

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658163

研究課題名(和文) 魚類の分離胚細胞からの個体再生に関わる発生工学的研究

研究課題名(英文) Experimental embryological study to regenerate individual from dissociated blastomeres in goldfish.

研究代表者

山羽 悦郎 (YAMAHA, ETSURO)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：60191376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の胞胚期の割球は分化多能性を有する。分離分散した割球を再集合させて胚を誘導させるための発生工学的な基礎研究を行った。分散して培養した胞胚期の体細胞系列の細胞は、生殖系列細胞と異なり、単純な培養ではその分化能力を維持できないと考えられた。いくつかの成長因子で短時間処理された分離割球は、二次胚を誘導する能力を有したことから、人為的に中胚葉への分化を誘導することは可能と考えられた。分離した割球を、接着性の基質で被膜され、カルシウムを含む培地中で培養することでスフェロイド(細胞塊)が誘導された。しかしながら、スフェロイドは上皮様の組織像を示し、胚盤様の形態を誘導することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：It is reported that blastomeres of early fish embryo have pluripotency during blastulation. The properties of dissociated blastomeres were analyzed to develop new techniques that individuals regenerate from those cells. Dissociated blastomeres lost their pluripotency when transplanted to host blastula after longer cultivation under dissociated condition in which germ-cell line was maintained. Additional embryonic axis was induced when dissociated blastomeres treated with some growth factors were transplanted into host blastula. These results suggest that blastomeres were artificially destined their developmental fate. Dissociated blastomeres formed spheroid aggregates when cultured in vitro on the extracellular adhesive matrix in the simple Ringer's solution. But embryoid was not induced from this spheroid aggregate transplanted on the yolk cell, yet.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：発生工学 胚様体 スフェロイド キンギョ 硬骨魚類 中胚葉 卵黄細胞

1. 研究開始当初の背景

植物では、細胞培養した胚様体と人工栄養を組み合わせる封入した「人工種子」を作り出すことができている。このことは、一定の遺伝的形質を有した個体を自然条件に関係無く作り出すことができるという点で画期的であり、生物生産の新しい手法として各方面で展開されてきている。この技術は、単離した細胞がすべての種類の細胞へ分化できる能力（全能性）をもつ植物の細胞のみにおいて可能な技術と考えられている。

動物においては、クラゲなどの下等な動物で、分離した筋細胞より個体が再生する例が知られているが、高等動物では不可能とされてきた。初期発生機構の解析より、数多くの種類の細胞を生み出す能力を持つ幹細胞から組織を還元できることが明らかになってきたものの、幹細胞のみから個体を再生した例はない。初期胚とのキメラ化によって配偶子を分化させただけである。iPS 細胞を集合させても胚にはできていないのである。

申請者のグループは、魚類の胞胚期までの胚盤を構成する（生殖細胞系列を除く）細胞が、初期囊胚期までは高度な分化能力を維持し、これらの胚細胞の分化の方向性を決定するのは胚盤の下部に位置する卵黄細胞であることを明らかにし (Mizuno et al. Nature, 383:131-132:1996)。このことは、多量に採取できる胞胚細胞を、魚類の ES 細胞の代わりとして取り扱えることを意味している。この細胞を材料として用い、上皮で囲まれた胞状の胚盤を再構築できるならば、卵黄細胞と組み合わせることで個体再生が可能になると考えられる。

これまでのゼブラフィッシュを用いた突然変異の研究より、卵黄細胞からの誘導に関わるのはトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) ファミリーに属する成長因子や線維芽細胞成長因子 (FGF) などと考えられている。これらの成長因子を胞胚へ作用させたとき、中胚葉系の遺伝子の発現が起こることが明らかとなっている。したがって、分離した胞胚割球の中胚葉細胞への分化に対してもこれらの成長因子が有効であると考えられる。しかしながら、どのような条件で分化を誘導できるかは目下のところ全く明らかとなっていない。

一方、魚類の PGC を生体外に取り出し培養する研究は、行われているものの成功した例はない。精巣を筋肉に移植したとき、その形態と精子の分化能力は維持されることが知られている。再構築胚は三次元の空間を持つため、精巣断片を培養できる可能性がある。さらに分離した胚細胞の中には PGC が内在することから、

