

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24680037

研究課題名(和文) 眼杯のパターン形成を制御する位置情報シグナルの3次元イメージングによる解析

研究課題名(英文) Dorsal and ventral specification in optic cup derived from ES cells in vitro

研究代表者

永樂 元次 (Eiraku, Mototsugu)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：40415097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,600,000円、(間接経費) 1,680,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ES細胞由来の眼杯様構造が自己組織的に極性を形成する分子メカニズムについての解明を目的とした。ES細胞から*in vitro*で分化した眼杯では、背側マーカーと腹側マーカーは相互排他的な発現パターンを示した。このことは、網膜神経上皮には自発的に背腹軸の極性を獲得できるメカニズムが存在することを示している。さらに、三次元形態の解析により、眼杯にはfissureが存在し、三次元形態的に極性を有していた。また、薬理学実験およびイメージングにより、自己組織的な*in vitro*の眼杯形成はダイナミックな複数の分子シグナルに制御された背腹軸パターン形成を伴うものであることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms underlying the formation of the dorsal-ventral polarity in the optic cup-like structure derived from ES cells. Dorsal and ventral specification in the optic cup appears to play an important role in the proper development of the eye. But, it remains elusive how the dorsal-ventral polarity is established in the optic vesicle. We found that ventral and dorsal markers expressed in a mutually exclusive pattern in the neural retina derived from ES cells. This result indicates that retinal neuroepithelium can spontaneously acquire the dorsal-ventral polarity. By time-lapse imaging study of Wnt signaling dynamics and pharmacological experiments, it is revealed that the dorsal and ventral specification of the optic cup is regulated by spatially and temporally controlled molecular signals including Wnt, BMP and Shh signaling.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：パターン形成 自己組織化 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに ES 細胞から立体的な網膜組織を効率よく誘導できる組織培養技術を開発してきた。この培養系では、培養 5 日までに ES 細胞塊の外側が連続した神経上皮組織へと分化する。その後、神経上皮組織のうち網膜前駆組織のマーカーである Rx を発現する領域が外側に袋状に飛び出し、管腔構造を持つ網膜前駆神経上皮組織を形成する。

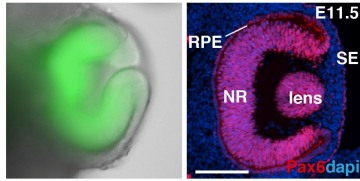


図 1、ES 細胞から再現した“眼杯”。右はマウスの眼杯

さらに、袋状に飛び出した上皮組織のうち遠位部が神経網膜へと分化し内側に陥入し眼杯様の構造を形成する(図 1、

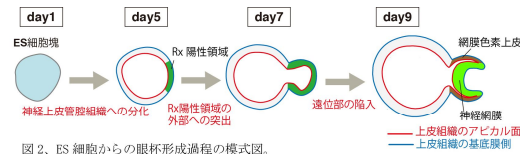


図 2、ES 細胞からの眼杯形成過程の模式図。

分化開始後 5 日目で連続した神経上皮構造が形成される。その後網膜領域が外側に突出し袋状の上皮管腔組織を形成する。9 日目には遠位部が内側に陥入し眼杯様の構造を形成する。

図 2)。レンズや間葉系細胞などの周辺組織が存在しない状態でも眼杯構造が形成されたことから、網膜前駆神経上皮組織にはそれだけで眼杯構造を形成できる、自己組織的な形態形成メカニズムが存在することが明らかになった。一方で、実際の生体での眼杯形成は軸対象に起こるのではなく、背腹方向の極性が存在することが知られている。眼杯は神経管から横に飛び出した眼胞と呼ばれる袋状の組織の先端が貫入することによって形成されるが、この時陥入は背側から先に起こり、また網膜色素上皮の分化も背側から先に起こる。一方で腹側には眼杯裂と呼ばれる裂け目が形成される。さらに、位置情報を担うシグナル分子の発現にも偏りがあり、腹側には Shh がまた背側には Wnt 2 b が強く発現していることが知られている。このような、背腹方向の極性が ES 細胞由来の眼杯にも存在するかを確かめるために、ES 細胞から誘導した眼杯様構造を二光子顕微鏡を用いて 3 次元再構成した結果、ES 細胞由来の眼杯の立体構造も軸対象ではなく一部に切れ目が入った極性を持った立体構造をしていることが明らかになった(図 4)。さらに生体の眼杯において腹側および背側にそれぞれ特異的に発現することが知られている COUP-TF1 と COUPTFII が、ES 由来の眼杯においても相互排他的な発現パターンを示すことも明らかになった。これらの実験結果は、ES 由来の網膜前駆神経上皮組織においても、自発的に背腹軸の極性が形成されたことを示唆している。眼杯のような複雑な立体組織のパターン形成を in vitro で観察できる実験系は他に例がなく、この立体組織培養系と 3 次元イメージング技術を組み合わせ

