似した細胞であることが示唆された。細胞移植実験により細胞の起源を調べた結果、Oct60発現細胞は尾芽胚期の背側側板中胚葉に由来する可能性が示された。Oct60の機能解析により、Oct60発現細胞は高い多能性を持つ未分化細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oct60 gene is *Xenopus* paralog of mammalian Oct3/4 gene which encodes a transcription factor of POU family class V. In immunohistochemical analysis, the Oct60-expressing cells were detected in adult gonads, liver, kidney and blood cells. The Oct60-expressing cells were stained with anti-Bmi1 antibody and increased in number by anemic induction, suggesting that the Oct60-expressing cells are hematopoietic precursor-like cells. Cell transplantation experiment indicated that the Oct60-expressing cells are derived from dorsolateral mesoderm of tail-bud stage embryos. Functional analysis of Oct60 showed that the Oct60-expressing cells are multipotent undifferentiated cells.

研究分野：生物学

キーワード：アフリカツメガエル 器官形成 多能性細胞 Oct60

1. 研究開始当初の背景

多能性を保持している哺乳類の ES 細胞や EG 細胞は、Oct3/4 を発現する胚盤胞の内部細胞塊や始原生殖細胞 (PGC) から作製されるが (Nichols et al., 1998)、分化した成体組織からは作製できない。しかし、成体の組織内でも Oct3/4 を発現する細胞は検出されており (Tai et al., 2005) わずかの Oct3/4 発現細胞でも単離、培養できれば、多能性をもつ ES 細胞様の細胞集団が得られる (Yu et al., 2006)。従って Oct3/4 と組織幹細胞との関連が注目されるが、これまでに両者の関連についてはほとんど解析されていない。

本研究で用いるアフリカツメガエルには、Oct3/4 と同じ POU ファミリー・クラス V (POU-V) 転写因子として Oct25、60、91 の 3 種類が存在し、いずれも Oct3/4 欠損マウスから作製した ES 細胞を未分化状態のまま維持する能力を示す (Morrison and Brickman, 2006)。実際にアフリカツメガエルの初期胚において、Oct25、60、91 はいずれも原腸胚期の細胞分化を強く抑制する (Cao et al., 2007, 2008、Hening et al., 1998、Snir et al., 2006)。これら 3 種類の Oct3/4 ホモログのうち、Oct60 のみが卵形成期の卵母細胞で発現しており (Whitfield et al., 1995)、Oct25 と 91 は細胞の分化誘導が開始される原腸胚期以降に発現することが報告されている (Hinkley et al., 1992)。しかしいずれの遺伝子についても幼生期以降の器官形成における発現に関する解析は行われてこなかった。我々が成体器官における Oct60 の発現を調べた結果、従来報告されていた卵巣以外に、肝臓や腎臓からも Oct60 の発現が検出されることがわかった。成体組織中に検出される Oct60 発現細胞は細胞の更新、組織の修復・維持に関わる組織幹細胞と密接に関わる可能性が考えられる。アフリカツメガエル以外のモデル動物においても Oct3/4 ホモログについての報告はある (Takeda et al., 1993; Laval et al., 2007; Sanchez et al., 2010)。しかしいずれの場合でも、初期発生における遺伝子発現については報告されているが、成体組織における Oct3/4 ホモログの発現、および組織幹細胞との関係については全く調べられていない。

2. 研究の目的

成体組織の特定部位には多能性を保持した組織幹細胞が存在し、組織を構成する細胞の更新、組織の再生・維持に寄与することが知られているが、組織幹細胞の起源およびその形成機構は不明である。上記の研究背景を考慮すると、アフリカツメガエルの成体組織中に存在する Oct60 発現細胞は組織幹細胞の起源や形成機構を調べるよいモデルとなる。そこで本研究では、以下の 2 つの研究目的を設定し、研究を進めることとした。

(1) Oct60 発現細胞の起源に関する解析
Oct60 を発現する細胞の成体器官および組織内における局在と個体発生における出現時期を特定するために、下記の 3 項目に沿って解析を行うこととした。

