

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770259

研究課題名(和文) マウス栄養外胚葉細胞の分化決定機構

研究課題名(英文) Analysis of Cdx2 gene expression patterns and cell movement in mouse preimplantation embryos by live-cell imaging

研究代表者

豊岡 やよい (TOYOOKA, Yayoi)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教

研究者番号：20360597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、将来胎盤を形成する細胞系譜である栄養外胚葉(trophectoderm)細胞の分化決定機構について明らかにすることを目的としている。我々は着床前胚におけるtrophoblast細胞の分化のトリガーとなる転写因子Cdx2の発現局在を解析し、Cdx2の発現は胚の外側に位置する全ての細胞で開始するが、そのうち一部の細胞は内側へと移動し、未分化細胞であるICM(内部細胞塊)に寄与することをライブイメージング観察により明らかにした。一度分化誘導因子を高発現した細胞がそれを抑制し未分化状態に戻るという現象を観察したのは、当該研究が初めてであると思われる。

研究成果の概要(英文)：Establishment of Trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) is the first cell lineage segregation in mouse development. Determination of the TE cell lineage is thought to be triggered by expression of Caudal-type transcriptional factor Cdx2 gene. To examine detailed expression patterns of Cdx2 and cell behavior during preimplantation development, we established Cdx2-EGFP reporter mice by which endogenous expression of Cdx2 can be visualized as EGFP fluorescence. We observed preimplantation embryos from Cdx2-GFP reporter mice by live-imaging, and found that cells internalized during morula stage once started to express Cdx2 when they were localized in outer position, then after internalization they participated in ICM and down-regulated Cdx2. These data suggest that these internalized cells can re-repress TE-specification pathway once activated, and behave as a part of pluripotent cell population.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類モデル動物であるマウスの発生過程においては、受精直後の胚を構成する細胞は全て等価に全能性を持ち、胚体および胚体外組織全ての細胞種を生み出すことが可能であるが、胎生3日目の着床前胚において最初の細胞分化が起こり、将来胎盤を形成する細胞系譜である栄養外胚葉 (trophectoderm) を外側に、将来胚体を形成する未分化細胞集団である内部細胞塊 (Inner Cell Mass; ICM) を内側に持つ胚盤胞と呼ばれる発生ステージへと移行する。等価な細胞で構成された集団から2つの細胞系譜が作り出される機構は未だ明らかではないが、細胞表面からの何らかのシグナルにより胚体内の細胞が各々の位置を認識し、外側にある細胞はTrophoblastへと分化し内側の細胞は未分化なままICMとして維持されるのではないかという仮説(表層シグナル仮説)と、細胞分化はランダムに起こり、その後trophectodermを形成するtrophoblastと呼ばれる細胞は胚の外側へと、ICMは内側へと移動するのではないかという仮説(sorting説)が申請当時は提唱されていた。現在では外側内側という動きをする細胞は観察されるが、内側外側という動きをする細胞はいないという観測データが報告され、sorting説はほぼ否定されつつある。その後trophoblastとICMの細胞運命の分岐(segregation)について、着床前胚の外側に位置する細胞がtrophoblastに、内側に位置する細胞がICMに運命決定され、その機構は細胞接着を認識することで細胞自身が自らの位置を感知し、2つの細胞系譜のうちの正しい方へと分化するということが、幾つかの細胞接着を認識する分子のノックアウトマウスの解析結果の報告により示され、表層シグナル説がこの分野の主流となった。しかしながら細胞運命が決定される時期の胚において、前述したように外側内側という細

胞の移動があることと、そのような細胞の移動と細胞接着によるポジションの認識機構という話との整合性はついておらず、初期胚発生の研究分野において、未だ共通認識は無い状態である。

2. 研究の目的

前述の胚の外側内側へと移動する細胞への初期胚研究者の関心は非常に高いが、それらの細胞が未分化なICMになるべくして内側に入るのか、それとも外側に居る間はtrophoblast前駆細胞として振る舞うが、内側に入った後にはICMの細胞としてある種の分化転換を行うのかを追求できた研究者はこれまでいなかった。また、申請当時の初期胚研究は、胚を固定し抗体で染色する手法が主であり、生きた胚における細胞のポジションの移動をクリアーに観察したという報告は殆ど無かった。我々はtrophoblast/ICMの運命決定の際の個々の細胞のポジションと細胞分化との関連性を調べる目的で、trophoblast細胞の分化のトリガーであり、trophoblastの分化マーカー遺伝子として最もよく使用される転写因子であるCdx2の発現をGFPの蛍光によりレポートすることのできるマウス系統を作製し、連続的に観察する計画を立てた。

3. 研究の方法

BAC modificationの手法によりCdx2の発現をGFPの蛍光で可視化できるトランスジェニックマウス系統を作製し、さらにその系統と、全ての核をmCherryでモニターすることが出来るマウス系統(ROSA26-H2B-mCherry)を交配し、得られたダブルマーキングマウスの着床前胚を使用してライブイメージングを行い、trophoblastへの分化(Cdx2-GFP)と細胞の動き(H2B-mCherry)について同時にデータを取得し、解析した。

4. 研究成果

成果(1) Cdx2-GFP BAC トランスジェニックマウスの作出

我々は最初に、Cdx2-GFP レポーターマウスが Cdx2 の発現を正しくレポートしていることを確認した。Cdx2-EGFP レポーターマウスの初期胚(胚盤胞期胚)を抗 Cdx2 抗体により染色したところ、GFP 陽性の細胞のみが抗 Cdx2 抗体に反応した。着床後胚(7.5dpc 前後)において Cdx2 は胚体外外胚葉の派生器官および胚体の後部中胚葉において発現していることが報告されている。7.5dpc 前後のレポーターマウスの胚を採取して観察したところ、上記の器官特異的に GFP の発現が観察された。また成体組織においては、小腸の上皮が Cdx2 を高発現していることが知られている。レポーターマウスの成体から小腸を採取し、凍結切片を作製し観察したところ、上皮組織とその下に見られる腺組織のみで GFP の蛍光が観察された。これらの観察から、我々の作製した Cdx2-GFP BAC トランスジェニックマウスは、内在性の Cdx2 の発現を正しくレポートしていると考えられた。

