

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25650079

研究課題名(和文) ES細胞の組織化におけるLefty1発現細胞の意義とその機能

研究課題名(英文) The role of Lefty1 expression cells during the ES cell self-organization.

研究代表者

高岡 勝吉 (Takaoka, Katsuyoshi)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：90551044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：高度な構造をもつ人工臓器を作製するためには、位置情報の獲得が重要である。マウス胚においてLefty1は前後軸・左右軸の獲得に重要である。また、ES細胞において、Lefty1が発現していることが報告されている。本研究では、ES細胞の自己組織化におけるLefty1発現細胞の役割を明らかにしたい。

実験の結果、ES細胞のコロニー形成時にLefty1は縁の細胞で発現を開始することが明らかになった。また、Lefty1,2ノックアウトES細胞は野生型と同様にコロニー形成能を有していた。今後、Lefty1,2ノックアウトES細胞が胚葉体形成するかどうかを明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：The acquirement of positional informations is essential for the making of structurally-complicated artificial organs. In mouse embryos, Lefty1 is a key player during the Left-right and an anterior-posterior axis formation. And, it is known that Lefty1 is expressed in ES (Embryonic Stem) cells. In this study, I have tried to reveal the role of Lefty1 expression cells in the self-organization of ES cells.

As a result, time-lapse observations of Lefty1 expressing cells in the formation of colony showed that the expression of Lefty1 started in edge cells of the ES colony. And, Lefty1,2 null ES cells normally formed colonies. Hereafter, I'm going to reveal which do Lefty1,2 null ES cells form embryoid bodies.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物

キーワード：再生医療 自己組織化 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞から複雑な構造を持つ臓器を作るためには、目的の臓器の細胞を誘導するだけでなく、細胞集団へ正確な位置情報を与えることも重要である。本研究で着目する *Lefty1* は、マウス胚において、左右・前後軸形成という位置情報の獲得に関わる遺伝子であり、ES 細胞においても、位置情報の獲得に関与していることが期待された。

本研究では、ES 細胞の組織化における *Lefty1* 発現細胞の意義と機能を解明することを目的とし、均一な ES 細胞が、集団の中でどのように位置情報を獲得し、秩序立った組織を形成するかという自己組織化メカニズムの一端を明らかにすることで、将来の再生医療への応用を目指す。

2. 研究の目的

現在、ES 細胞や iPS 細胞から様々な細胞の誘導の研究が盛んに行われ、人工臓器の作成が現実のものとなりつつある。しかし、心臓や肝臓といった高度な構造を持った機能的な臓器を作成するためには、誘導した細胞群に正確な位置情報を与え、組織化させることが重要となってくる。

本研究で着目する *Lefty1* は、TGF- β スーパーファミリーに属し、脊椎動物胚の左右軸や前後軸といった体の位置情報を制御する因子である。加えて、申請者はこれまでに、マウス胚盤胞の ICM(内部細胞塊)細胞のうち、数細胞で *Lefty1* の発現が見られ(Takaoka *et al.*, Dev. Cell 2006)、この数細胞が将来の前後軸形成を決める細胞となる (Takaoka *et al.*, Nature cell biology 2011)ことを明らかにした。つまり、マウス胚の ICM 細胞の内、数個の *Lefty1* 発現細胞が将来の前後軸を決定する(Takaoka *et al.*, Development 2012)

ES 細胞は、マウス胚盤胞の ICM 細胞から樹立されることから、ES 細胞においても、マウス胚と同じく、数細胞の *Lefty1* 発現細胞

は、細胞の均一性を破り、組織の位置情報を司る細胞であると期待した。

以上より、本研究では、ES 細胞の組織化における、*Lefty1* 発現細胞の意義と機能を明らかにすることを目的とし、ES 細胞の組織化メカニズムの一端を解明することで、将来の再生医療への応用を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、*Lefty1* 発現細胞の意義と、*Lefty1* の機能、を明らかにし、*Lefty1* を突破口に ES 細胞の組織化における位置情報の獲得メカニズムを明らかにする。本研究の完了により、ES 細胞から誘導した細胞集団の位置情報を自在に操ることができるようになり、将来の人工臓器の実現へ向けた基礎的知見と技術を提供する。

Lefty1 発現細胞の意義

LIF 存在下の ES 細胞のコロニー形成における、ES 細胞の挙動と *Lefty1* 発現細胞の挙動を経時観察で追跡した。具体的には、*Lefty1* 発現細胞に膜移行型緑色蛍光タンパク質が発現する *Lefty1(memVenus)* トランスジェニック ES 細胞を樹立し、経時観察で詳細に追跡した。

Lefty1 の機能

マウス胚発生過程において、*Lefty1,2* は前後軸、左右軸の形成において重要な機能を担うことから、ES 細胞でも位置情報に関わっていると予想した。また、*Lefty2* も ES 細胞で発現している可能性を考え、*Lefty1, 2* ノックアウト ES 細胞を樹立した。

4. 研究成果

本研究では、心臓や肝臓といった精巧な人工臓器の作成を最終目標に掲げ、第一段階として、*Lefty1* 発現細胞の意義と、*Lefty1* の機能を明らかにした。

Lefty1 発現細胞の意義

ES 細胞において *Lefty1* 発現細胞で黄緑

色蛍光タンパク Venus が発現する *Lefty1(memVenus)* トランスジェニック ES 細胞を樹立し、1細胞からコロニー形成時において発現細胞の挙動をリアルタイムでイメージング観察した。単一細胞の際には、*Lefty1* の発現は見られなかったが、数細胞の集団になると1細胞で *Lefty1* が発現を開始し、コロニー形成時には、エッジ部の細胞にのみ発現するという特徴的な発現細胞の挙動を発見した。同様の発現パターンを示す遺伝子は報告されておらず、また全ての細胞は Nanog 陽性であり、未分化状態を維持していた。この発見は、*Lefty1* 発現細胞がマウス胚同様、細胞の均一性を破り、組織の位置情報を司る細胞である可能性を示唆していた。

Lefty1,2の機能

まず *Lefty1,2* ノックアウトマウスを用いて *Lefty1,2* ノックアウト ES 細胞を作製した。遺伝子判定には PCR 法を用いた。まず、コロニー形性能を調べたが、野生型の ES 細胞と同等のコロニー形性能を有することを明らかにした。今後、LIF 非存在下の中空の胚様体の形成実験などを行い、野生型とノックアウト ES 細胞においてどのような表現型の違いが見られるか観察する予定である。

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 0件)

[学会発表](計 4件)

Katsuyoshi Takaoka, Origin of Anterior-Posterior axis formation in the mouse embryo. 第46回 日本発生生物学会、2014.5、島根

Katsuyoshi Takaoka & Hiroshi Hamada,

Origin of Anterior-Posterior axis formation in the mouse embryo.

NIBB 岡崎カンファレンス、2014.07、愛知
高岡勝吉、マウス胚における非対称性の起源、発生生物学会秋期シンポジウム 2014.11、兵庫

Katsuyoshi Takaoka & Hiroshi Hamada, Origin of Anterior-Posterior axis formation in the mouse embryo. 分子生物学会 2014.12、兵庫

[図書](計 1件)

Katsuyoshi Takaoka, Establishment of Anterior-Posterior axis in the mouse embryo, New Principles in Developmental Processes, 13-27, Feb.28. 2014

[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

高岡 勝吉 (TAKAOKA KATSUYOSHI)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：90551044

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし