

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510221

研究課題名（和文） システムイメージングを用いた外胚葉分化の包括的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of the ectoderm differentiation using the system imaging

研究代表者

吉田 千春（YOSHIDA CHIHARU）

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター（研究所）

研究者番号：60360666

研究成果の概要（和文）：マウス初期胚における胚性外胚葉は、将来の神経となる「神経外胚葉」と、将来の皮膚となる「表皮外胚葉」へと分化することが知られている。そこで、これら組織間（神経外胚葉と表皮外胚葉）でマイクロアレイを行い、表皮外胚葉で優位に発現する *Grainyhead-like* (*Grhl*) ファミリーに着目した。*Grhl* 遺伝子を恒常的に発現するトランスジェニックマウス胚では、神経上皮の一部で表皮マーカーが誘導され、また逆にドミナント-ネガティブ型 *Grhl* 遺伝子を発現させると、神経マーカーが過剰に発現誘導し胚性致死となることがわかった。これらの研究結果から、*Grhl* ファミリー因子は、表皮外胚葉へ率先して誘導する機能をもっており、「表皮マスター因子」ともいえる働きを持つことが示唆された。さらに、マイクロアレイのデータをさらにシステム解析（カスケード解析、プロモーター解析）を行い、カノニカル Wnt 経路が表皮外胚葉の上流で働くキーとなるシグナルとして挙げられた。

研究成果の概要（英文）：The embryonic ectodermal cells in the mouse embryo is known to differentiate to neural ectoderm, a prospective the central nervous system, and surface ectoderm, a prospective skin, respectively. To elucidate the molecular mechanisms of the cell fate specification between surface ectoderm and neural ectoderm, at first, the comprehensive research of whole genes expression was conducted using the microarray between surface ectoderm versus neural ectoderm. Then, we identified the *Grainyhead-like* family, which has *CP2* transcriptional factor and highly express in the surface ectoderm. Next, we performed the functional analysis with generating transgenic mice in which ectopically *Grhl2* and dominant-negative *Grhl* transgenes are expressed. By these transgenic mouse phenotypes, we suggested that *Grhl* play a pivotal role in an epidermal differentiation as an “master gene”. Additionally, systematic approaches (cascade analysis and promoter analysis) have revealed that canonical Wnt has functions in the upstream of surface ectodermal factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

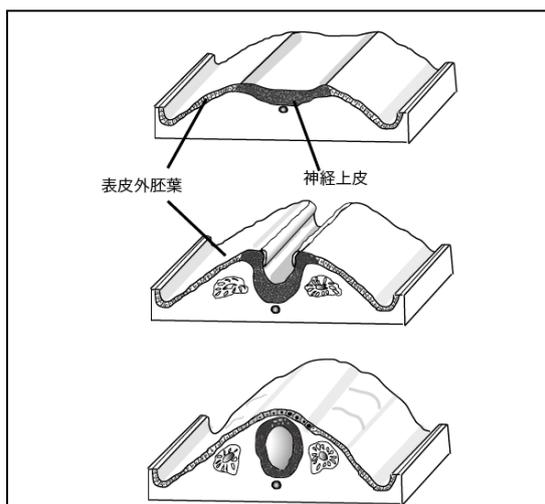
キーワード：発生分化

1. 研究開始当初の背景

マウス初期胚では、受精後 6.0 日目以降に原条形成が起き、内胚葉、外胚葉さらに中胚葉の 3 胚葉で構成される。中でも、外胚葉からは、将来の神経系を構成する「神経外胚葉」、また将来の骨格系や筋肉組織を形成する「神経堤細胞」、さらに将来の表皮となる「表皮外胚葉」が生じる。マウス遺伝学を用いた実験や、蛍光色素を注入し細胞の分布を追う細胞系譜実験から、受精後 6.5 日目の外胚葉細胞が将来どういった細胞に成るかきまっているとされている。しかしながら、これら運命決定（又は細胞の特異化）が、どの様な分子機序によって決定されているかについては、未だ不明な点が多い。