生殖腺体細胞があればこの中で PGC が培養でき、生殖腺も再構築される可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、胞胚期に分離した胚細胞からの個体再生を行うため、キンギョおよびゼブラフィッシュの胚を材料として、1) 胞胚期胚からの割球の回収、2) 分離した胞胚期細胞の分化能力の維持期間、3) 分離した胞胚期細胞からの細胞塊形成、4) 分離した胞胚期細胞の分化能力の人為的な変更、の諸条件を設定することを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 胞胚期胚からの割球の回収

割球を容易に分離する技術を確立するため、パーコールの不連続密度勾配遠心により、中期胞胚期の割球の分離を試みた。中期胞胚を、クエン酸ナトリウムを含むリンゲル液中でガラスホモジナイザーを用いてホモゲナイズした。その後、同溶液で平衡化したパーコール不連続密度勾配へ重層し、スウィングローターで遠心した。各層より細胞を回収し、細胞膜標識色素 PKH26 で染色し、胞胚期割球の分画を調べた。

(2) 分離した胞胚期細胞の分化能力の維持期間の解析

材料とする胞胚期の細胞が、分離・培養条件下でその分化能力（多形成能）が失われてしまえば、本研究の遂行には問題となる。そこで、単純な分離・培養条件下での胞胚期細胞の特性の変化を明らかにした。

初期卵割期胚へのマイクロインジェクションにより、biotin および蛍光色素で細胞質を標識した胚を用意した。中期胞胚期に、この胚の胚盤を卵黄細胞から分離し、クエン酸ナトリウムを含むリンゲル液中で分離した。同溶液を満たした 96 穴培養プレートの中で、分離細胞を一定時間培養した。その後、宿主の胞胚に移植した。このキメラ胚を培養し、移植した細胞の胚への組み込みを蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 分離した胞胚期細胞からの細胞塊形成

材料とする胞胚期の細胞から三次元の細胞塊を構成させるために、細胞非接着基質内での震盪培養、接着基質上で培養を行い、細胞の挙動を明らかにした。また、中期胞胚期から分離状態で一定時間、旋回培養した後に、いくつかの基質上で培養し、細胞挙動を調べた。さらに、三次元的な細胞塊が得られた場合には、中期胞胚の動物極上へ移植し、キメラ胚での形態形成を明らかにした。

(4) 解離した胞胚期細胞の分化能力の人為的な変更

胞胚期の割球は、前述のように、卵黄細胞からの TGF- β ファミリーに属する増殖因子や線維芽細胞成長因子 (FGF) により中胚葉や内胚葉が分化すると考えられている。しかしながら、魚類のこれらの増殖・成長因子を入手することはできない。そこで、市販のこれらの増殖因子を購入し、それらの生物学的なアッセイを行った。アッセイは、1) 淡水魚用リングルに溶解した増殖因子溶液の胞胚の胚盤へのインジェクション、あるいは 2) 胞胚期の動物極側の胚盤断片の浸漬により行った。1) により形態形成の異常、2) で断片の伸張が認められた因子に関して次の実験を行った。

細胞質を蛍光標識した胞胚から胚盤を分離し、割球を解離した。この割球を一定時間、成長因子に浸漬した後、無処理の胞胚期の胚盤に移植した。このキメラ胚を培養し、形態形成を観察した。

4. 研究成果

(1) 胞胚期胚からの割球の回収

クエン酸を含むリングル液で平衡化したパーコールの 25% から 45% までの不連続密度勾配へ胞胚期から得られた割球を重層し、スウィングローターで遠心した。この遠心により、卵黄は密度勾配の最下層に位置した。割球の多くは 25-45% の境界面に集積したが、45% の下層から上層に至るまでの各層に、まんべんなく分布することが明らかとなった。これは、細胞質に不均一に含まれる卵黄が原因であると考えられた。これらの結果から、パーコールの密度勾配遠心により、割球を卵黄から分離して回収することは出来たものの、一部分の割球を失わずに全てを回収することは困難と考えられた。

(2) 解離した胞胚期細胞の分化能力の維持期間の解析

標識した中期胞胚より分離・培養したキンギョ割球を 20°C で培養後、直後、6 および 12 時間後に中期胞胚の中に移植した。直後の割球は、宿主の割球と混合し、様々な種類の細胞へと分化した。6 時間培養した割球は、限られた組織に分布することが多かったが、胚により、外胚葉組織、あるいは中胚葉組織に分化する割球が認められた。一方、12 時間培養した割球は、細胞塊を形成し、宿主胚の