成果(2) 胚の外側 内側へと移動する細胞における Cdx2 の発現の推移の観察

次にレポーターマウスと ROSA26-H2BmCherry を掛け合わせたマウス(Cdx2Cdx2-GFP/H2B-mCherry マウス)の胚のライブイメージング解析を行った。解析の結果から、これまで抗 Cdx2 抗体染色により報告されてきたのとほぼ同様に、GFP の蛍光は 16 細胞期胚において初めて明確に認められた。その後 32 細胞期前後までに、細胞によって発現の立ち上がりの早さは異なるものの、外側のほぼ全ての細胞が GFP (=Cdx2) を高発現する様子が観察できた。その後、外側の trophoblast 前駆細胞におい

ては Cdx2 の発現はさらに上昇するのが観察された。一方、内側の ICM 細胞においては、胚盤胞期以降は殆ど発現が見られなかった。次に当該研究の最も重要な焦点である、外側から内側へと移動する少数の細胞についてライブイメージングデータを用いて追跡を行った。外側から内側への細胞の移動は、16 細胞期~32 細胞期前後に観察され、それらの細胞は、外側に位置する時期には他の外側の細胞とほぼ同じくらいのレベルの GFP を発現しており、細胞の形態なども他の trophoblast 前駆細胞と変わらない様子であった。外側から内側へと移動した後、GFP の蛍光はステージが進むにつれて減衰していき、60 細胞期(後期胚盤胞期)くらいには、他の GFP を殆ど発現していない内側の細胞と見分けがつかないレベルとなった。これらの観察から、着床前胚においては当初、ほぼ全ての外側の細胞で Cdx2 が発現を開始すること、外側から内側へと移動する細胞においても当初は Cdx2 の高発現が認められ、内側へと移動した後に Cdx2 の発現は減衰していくということが分かった。

ライブイメージングで観察された、レポーター胚の内側に見られる GFP 強陽性の細胞は、通常のコンフォーカル顕微鏡による観察においても見られ、それらの GFP 強陽性の細胞が、ライブイメージングの光毒性や培養条件によるアーティファクトではないことが確認された。この結果から、外側 内側にアクシデンタリーに移動した細胞は、最初は他の外側の細胞、即ち trophoblast の前駆細胞と同じ性質を持っているように見え、内側に移動した後は Cdx2 の発現を抑制し、他の以前から内側にいた細胞と協調して未分化細胞である ICM を形成することが明らかとなった。この外側 内側に移動する細胞における Cdx2 遺伝子の発現の開始とその後の抑制、即ち、細胞が一度発現を開始した分化誘導因子の発現を抑制し未分化状態を維持すると

というイベントを観察できたという報告は、当該研究が初めてであると思われる。

成果(3) 外側 内側へと移動した細胞の運命の追跡

外側から内側に移動した細胞は、胚盤胞期以後も死滅することなく ICM の一部に寄与しているように見えた。我々はそれらの細胞がその後未分化細胞であるエピブラストや胚体外内胚葉に分化、寄与できるのか、出来るとすればどのくらいの割合で寄与しているのかを調べた。64 細胞期(後期胚盤胞期)前後には、レポーターマウスの胚の内側には GFP の蛍光強度の高い細胞は殆ど見られず、当初は外側にあり、後に内側に入った細胞は、その時期に Cdx2 (=GFP) の発現をほぼ完全に抑制し、周囲の ICM 細胞と殆ど変わらない GFP 蛍光強度になっていると思われた。しかし後期胚盤胞を多数観察すると、10 個に 1 個くらいの割合で、その時期においても周囲の ICM 細胞よりも GFP 蛍光強度が明らかに高いものが認められた。そのような、胚盤胞後期においても GFP 蛍光強度の高い ICM 細胞(= 外側 内側へと移動したと推測される細胞)を持つ胚を用いてエピブラストおよび胚体外内胚葉のマーカーである抗 Nanog 抗体および抗 Gata4 抗体による染色を行ったところ、それらの GFP 陽性細胞(当初は外側にあり Cdx2 を発現していたと思われる細胞)は、ほぼ同じくらいの割合でエピブラストおよび胚体外内胚葉に寄与するということを示唆する結果が得られた。外側 内側へと入った細胞が優先的に胚体外内胚葉となるということを示唆するイギリスのラボからの専攻研究があるが、我々の観察結果はそれとは異なり、外側 内側へと入った細胞はエピブラストと胚体外内胚葉のどちらにもほぼバイアス無く寄与できるのではないかということを示している。

初期胚において適切な比率の外側と内側の

細胞を保持するため細胞の移動が起こることは古くから知られていたが、それらの細胞における細胞分化に重要な遺伝子の発現の推移や、移動後の振る舞いをライブイメージングを用いて連続的に示した研究は、当該研究が初めてであると考えられる。

現在、この研究成果を英国の専門誌 Development に投稿すべく準備中である。

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 1 件)

1 Serial analysis of gene expression patterns and cell movement in mouse preimplantation embryos by Live-cell imaging.

Yayoi Toyooka, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori. The 61st NIBB Conference Cellular Community in Mammalian Embryogenesis. Jul. 10-12, 2013, Okazaki, Japan

[図書](計 0 件)

[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

豊岡 やよい (TOYOOKA, Yayoi)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教

研究者番号：20360597

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：