成体組織における局在
造血組織における局在
始原生殖細胞形成における局在

(2) Oct60 発現細胞の役割に関する解析
Oct60 を発現する細胞の役割を明らかにするために、下記の 4 項目に沿って解析を行うこととした。

血球再生における役割
多分化能性の検証
遺伝子ノックアウトが及ぼす影響
パラログ遺伝子の比較解析

3. 研究の方法

研究の目的ごとに以下の方法に従って Oct60 発現細胞の解析を行った。

(1) Oct60 発現細胞の起源に関する解析

成体組織における局在

Oct60 タンパク質に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作製し、両抗体を併用して、成体組織および変態期における Oct60 発現細胞の器官および組織内の分布を免疫組織化学的に解析した。定量的 RT-PCR により Oct60 の遺伝子発現量の変化を比較解析した。

造血組織における局在

GFP を発現するトランスジェニック系統の胚あるいは *X. borealis* 胚から造血センターとなる組織を切り出して野生型胚へ移植し、得られたモザイク個体の造血系器官において GFP 発現細胞あるいはキナクリン染色性の *X. borealis* 細胞を検出し、造血前駆細胞の移動、分布を解析した。

始原生殖細胞形成における局在

Oct60 のプロモーターに GFP を連結したレポーターコンストラクトを作製後、遺伝子導入を行い、このトランスジェニック個体を使って、Oct60 発現細胞の網羅的解析を行った。

(2) Oct60 発現細胞の役割に関する解析

血球再生における役割

溶血剤であるフェニルヒドラジンを経内へ注射し、注射後定期的に採血して、Oct60 発現細胞の量的変化を RT-PCR 法および免疫組織化学により解析した。また、Oct60 発現細胞の細胞タイプを明らかにするために、造血幹細胞マーカーである Bmi1 に対する抗体、白血球の膜タンパク質に対する抗体を用いて、免疫組織化学的に解析を行った。

多分化能性の検証

フィコール分画により Oct60 発現細胞を多く含む細胞懸濁液を採取後、野生型の初期胚あるいは幼生へ移植し、細胞移植個体を成体まで飼育して細胞の分化能を解析した。

Oct60-GR コンストラクトとデキサメタゾンを利用し Oct60 活性化処理細胞と未処理の不活性化細胞との間で、遺伝子発現の違いを RT-PCR で比較解析するとともに、*in vivo* へ移植して細胞の分化能を検討した。

遺伝子ノックアウトが及ぼす影響

Oct60 の第一エクソンに対する TALEN コンストラクトを構築し、合成した mRNA を受精卵へ顕微注入して Oct60 遺伝子のノックアウト個体を作製した。遺伝子ノックアウトの有

無は HMA アッセイと標的配列のシーケンス解析により判定した。遺伝子ノックアウト個体における生殖細胞形成、血球形成を組織学的に解析した。

パラログ遺伝子の比較解析

Oct60 のパラログである Oct25、91 に対して Oct60 とは異なるエピトープに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を作製し、成体組織における Oct25、91 の発現部位を免疫組織学的に解析した。また、個体発生過程における遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

アフリカツメガエルの成体組織から検出される Oct60 発現細胞の起源とその役割を明らかにするための解析を行い、以下の結果を得た。

(1) Oct60 発現細胞の起源に関する解析

成体組織における局在

成体の組織における Oct60 発現細胞の分布を明らかにするために、成体から器官を摘出して RT-PCR により Oct60 の遺伝子発現を調べたところ、卵巣で著しい遺伝子発現が検出されるとともに、肝臓、腎臓、精巣、血球からも弱いながらも明らかに Oct60 発現が検出された。そこで、遺伝子発現が検出された器官を中心に、Oct60 発現細胞の局在を抗 Oct60 抗体を用いて免疫組織学的に解析した。その結果、生殖腺以外に、肝臓の類洞付近、腎臓の皮質、血球内から Oct60 発現細胞が検出された(図 1)。肝臓の類洞や腎臓の皮質には毛細血管を通して血球細胞が多数集まること、また両生類では肝臓や腎臓が成体になっても造血センターの役

