

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687029

研究課題名(和文) 胚の体幹部を形成する体軸幹細胞の制御システム

研究課題名(英文) Regulation of axial stem cells deriving neural plate cells and mesoderm cells

研究代表者

竹本 龍也 (TKEMOTO, Tatsuya)

徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・助教

研究者番号：30443899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：1. 胚におけるWntシグナルに着目して、Wntシグナル強度と体軸幹細胞の維持・分化の関連を明らかにした。  
2. 体軸幹細胞の培養システムを構築するため、前駆細胞であるエピブラスト幹細胞から、培養条件の変化によって体軸幹細胞様の細胞状態を産み出した。この細胞、およびさらに分化した神経系・中胚葉系細胞における遺伝子発現を解析した。  
3. 体軸幹細胞の制御に関与する遺伝子群の機能を解析するため、ゲノム編集技術を活用した遺伝子改変マウスの作製法を確立した。

研究成果の概要(英文)：1. I have studied the relationship between the intensity of Wnt signal and the cell fate of axial stem cells.  
2. I have identified the culture condition to derive axial stem cells from epiblast stem cells, and analyzed the difference of expression patterns.  
3. I have established a new method to generate genetically modified mouse using CRISPR/Cas9 system.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞運命 転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の発生の初期過程は、大きく分けて頭部領域(脳領域)の成立と、体幹部の後方への伸長との2つからなる。申請者は、転写因子SOX2が神経系の原基である神経板に限局して発現することに注目して、その転写制御機構の研究を行い、それを発展させて次のことを示した [Takemoto T. et al. Nature (2011); Takemoto T. et al. Development (2006)]

- ・ 神経板成立の機構は、頭部と体幹部では大幅に異なる。実際、頭部神経板での Sox2 遺伝子の発現開始を担うエンハンサーN2 と、後方へ伸長する体幹部神経板での発現開始を担うエンハンサーN1 の制御は全く異なっている。
- ・ 体幹部の神経板は、原条の両側に存在する、神経系と中胚葉への分化能力を持つ「体軸幹細胞」から、中胚葉と分離されることによって成立する。体軸幹細胞では、ひとたび Sox2 エンハンサーN1 が活性化されるが、このなかで N1 活性を保持して、SOX2 を発現したものが神経板を形成する。
- ・ 体軸幹細胞の中で、原条を通過して中胚葉領域へと移動する細胞群では、転写因子 TBX6 の作用によって N1 エンハンサー活性を失うとともに、中胚葉へと発生する。

この研究結果は、体幹部の組織が、神経系と中胚葉との共通前駆体である「体軸幹細胞」の維持と、SOX2 に依存した神経板細胞、TBX6 に依存した中胚葉細胞のバランスのとれた産出によって成し遂げられることを示している。

- ・ 後者の制御が乱れた例に、Tbx6 遺伝子変異胚がある。この変異胚では、体軸幹細胞から中胚葉への分化が起こらず、代わりに Sox2 遺伝子が発現し、神経系へと分化する。

申請者はこの研究によって、「三胚葉が形成され分離した後に、外胚葉から神経系が誘導される」という古典的なモデルには大きな変更が必要であり、むしろ「体幹部の神経系は、神経系と中胚葉との共通前駆体である『体軸幹細胞』から、中胚葉と分離されることによって生みだされる」ことを示した [Takemoto T. et al. Nature (2011)]。

## 2. 研究の目的

本研究では、「体軸幹細胞」に対する2つの制御過程、体軸幹細胞の維持と、体軸幹細胞から、神経板細胞や中胚葉細胞への分化を導く制御の基本機構を解明する。

これまでの予備実験から、Wnt シグナルが、体軸幹細胞の2つの制御過程のいずれをも制御していることを示した。しかし、その制御は単純ではなく、次に述べる高次の制御システムの上に成り立っている。Wnt シグナルは、T-box 転写因子(Brachyury, Tbx6)の発現を制御するとともに、Brachyury が Wnt 遺伝子の発現を制御するという、相互制御機構があ

る。Wnt シグナルは、Sox2 エンハンサーN1 を活性化して神経へ発生を制御するが、中胚葉前駆体(未分節中胚葉)と、そこから体節への発生をも制御している。これらのことから、Wnt シグナルと、転写制御因子 Brachyury の相互依存的な活性化が、Sox2, Tbx6 の制御などと絡み合いながら、体軸幹細胞の維持と分化制御とのバランスをとっているものと考えられる。体軸幹細胞は、中枢神経系と中胚葉系の双方の原基であることから、その制御の異常が、神経系や排泄孔の形成不全などの先天異常の多くの場合の原因となっていると予想されている。