またこれら運命決定は、細胞系譜などの報告から発生のどの時期から運命決定がなされるのかという点については多くの研究者による報告があるのに対し、逆にいつ運命決定が終了するかという問題についてはあまりわかっていない。この理由については、どの細胞がどの時期まで多分化能（又は未分化能）をもつのかという指標のもと、個体内の細胞を調べる困難さによるものだと考えられる。

ここで発生段階における、神経上皮と表皮外胚葉組織の関係を見てみると、これら組織は、神経胚期(8.0 日目頃)で、胚の吻尾軸に沿って隣り合って（繋がって）存在している(下図)。そして、神経管が閉鎖する際には、神経板から管になるために、これらの隣接した領



域が折れ曲がり、神経上皮と表皮外胚葉が分かれる。そして、最も外側で、様々な組織を覆う表皮外胚葉と、その内側で管となって位置する神経管とに分かれる。この一連の形態変化は、神経上皮と表皮外胚葉が完全に分かれるタイミングのようにも思える。しかしながら、この過程でこれら組織間に、どの様な

細胞の動きや遺伝子発現変化を伴って、完了しているかこれまで明らかにされていない。

また、これまで神経上皮の誘導においては、詳細に研究がなされている。例えば、レチノイン酸投与であるとか、Fgf シグナルの活性化、Bmp/Wnt シグナル抑制による神経誘導は、アフリカツメガエルを用いた実験などで多くの報告がある。一方、表皮外胚葉の誘導メカニズム、あるいはそれ自身の細胞動態についてあまり研究が進んでいない。その理由は、表皮外胚葉は単層の細胞層であり、そのため細胞数が少なく、種々の生化学的な解析には不適である。また、約 1 日発生が進むと、periderm 細胞が出現し、多層化が始まる。そのため、単層である「表皮外胚葉」と位置づけられている最も初期の表皮細胞は単層構造を変えた時にはそこで発現する遺伝子群も変化すると考えられる。これら要因により、これまで表皮外胚葉で特異的に発現するマーカー遺伝子もあまり知られていない状況である。

2. 研究の目的

本申請課題では、表皮外胚葉に注目し、同じ細胞由来の神経上皮と比較することによって、表皮外胚葉で特異的に発現する因子をマイクロアレイ法によって、網羅的に探索する。また、得られた表皮外胚葉で発現する因子の中でも、特に、表皮外胚葉を生み出すのに必須な因子、「表皮マスター因子」の同定を試みる。また前述のマイクロアレイで得られたデータを元にシステム解析（プロモーター解析やカスケード解析）を行うことによって、これら表皮外胚葉細胞の出現させるシグナルを予測する。

3. 研究の方法

(1) 表皮外胚葉と神経上皮の間でマイクロアレイを行い、各組織で発現する因子の網羅的探索；受精後 8 日目胚(神経胚期)の野生型マウス胚を HBS バッファー内で解剖し、酵素処理（トリプシン・パンクレアチン酵素処理）を行う。その後、神経上皮、表皮外胚葉組織に分離する（この時出来るだけ間葉細胞は、両組織内にコンタミしないように取り除く）。その後、RNA を抽出し、マイクロアレイを行う。そして、優位差検定を行い、2 倍以上の発現に差が見られる因子に関して、特異的な領域をクロニングプローブとして、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって内在性発現の確認を行う。

(2) 表皮外胚葉優位に発現する因子の個体レベルでの機能解析；(1)の実験結果から得られた因子の中でも特に、表皮優位に発現する転写因子に着目して個体内における機能解析

を行う。具体的には、まずGO解析によって、得られた遺伝子群の構造ドメインをもとに、各遺伝子の機能を予測し、中でも核内タンパク・転写因子に属する因子を抽出する。表皮優位で発現する因子を、マウス胎児全体に、かつ恒常的に発現させるようなトランスジェニックマウスを作製し、表現系解析を行う。得られる過剰発現マウスが胚性致死となり、胎児期の表現系解析が困難となる可能性を考慮し、*Cre-loxP*システムを用いて時期、組織特異的なシステムで解析を行う。

表現系の解析には、組織学的な手法に加え、種々の組織特異的なマーカーを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法や、免疫組織染色法を用いて解析を行う。