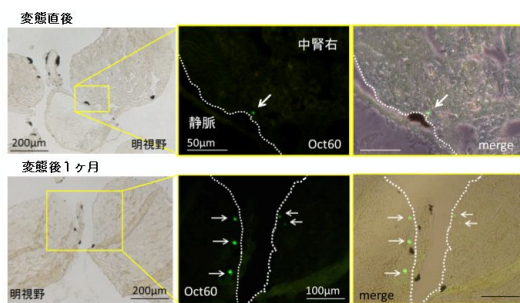


図 1 腎臓の皮質に局在する Oct60 発現細胞

割を果たすことが知られていることから、肝臓、腎臓、血球から検出される Oct60 発現細胞は、いずれも造血初期の前駆細胞である可能性が示唆された。

造血組織における局在

両生類では初期胚の腹部血島 (VBI) 領域で作られた細胞が幼生期の血液をつくり、変態期以降は背側側板中胚葉 (DLP) 領域から分化した細胞が成体血液をつくることが報告されている。そこで Oct60 発現細胞の起源を明らかにするためのモザイク解析を

行った。神経胚後期に *X. borealis* の DLP 領域を *X. laevis* の相同領域へ移植し、移植を行った個体を変態後 1 ヶ月まで飼育し、キナクリン染色により *X. borealis* の細胞を探索した。その結果、DLP 由来となる *X. borealis* の細胞は変態後の子ガエルの肝臓、大腿骨骨髓中から検出された。大腿骨の骨髓形成の詳細を理解するために、変態最盛期における大腿骨の骨髓形成過程を組織学的に調べた。その結果、アフリカツメガエルの変態期の大腿骨は軟骨組織のまま発達し、変態終了後 1 ヶ月までの間に軟骨から硬骨への組織変換が起こることがわかった。骨幹部の骨化と骨髓形成の進行とともに、毛細血管の骨髓移入が観察された。この頃になると骨端部に DLP 由来の *X. borealis* の細胞が検出されるようになった(図 2 f)。免疫染色を行った結果、骨端

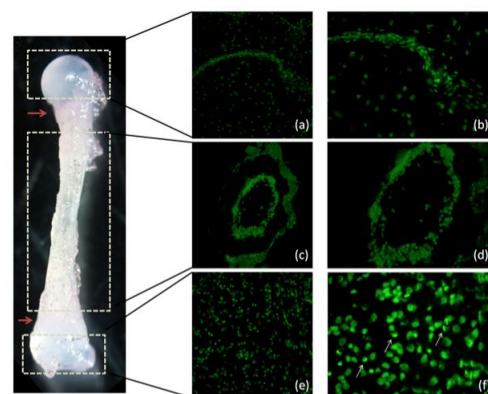


図 2 大腿骨骨端部から検出される DLP 由来の *X. borealis* 細胞

の細胞増殖層内から多数の Oct60 発現細胞が検出された。

以上の結果から、成体の肝臓、腎臓、骨髓、血液から検出される Oct60 発現細胞は造血幹細胞に類似した特徴をもち、初期胚の DLP 領域に由来する細胞が血流を介して成体の造血器官へ移動・定着した可能性が示唆される。

始原生殖細胞形成における局在

Oct60 遺伝子のプロモーターを GFP に結合したレポーターコンストラクトを受精卵へ導入したトランスジェニック個体を作製した。初期発生の過程では、尾芽胚期の背側体節領域に沿って GFP を発現する大形細胞が観察されたが、変態後の子ガエルから GFP 蛍光を示す細胞を検出できなかった。

受精卵の植物極表層には生殖細胞質と呼ばれる PGC 形成に関わる細胞質が存在する。抗 Oct60 抗体による免疫染色の結果から、この生殖細胞質中には Oct60 タンパク質が局在することがわかった。この領域に DEADSouth3'UTR を付加した GFP の合成 RNA を注入し PGC を緑色蛍光でラベルした。尾芽胚期に内胚葉から背側の生殖隆起へ移動中の PGC を緑色蛍光を使って単離し、遺伝子発現を調べたところ、PGC の Oct60 発現はまわりの内胚葉細胞より明らかに高いことがわかった(図 3)。PGC が生殖隆起へ達