## 3. 研究の方法

(1) 体軸幹細胞の制御において、Wnt シグナルの作用は ON/OFF 的な効果をもたらすのではなく、シグナルの強度によってその効果を変えることが示唆された。そこで、Wnt シグナルレポーターマウスを用いて、細胞が授受した Wnt シグナル強度と、胚の中の空間分布と、その分化制御の関連を解析する。

同時に、Wnt シグナルによって制御される転写因子 SOX2, Brachyury, TBX6 が、相互の分化制御に果たす役割、また、Wnt シグナルへの feedback 作用を解析する。

Wnt シグナルレポーターマウスを作成し、研究に用いる。Sox2, Brachyury, Tbx6 遺伝子の発現制御状態を可視化できるように蛍光タンパク質を組み込んだ遺伝子改変マウスを作成する。

マウス胚の全胚培養条件下でのライブイメージングを行い、Wnt シグナル強度と、体軸幹細胞の維持・分化の制御との相関を明らかにする。培養マウス胚の、個々の細胞での Wnt レポーターの強度を測定し、特定の Wnt シグナル量にある細胞を標識する。その細胞制御状態をライブイメージングによって追跡する。Wnt シグナルの強さ(量)と、体軸幹細胞の制御状態、空間配置を比較分析する。

(2) 体軸幹細胞において、幹細胞状態を規定し維持する遺伝子制御ネットワークを解明する。また、幹細胞状態から SOX2 に依存した神経系、TBX6 に依存した中胚葉への遷移において変動する遺伝子群を解析する。それぞれの遺伝子群の、体軸幹細胞の維持や分化での役割を明らかにする。

これらについての詳細な分子機構を研究するために、「体軸幹細胞」を培養条件下で単離・純化する。培養体軸幹細胞を用いて、転写因子や作用シグナルを操作した上で、内在遺伝子発現の変動について詳細な解析を行い、遺伝子制御ネットワークを明らかにする。そして、それらが実際にマウス胚の中で働いているかを、胚への遺伝子発現操作・細胞操作などを行い検証する。

体軸幹細胞の培養条件の検討。マウス胚の原条周辺領域からの体軸幹細胞の単離、あるいは EpiSC (Epiblast stem cells) から培養操作

によって体軸幹細胞を生み出し、それらを安定に培養する。体軸幹細胞は Sox2 エンハンサーN1 の活性によって検出できる。マウス胚の細胞群、EpiSC 由来の細胞群のなかでエンハンサーN1-EGFP を発現するものを選択し、単離することを計画している。Wnt シグナルは、体軸幹細胞の増殖・維持に必須であることを確認しているため、Wnt リガンド、もしくは Wnt シグナル活性化薬剤を様々な濃度で添加するなどの条件検討を行う。培養体軸幹細胞、そこから派生する神経板細胞、中胚葉細胞の各々の細胞群について、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析によって比較分析する。培養体軸幹細胞からの分化は、Wnt シグナル強度の操作によって行い、Sox2, T-box 因子の発現をそれぞれ神経板、中胚葉への発生の指標とする。

#### 4. 研究成果

(1) Wnt シグナルは、体軸幹細胞の維持のみならず、神経板や中胚葉細胞への分化の制御も担っている。Wnt シグナルと体軸幹細胞の維持・分化の制御との関連を明らかにするため、胚の個々の細胞における Wnt シグナル強度を計測できるマウスの作製を行った。マイクロインジェクションによる従来のレポーターマウスの作製法では、レポーターの発現がゲノム挿入部位によって大きく異なり、シグナル強度を評価するのが困難であったため、本研究では、Wnt レポーターを安定的ゲノム領域として知られる Rosa26 遺伝子座に挿入することにより作製した。作製したレポーターマウスは安定的かつ、シグナル強度に応じてレポーターを発現した[Takemoto T, et al *Genes Cells* (2016)]。このマウス R26-WntVis を用いて、原条領域における Wnt シグナル強度と、細胞分化の制御の関係を解析した。

(2) 体軸幹細胞のうち神経板細胞へと発生する細胞集団において転写因子 Sox2 および Sox3 が発現し、その作用によって神経板細胞の中胚葉層への移動が抑制されることを見いだした。Sox2 および Sox3 遺伝子を欠失させたマウス胚では、正常胚と比較して多くの細胞群が中胚葉層へと移動していることが観察された。