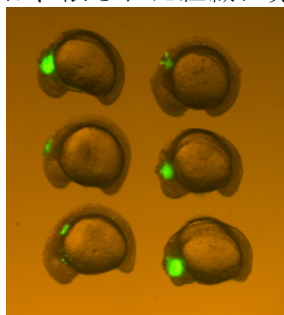


図 1. 12 時間培養された後に胞胚に移植された蛍光細胞の分布

外胚葉領域に細胞塊として分布した (図 1)。これは、移植の際に外胚葉に分化する動物極領域、あるいは中・内胚葉に分化する胚盤周縁域に移植しても同様の結果が得られた。

胚細胞は中期胞胚期 (受精 6 時間後) に採取された。この後 12 時間の培養は正常胚の発生では胚盾期に相当する。この時期には、胚細胞の分化の多能性は失われることが明らかになっている。この結果は、胚体外で培養された胚細胞がその中に組み込まれている分化のプログラムを進行させていることを予想させる。生殖細胞質により分化が決定されている始原生殖細胞 (PGC) は、胚体外の培養でプログラムの進行が遅れる。したがって、胞胚期に採取された体細胞系列の細胞を材料として用いる際には、長くても 6 時間以内に細胞塊形成などの発生工学的処理を行う必要が有る。

(3) 解離した胞胚期細胞からの細胞塊形成

① 発生学の分野では、囊胚以降の分化した胚の細胞を解離し旋回培養すると、最初に細胞塊を形成し、その後三胚葉の細胞が分離することが知られている。そこで、胞胚期の割球をクエン酸溶液で解離後、淡水魚用リングル液に置換し細胞未接着のシャーレに入れて水平方向の旋回培養を行なった。その結果、浮遊した細胞はシャーレの中央部に集まったものの、数個から数十個の細胞塊の形成は確認されたのみであった。胞胚期の胚盤に匹敵する大きさの細胞塊は形成されなかった。

② ① で用いたシャーレの中では、培養液の動きが大きく、細胞の集合が困難と考えられた。そこで、U 型底を持つ、細胞無接着の 96 穴培養シャーレに分離細胞を入れて旋回培養を行った。この条件下では、6 時間以上旋回培養を行った時に、胞胚期の胚盤に匹敵する大きさの細胞塊が得られた。この細胞塊の組織学的な切片では、細胞間に間隙が認められなかった。この細胞塊を胞胚の動物極側に移植した所、胚全体に組み込まれることは無く、胚軸の頭部に局在した。

③ ゼラチンコートされた細胞接着性のプラスチックシャーレの中で、解離させた割球を培養し、細胞塊の形成能力を明らかにした。その結果、解離直後に播種した割球は、活発な運動能力を示した。また、細胞密度が高い場合は、周辺細胞と小さな細胞塊を形成した。しかしながら、クエン酸を含むリングル液中で解離した状態で旋回培養を長時間行うと、運動能力を失って行くことが明らかとなった。このことは、解離状態での長時間の培養が、細胞の分化能力を失うという

結果と一致した。ゼラチンコートされていないプラスチックシャーレ上では、細胞は bleb を周囲に伸ばすのみで動くことは出来なかった。

④ 哺乳類の培養細胞に spheroid (球状の三次元細胞塊) を形成させることができる培養プレート (NanoCulture Plate) で、解離した胞胚期細胞の培養を行った。その結果、胞胚期細胞でも spheroid が形成された (図 2)。Spheroid の大きさは、プレートに播種した細胞の密度によった。多量の細胞を播種することで、多層の細胞層が形成された。

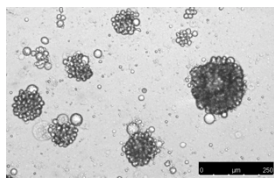


図 2. NanoCulture Plate 上に形成されたキングコウ胞胚期割球由来の spheroid.

NanoCulture plate 上に形成された spheroid は、b の無接着培養プレートでの旋回培養で得られた細胞塊同様、細胞間に間隙が認められなかった。培養液に含まれる Ca^{2+} 濃度を 1.8 から 0.4 mM まで変化させて培養したが、この細胞の接着状態に変化は無かった。

いくつかの培養条件では、細胞塊を形成させることが可能であったが、形成された細胞塊は胞胚とは異なる細胞結合を持っており、胚盤として機能させるためには、新たな処理が必要と考えられた。

(4) 解離した胞胚期細胞の分化能力の人為的な変更

① 有効な成長因子の探索

中胚葉を分化させると考えられている activin A、Activin B (ActB)、nodal、FGF4 および FGF8 を市販の recombinant 因子を購入し、中胚葉誘導能力を調べた。各成長因子を rhodamine と共に胞胚期胚盤の細胞間中に顕微注入した。その結果、ActB および FGF8 を注入した場合に、胚発生に影響が認められた。