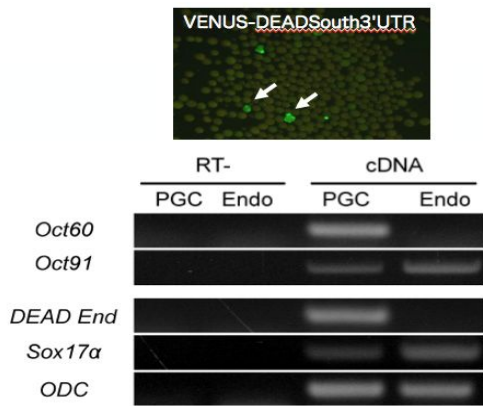


図3 単離した PGC の遺伝子発現

した時期に生殖隆起近傍における蛍光標識された細胞の分布を調べた結果、ほとんどの細胞は生殖原基内に分布していたが、GFP 蛍光を持つ細胞が血流中で検出される場合もあった。

(2) Oct60 発現細胞の役割に関する解析

Oct60 発現細胞の起源を調べた結果、Oct60 発現細胞の一部は背側大動脈周辺と生殖原基に由来することが示唆された。そこで次に血球細胞形成および生殖細胞形成における Oct60 の役割を解析した。

血球再生における役割

変態後 6 ヶ月の個体にフェニルヒドラジンを経口投与して血液を破壊し、血球の再生実験を行った。貧血処理前の血球細胞における Oct60 の遺伝子発現はごく僅かであるが、貧血誘導の 3 日後から Oct60 の遺伝子発現が検出されるようになり、貧血誘導後 10 日をピークに減少しはじめ、貧血誘導後 1 ヶ月までには元の低いレベルまで遺伝子発現が低下することがわかった(図4)。

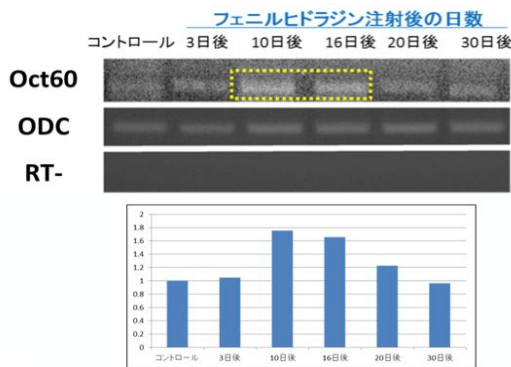


図4 貧血誘導後の Oct60 発現細胞

この間の血球細胞を免疫染色した結果、貧血誘導後 10 日までの間に Oct60 抗体で染色される細胞の数が増加するとともに、分化した赤血球の中にも Oct60 抗体で核が染色される細胞が検出されるようになった。これらの結果は、Oct60 発現細胞が赤血球形成のための前駆細胞である可能性を示唆し

ている。そこで、造血幹細胞のマーカである Bmi1 の発現の有無を免疫染色により調べた結果、血球中の Oct60 発現細胞はいずれも Bmi1 を発現することがわかった(図5)。また、アフリカツメガエルの白血球を

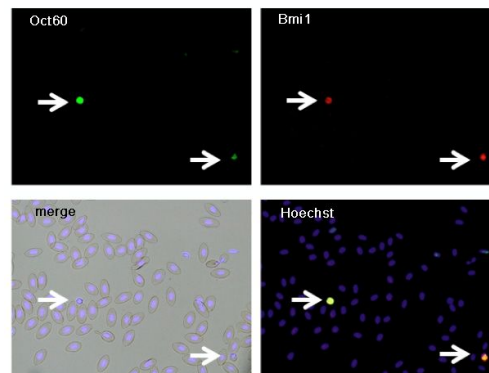


図5 Oct60 と Bmi1 の共発現

識別する XL-2 抗体を使って細胞種を解析した結果、Oct60 発現細胞の一部は大形で細胞質に広がりが見られ、このような細胞は XL-2 抗体にも陽性であることがわかった。これらの結果から、Oct60 を発現する小形で球形の細胞は、赤血球にも白血球にも分化し得る造血幹細胞である可能性が示唆される。