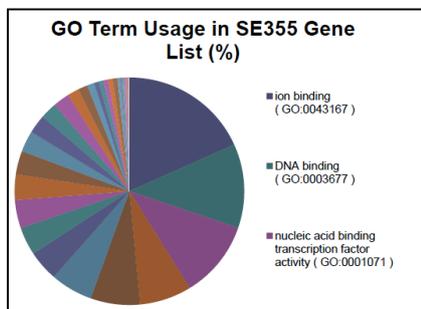
(3) マイクロアレイで得られた因子のシステム解析 (プロモーター解析、カスケード解析); BIOBASE 社が開発した **Upstream Analysis** は TRANSFAC データベースを用いて遺伝子の転写開始点付近にある転写因子結合サイトを分析し、その結果得られた転写因子の結合パターンから発現量の変化を説明できるシグナル伝達カスケード及びそのカスケード上流にあるシグナルを予測を行った。

4. 研究成果

(1) 表皮外胚葉と神経上皮との間でマイクロアレイを行い各組織で発現する因子の網羅的探索;野生型マウス胚を、神経外胚葉で134胚分、表皮外胚葉では339胚分を回収し、各RNAを抽出した。その後のアレイに関しては、九州大学教育・研究支援センターとの共同研究で行った。また、優位差検定により2倍以上の優位差を持って発現の変動が見られる遺伝子のみを選択した。この検定法により、神経上皮では236遺伝子、表皮外胚葉では355遺伝子が各組織で優位に発現していることが示唆された。これら因子について、クラスタリング解析や、GO解析を行い、表皮外胚葉で得られた遺伝子の中で33個の遺伝子が転写因子であると予測され。その中でCP2ドメインを持った転写因子 *Grainyhead-like* ファミリー (*Grhls*) に着目することにした。*Grhl2/3* 因子の内在性の発現は、吻尾軸に沿って non-neural の領域に発現していた。

さらに、興味深いことに、*Grhl2* と *Grhl3* 遺伝子は互いに入れ

子式で発現しており、*Grhl2* 遺伝子はより吻側、*Grhl3* は尾側で発現していることがわかった (*Grhl* ファミリー遺伝子には *Grhl1*、*-2*、*-3* と存在するが、*Grhl1* 遺伝子は神経胚期に発



現活性が見られないため、*Grhl2/3* 遺伝子のみに着目している)。

(2) 表皮外胚葉優位に発現する因子の個体レベルでの機能解析; (1)の結果から *Grhl* ファミリーに絞り込み、個体内における機能解析を行った。結果、*Grhl2* 遺伝子を全身に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した場合、8.5日目付近で神経上皮の一部で表皮マーカーが異所的に発現し、その後胎生致死となることがわかった (ちなみに、*Grhl3* 遺伝子の過剰発現マウス胚では着床前の時期で既に胚性致死となる)。

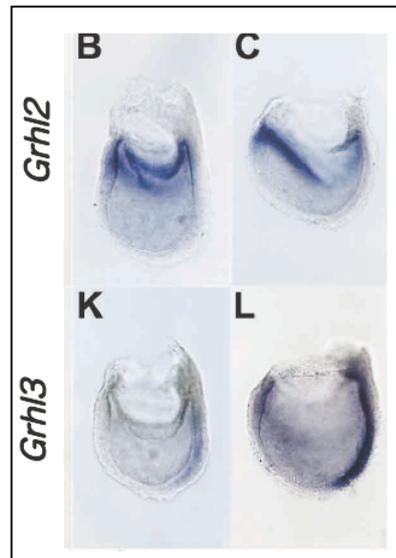
逆にこの転写因子のドミナント-ネガティブ型 (*DN-Grhl3*) を過剰発現させた場合、*N-cadherin* などの神経マーカーの過剰な蓄積が見られ、その後胚性致死となることがわかった。

以上の結果から、神経上皮と表皮外胚葉の運命決定に、*Grhl* ファミリーの発現量と場所が適切であることが、正常発生に必須であることが示唆された。

(3) マイクロアレイで得られた因子のシステム解析 (プロモーター解析、カスケード解析); 得られた表皮外胚葉優位に発現する因子のシステム解析を行った結果、カノニカル Wnt 経路上位に位置し、制御している可能性が示唆された。実際、遺伝的な交配実験から、*Grhl* 遺伝子群とカノニカル Wnt 経路との関わりがあることがわかった。