本研究により、体軸幹細胞から神経板へと発生した細胞集団が、もう一方の細胞運命である体節中胚葉細胞と分離される仕組みの一端を明らかにすることができた[Yoshida M. et al. *Mech Dev* (2014)]。

(3) 体軸幹細胞の前駆細胞であろうと予想されるエピプラスト幹細胞を出発点とし、培養条件を変化させることで体軸幹細胞へと派生させることを計画した。胚を用いた研究から、体軸幹細胞は Wnt, Fgf, Bmp シグナルによって制御されていることが予想された

ため、これらのシグナル存在下でエピプラスト幹細胞の培養を行った。その結果、体軸幹細胞の状態 (Sox2 low / Brachury low) を作りだした。また、上記3つのシグナル濃度等を変更することで、神経板への分化、および中胚葉への分化を産み出すことができた。現在、それぞれの細胞集団を特徴づける遺伝子発現の解析を行っている。この中には、体軸幹細胞の維持/分化を制御する転写因子群が含まれていると予想しており、この転写因子群の同定を行った。

(4) 従来、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムによる遺伝子改変マウスの作製には、高度な技術が必要とされ、また多くの時間を要していた。私は、エレクトロポレーション法を用い受精卵に 98%以上という極めて高効率に CRISPR/Cas9 システムの因子である Cas9 mRNA と sgRNA を導入することにより、簡便かつ効率的 (95%以上の効率) に遺伝子改変マウスを作製することに成功した。本手法は特別な技術を必要とせず、短時間で遺伝子改変マウスの作製が可能であり、本研究課題の飛躍的な進展が可能になる[Hashimoto M, et al *Sci Rep.* (2015)]。

#### 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)

Takemoto T, Abe T, Kiyonari H, Nakao K, Furuta Y, Suzuki H, Takada S, Fujimori T, Kondoh H. R26-WntVis reporter mice showing graded response to Wnt signal levels. *Genes Cells*. (In press) (2016) 【査読有】DOI: 10.1111/gtc.12364.

Hashimoto M, Takemoto T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep.* 5: 11315 (2015) 【査読有】DOI: 10.1038/srep11315

Yoshida M, Uchikawa M, Rizzoti K, Lovel-Badge R, Takemoto T, Kondoh H. Regulation of mesodermal precursor production by low-level expression of B1 Sox genes in the caudal lateral epiblast. *Mech Dev.* 132: 59-68 (2014) 【査読有】DOI:10.1016/j.mod.2014.01.003

Nishimura N, Kamimura Y, Ishida Y, Takemoto T, Kondoh H, Uchikawa M. A systematic survey and characterization of enhancers that regulate Sox3 in neuro-sensory development in comparison with Sox2 enhancers. *Biology* 1: 714-735

(2012) 【 査 読 有 】  
DOI:10.3390/biology1030714

Kondoh H, Takemoto T. Axial stem cells deriving both posterior neural and mesodermal tissues during gastrulation. *Curr Opin Genet Dev.* 22 (2012): 1-7 【査読有】DOI: 10.1016/j.gde.2012.03.006.

〔学会発表〕(計 4 件)

Tatsuya Takemoto, Masakazu Hashimoto 「High-throughput production of mutant mice by electroporation of CRISPR/Cas9 system」(シンポジウム・口頭発表) Mouse Molecular Genetics 2015, Cambridge (イギリス), 2015年9月17日

Tatsuya Takemoto, Hisato Kondoh 「The role of Tbx6 in the derivation of mesodermal tissue from the axial stem cells」(口頭発表) 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, ウィンク愛知(愛知県名古屋市), 2014年5月28日

竹本龍也 「転写制御機構から神経系成立のしくみを探る」(招待講演) 第52回日本先天異常学会学術集会、東京女子医科大学弥生記念講堂(東京都新宿区), 2012年7月7日

Tatsuya Takemoto, Hisato Kondoh 「Regulation of axial stem cells deriving neural and mesodermal tissues」(シンポジウム・口頭発表) 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市), 2012年5月31日

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: Cas9 mRNA を哺乳動物の受精卵にエレクトロポレーションにより導入する方法  
発明者: 竹本龍也、橋本昌和  
権利者: 徳島大学、橋本昌和、ベックス  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-031006  
出願年月日: 2015年2月19日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
徳島大学藤井節郎記念医科学センター・初期発生研究分野ホームページ  
[http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/embr\\_yology/](http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/embr_yology/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 龍也 (TAKEMOTO, Tatsuya)  
徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・  
助教

研究者番号: 30443899