多分化能性の検証

Oct60 を発現する血球細胞は小形で球形のため、フィコール溶液を使って濃縮することがわかった。恒常的に GFP を発現するトランスジェニック個体の血球から Oct60 発現細胞を濃縮した細胞懸濁液を調製し、野生型胚の胞胚腔あるいは幼生の腹腔内へ移植した。移植個体を変態後の子ガエルまで発生させ、GFP 蛍光を指標として移植細胞の発生運命を追跡したが、GFP 蛍光を示す組織を検出することはできなかった。

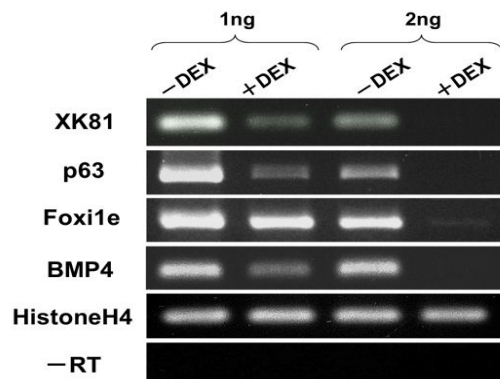


図6 Oct60 による細胞の分化抑制

Oct60 を発現する細胞の多能性を検討するために、Oct60 の C 末端側にグルコシルコリド受容体を連結した Oct60-GR とデキサメタゾンを利用してアニマルキャップ細胞の遺伝子発現を解析した。その結果、デキサメタゾン無添加 (-DEX) で培養した細胞は BMP とケラチン遺伝子を発現し、立

方状の表皮細胞へと分化した。これに対してデキサメタゾンを添加 (+DEX) して Oct60 を活性化した細胞では BMP やケラチン遺伝子の発現が抑制され、小型で球形の細胞に変形することがわかった (図 6)。また、アニマルキャップ由来の細胞は、一旦表皮細胞へ分化した後はアクチビンによる中胚葉誘導能に対する応答能を失うが、デキサメタゾンを添加して Oct60 を活性化すると、アクチビンに対する応答能を回復し、ケラチン遺伝子の発現を停止して Brachyury などの中胚葉形成に関わる遺伝子を発現することがわかった。一旦表皮へ分化した細胞でも、Oct60 を活性化した後に尾芽胚へ移植すると、筋細胞へ再分化できることがわかった (図 7)。

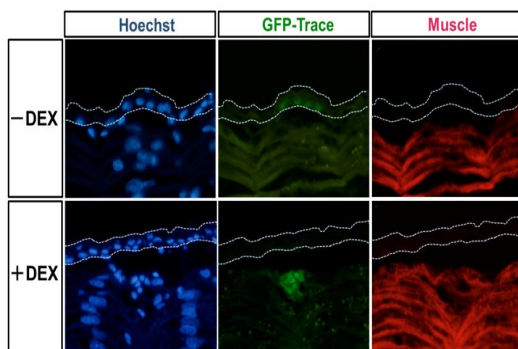


図 7 Oct60 による細胞の分化転換

これらの結果は、Oct60 を発現している細胞が、高い多能性を保持していることを示唆している。

遺伝子ノックアウトが及ぼす影響

血球形成および生殖細胞形成における Oct60 の役割を明らかにするために、Oct60 のノックダウン実験を行ったが、明確な表現型が得られなかった。そこで次に、Oct60 血球形成への影響を解析するために、TALEN 法を用いた遺伝子ノックアウト個体を作製した。Oct60 の第一エクソンを指標とした TALEN の合成 RNA を受精卵の動物極側へ顕微注入した。注入個体を幼生期まで発生させてゲノム解析を行った結果、Oct60 遺伝子の標的配列において高頻度に遺伝子破壊が起こっていることが確認できた。この Oct60 遺伝子破壊個体を変態終了後の子ガエルまで飼育し成体器官を調べた結果、生殖腺および肝臓の矮小化が認められ、血球数の著しい減少が確認された。