以上の結果から、我々が行った神経上皮と表皮外胚葉とのマイクロアレイによって、これまで

あまり知られていなかった表皮外胚葉特異的に発現する因子が、数多く同定することが出来た。また、それら遺伝子の中には、個体レベルで表皮外胚葉を異所的に誘導するような表皮マスター因子も含まれていることがわかった。



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4件)

1) Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. Isao Matsuo and Chiharu Kimura-Yoshida. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2013) (in press) [査読有]

2) *Brd2* is required for cell cycle exit and neuronal differentiation through the *E2F1* pathway in mouse neuroepithelial cells. Mami Tsume, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Yukinao Shibukawa, Saori Amazaki, Yoshinao Wada, Ryuji Hiramatsu, Kayo Shimokawa, and Isao Matsuo. *Biochemical Biophysical Research Communications* [査読有] 425, 762-768 (2012)

3) Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo.*Kayo Shimokawa,*Chiharu Kimura-Yoshida (*equal contribution), Naoko Nagai, Kazuhiro Mukai, Kazumi Matsubara, Hideto Watanabe, Yoichi Matsuda, Kyoko Mochida and Isao Matsuo. *Developmental Cell* [査読有] 21, 257-272 (2011)

4) A genetic study of the effects of reduced *Frs2a* gene dosage in exostoses development and cartilage abnormalities observed in *Ext2* heterozygous mutant mice. Khondokar Nasirujjaman, Chiharu Kimura-Yoshida, Noriko Gotoh, Ryuji Hiramatsu and Isao Matsuo.

Journal of Osaka Medical Center & Research Institute for Maternal & Child Health [査読有] 26, 101-108 (2011).

[学会発表] (計 2 件)

1) Chiharu Kimura-Yoshida and Isao Matsuo
Dickkopf1, an antagonist for canonical Wnt signaling, regulates determination between neuroectoderm and surface ectoderm from ectodermal cell lineage. *Mouse Molecular Genetics Meeting* 2012.10.04
Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA, USA ポスター

2) Chiharu Kimura-Yoshida and Isao Matsuo.
Dickkopf1, an antagonist for canonical Wnt signaling, regulates determination between neuroectoderm and surface ectoderm from ectodermal cell lineage. *Stem Cell Biology* 2011.9.20-24 Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA, ポスター

[図書] (計 5 件)

1) FGF シグナル制御の新たな制御機構-新規な活性調節分子の発見と関連疾患治療の最先端 「基礎の基礎」
松尾 勲、後藤典子、下川佳世、木村-吉田千春 細胞工学 31, 402-408 (2012) [査読無]

2) ヘパラン硫酸鎖を介した FGF シグナルの局所的な受容機構
松尾 勲、木村-吉田千春、下川佳世 細胞工学 31, 426-431 (2012) [査読無]

3) マウスの胚において細胞膜表面のヘパラン硫酸鎖は FGF シグナルの局所的な受容に働く
下川佳世、木村-吉田千春、松尾 勲. ライフサイエンス新着論文レビュー [査読無]
[http://first.lifesciencedb.jp/archives/3537\(2011\)](http://first.lifesciencedb.jp/archives/3537(2011))

4) Wnt シグナルとマウス前後軸決定 ~Wnt拮抗因子 *Dickkopf1* 遺伝子に着目して~
木村-吉田千春、平松 竜司、松尾 勲. 医学のあゆみ [査読無] 233 (10), 985-992 (2010) 医歯薬出版

5) BET ファミリーとエピジェネティックな遺伝子発現制御機構
爪 麻美、木村-吉田千春、松尾 勲
大阪府立母子保健総合医療センター雑誌 [査読有] 26(1), 10-15 (2010)

[その他]

ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/inst/mc/h/Byo/Byo.html><http://www.pref.osaka.jp/fumin/html/15517.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
吉田 千春 (YOSHIDA CHIHARU)
地方独立行政法人 大阪府立母子保健総合医療センター (研究所)・研究員

研究者番号 : 60360666

(2) 研究分担者
松尾 勲 (MATSUO ISAO)
地方独立行政法人 大阪府立母子保健総合医療センター (研究所)・部長

研究者番号 : 10264285