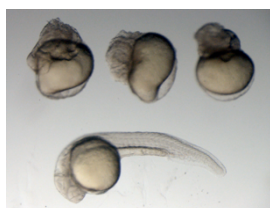


図 3. FGF8 を胞胚期に注入された 2 日後の胚 (上 3 個体) とその対照胚 (下)。

ActB 注入胚では、エピボリーが停止し、胚盤と卵黄細胞の分離が認められた。FGF8 の注入胚では、リチウム処理胚と同様の形態を示した (図 3)。

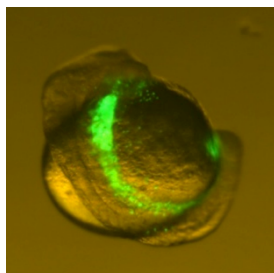


図 4. ActB を注入された胚盤からの胚盤を移植された胚。蛍光部分が移植細胞。

細胞質を FITC で標識した胞胚に ActB を注入し、この胚より割球を採取して無標識の対照胚へ移植した。その結果、標識された細胞は、移植胚の胚軸に沿って、脊索あるいは内胚葉領域に分布した (図 4)。さらに、ActB を溶解したリンゲル液に胞胚期の動物極半球 (アニマルキャップ) を浸漬したところ、細胞塊の伸張が認められた (図 5)。この伸張は、ActB 溶液への一分間の浸漬で誘導された。

これらの結果から、市販の ActB および FGF8 は、魚類胞胚期細胞への中胚葉誘導能力を持つと考えられた。以下の実験には ActB を用いた。

② 解離細胞への ActB 処理

FITC で標識した胞胚の割球を、クエン酸を含むリンゲル液中で解離した。その後、ActB を含むリンゲル液中に浸漬した後、無処理の胞胚へ移植し、発生を観察した。ActB 処理細胞を移植した胚の多くに二次軸が形成された。このことから、解離細胞においても ActB が有効であることが明らかとなった。

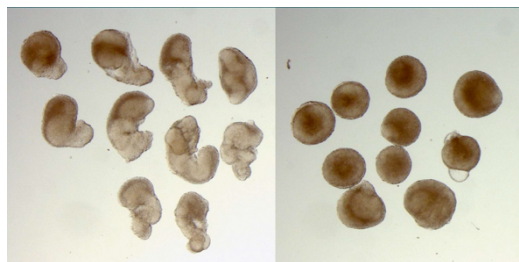


図 5. キングコウの胞胚期の胚盤上部への Activin B 処理による胚の形態。左: Activin B 処理胚。右: 無処理の対照胚。

無標識および FITC で標識した胞胚の割球を、クエン酸を含むリンゲル液中で解離した。その後、標識胚由来の細胞を、ActB を含むリンゲル液中に 1 時間浸漬した。無標識の解離細胞、標識され ActB 処理された解離細胞、およびそれらの混合細胞を NanoCulture Plate に播種し、spheroid の形成を確認した。どの細胞群も spheroid を形成した。混合細胞から形成された 24 時間後の三次元細胞塊では、標識細胞と無標識の細胞の分離は確認されなかった。

③ ActB 処理された解離細胞からの spheroid 誘導

無標識および FITC で標識した胞胚の割球を、クエン酸を含むリンゲル液中で解離した。その後、標識胚由来の細胞を、ActB を含むリンゲル液中に 1 時間浸漬した。無標識の解離細胞、標識され ActB 処理された解離細胞、およびそれらの混合細胞を NanoCulture Plate に播種し、spheroid の形成を確認した。どの細胞群も spheroid を形成した。混合細胞から形成された 24 時間後の三次元細胞塊では、標識細胞と無標識の細胞の分離は確認されなかった。

(5) まとめ

PGC が分化する条件での培養では、体細胞系列の解離細胞の多能性は維持されることが明らかとなった。一方、解離細胞の分化の方向性は、最適な市販の成長因子を用いることで変更が可能であることが明らかとなった。一方、三次元構造をもつ細胞塊は、培養条件を設定することで誘導できたものの、細胞間の結合が上皮様となり、胚体形成には不向きであると考えられた。胞胚本来の、最

外層が上皮で内部細胞が遊離状態という構造を誘導する技術が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山羽 悦郎 (YAMAHA, ETSURO)

(北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授)

研究者番号：60191376