パラログ遺伝子の比較解析

Oct60 のパラログ遺伝子である Oct25、91 は原腸胚期から神経胚期にかけて発現し、三胚葉の分化と神経形成にかかわる事が報告されているが、神経胚期以降の器官形成における役割は全く調べられていない。Oct60 の対照実験として、神経胚以降の発生過程における Oct25 と 91 の遺伝子発現を調べた。その結果、Oct25、91 の遺伝子発現は幼生期に一旦検出されなくなるが、変態期の心臓、皮膚、消化管の組織再構築過程において遺伝子発現を再活性化させることがわかった (図 8)。Oct25 および 91 の

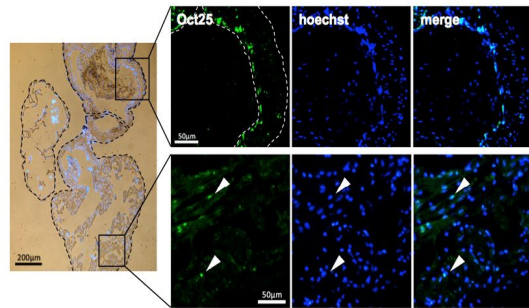


図 8 心臓における Oct25 の遺伝子発現

発現部位を抗体を用いて免疫染色により解析した結果、BrdU の取り込みにより検出される分裂細胞の高い領域と一致することがわかった。

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 5 件)

1. Protocadherin-9 involvement in retinal development in *Xenopus laevis*. Izuta Y, Taira T, Asayama A, Kinoshita T, Suzuki S.T., 査読有, J. Biochem, vol.156, 235-249 (2015) doi: 10.1093
2. Possible regulation of Oct60 transcription by a positive feedback loop in *Xenopus* oocytes. Morichika K, Sugimoto M, Yasuda K, Kinoshita T., 査読有, Zygote, vol.22, No.2, 266-274 (2014) doi: 10.1017
3. The structure and development of *Xenopus laevis* cornea. Hu W, Haamedi N, Lee J, Kinoshita T, Ohnuma S., 査読有, Exptl. Eye Res., vol.116, Jul, 109-128 (2013) doi: 10.1016
4. Developmental regulation of locomotive activity in *Xenopus* primordial germ cells., 査読有, Terayama K, Kataoka K, Morichika K, Orii H, Watanabe K, Mochii M. Dev Growth Differ. vol.55, 217-228 (2013) doi: 10.1111
5. Xtr, a plural tudor domain-containing protein, is involved in the translational regulation of maternal mRNA during oocyte maturation in *Xenopus laevis*., 査読有, Ohgami H, Hiyoshi M, Mostafa MG, Kubo H, Abe S, Takamune K. Dev Growth Differ., vol.54, 660-671 (2012) doi: 10.1111

[学会発表](計 19 件)

1. 天川あや、佐久間哲史、山本卓、木下勉：アフリカツメガエルの側線形成における Oct91 の遺伝子発現と機能の解析、2014 年 11 月 26 日、日本分子生物学会第 37 回大会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2. 伊東直人、佐久間哲史、山本卓、木下勉：Functional analysis of Oct60 in adult organ formation of *Xenopus laevis*,

- 2014年11月26日、日本分子生物学会第37回大会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
3. 李宰勲、佐久間哲史、山本卓、木下勉: TALENによる遺伝子破壊個体を用いたOct25の器官形成における機能の解析, 2014年9月12日、日本動物学会第85回大会、東北大学（宮城県・仙台市）
 4. J.Lee, Y.Shoji, T.Kinoshita: Localization of Oct25-expressing cells during development and regeneration of hindlimb phalanges in *Xenopus laevis*, 15th International *Xenopus* Conference, Aug. 27, 2014, Asilomar(USA)
 5. M.Kobayashi, M.Sugiura, T.Kinoshita: Tissue reconstruction of myocardium during *Xenopus laevis* metamorphosis, 15th International *Xenopus* Conference, Aug. 27, 2014, Asilomar(USA)
 6. 小林愛、杉浦美紗、木下勉: アフリカツメガエルの変態期における心筋の組織再構築, 2014年5月28日、日本発生生物学会第47回大会、Winc 愛知（愛知県・名古屋市）
 7. 杉浦美紗、森近恵祐、木下勉: アフリカツメガエルの変態期における成体型心筋形成に関する研究, 2013年12月4日、日本分子生物学会第36回大会、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）
 8. 天川あや、山浦貴史、久保英夫、森近恵祐、木下勉: アフリカツメガエルの成体型表皮形成におけるOct25/91の役割, 2013年9月28日、日本動物学会第84回大会、岡山大学（岡山県・岡山市）
 9. 李宰勲、森近恵祐、木下勉: アフリカツメガエルの毛様体辺縁部における細胞の分裂能の解析, 2013年9月28日、日本動物学会第84回大会、岡山大学（岡山県・岡山市）
 10. 杉浦美紗、森近恵祐、木下勉: アフリカツメガエルの変態期における成体型心筋形成に関する研究, 2013年9月27日、日本動物学会第84回大会、岡山大学（岡山県・岡山市）
 11. K.Morichika, K.Shimada, H.Kubo, T.Kinoshita: Oct60 is involved in the PGC formation as a germlasm component, 17th International Congress of Developmental Biology, June 17, 2013, Cancun(Mexico)
 12. K.Morichika, K.Shimada, H.Kubo, T.Kinoshita: Oct60 is involved in the PGC formation as a germlasm component, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2013, くにびきメッセ（島根県・松江市）
 13. M.Yamabuchi, Y.Kawaguchi, I.Matsuda, T.Kinoshita: Regulation of red blood cell transition from larval to adult type during anuran metamorphosis, 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 29, 2013, くにびきメッセ（島根県・松江市）
 14. M.Sugiura, K.Morichika, T.Kinoshita: Study on cardiac tissue remodeling in

- Xenopus laevis* metamorphosis. 35th Ann. Meeting Mol. Biol. Society Jap. Dec. 12, 2012, 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
15. Y.Shoji, H.Kubo, K.Morichika, T.Kinoshita: Analysis of oct25-expressing cells during development of hind limb phalanges in *Xenopus laevis*. 35th Ann. Meeting Mol. Biol. Society Jap. Dec. 12, 2012, 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
 16. T.Yamaura, H.Kubo, K.Morichika, T.Kinoshita: Analysis of regenerative activity in the adult heart of *Xenopus laevis*. 35th Ann. Meeting Mol. Biol. Society Jap. Dec. 12, 2012, 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
 17. F.Kouno, K.Morichika, H.Kubo, T.Kinoshita: Oct60 expression in adult blood cells of *Xenopus laevis*. 35th Ann. Meeting Mol. Biol. Society Jap. Dec. 12, 2012, 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
 18. K.Morichika, K.Shimada, H.Kubo, T.Kinoshita: Oct60 protein is involved in the PGC formation as a germlasm component, 14th International *Xenopus* Conference, Sept. 11, 2012, Giens Peninsula(France)
 19. Y. Takaichi, K. Shimada, M.Sugiura, H.Kubo, K.Morichika, T.Kinoshita: Protein localization and functional analysis of POU-V Oct60 transcription factor in *Xenopus laevis*, 45th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 28, 2012, 神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www2.rikkyo.ac.jp/web/tkinoshita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 勉 (KINOSHITA TSUTOMU)
立教大学・理学部・教授
研究者番号：30161532

(2) 研究分担者

久保英夫 (KUBO HIDEO)
東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究部門・研究員
研究者番号：50178034
(2012年まで)

森近恵祐 (MORICHIKA KEISUKE)
立教大学・理学部・ポスドクトラルフェロー
研究者番号：30593074
(2013年まで)

(3) 連携研究者

なし