ることで、自己組織化による眼杯の極性形成を制御する分子機構の理解が深まることが期待される。

2. 研究の目的

申請者は ES 細胞の誘導系で立体的な“眼杯”構造が自己組織化で形成されることを報告した。一方で、胚発生において眼杯の背腹軸方向の極性を決定する細胞挙動やシグナル分子の動態については大部分が未知である。その原因として、レンズや間葉系細胞などの周辺組織を含んだ複雑な環境で眼杯形成が起こること、また、特にほ乳類においては胚発生が子宮内で進むため、イメージング技術を用いた経時観察が難しいことが挙げられる。本研究で用いる ES 細胞分化系では、未成熟な ES 細胞から立体的な眼杯組織の形成まで、すべての過程が in vitro で観察可能であり、また任意のタイミングで刺激や攪乱などの操作を加えることも可能である。さらにレンズなどの周辺組織がない単純な状態のため、神経上皮組織に内在した眼杯形成メカニズムに焦点を絞って研究することが出来る。こういった in vitro の立体組織培養系の利点を生かして、本研究では、眼杯の極性形成に影響を与えるシグナルを可視化し定量的に解析することによって、眼杯のパターン形成メカニズムについてより詳細なモデルを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 眼杯形成過程における Wnt および Shh シグナル活性を可視化するためのトランスジェニック ES 細胞株をそれぞれ作製する。また、背側および腹側の細胞を特異的に標識できるノックイン ES 細胞株をそれぞれ作製する
- 2) 多光子顕微鏡を用いた三次元イメージングによって、眼杯形成過程における各シグナル活性の時空間的動態を定量的に解析し、非対称な形態が位置情報シグナルとどのように対応するのかを明らかにする。
- 3) 対称性が破れる時期特異的に Wnt および Shh シグナル活性を示す細胞を FACS で純化し、遺伝子発現プロファイルを行うこと



図 3、in vitro で形成された眼杯での組織自律的な背腹パターン形成。GFP は網膜領域マーカーである Rx を発現する細胞を表す。Tbx5(背側、白)および Vax2(腹側、赤)を認識する抗体で組織切片を免疫染色した。それぞれのマーカー分子を発現する領域が相互排他的なパターンを自律的に形成する。

で、これらのシグナルの下流でコントロールされる眼杯の極性形成を担う分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、ES細胞由来の眼杯用構造が自己組織的に極性を形成する分子メカニズムの解明を目的としている。まず、マウス眼杯の極性マーカーである Vax2 (腹側マーカー) および Tbx5 (背側マーカー) を特異的に認識する抗体を作製し、ES細胞から *in vitro* で分化した眼杯を染色した結果、Tbx5 と Vax2 は相互排他的に眼杯の違う領域に発現していることが明らかになった (図1)。このことはレンズや間葉系細胞などの周辺の他の組織がない状況において、網膜神経上皮には自発的に背腹軸の極性を獲得出来るメカニズムが存在することを示している。さらに、眼杯の形態的な極性と遺伝子の発現パターンとの相関の有無を解析するために、Tbx5 と Vax2 の抗体を用いて各ステージの組織を蛍光免疫染色し、Light Sheet 顕微鏡を用いて三次元再構成を行った。その結果、背腹軸の極性は眼杯形成に先立っており、かつ眼杯の形態的な極性は背腹マーカーの局在と相関していることが明らかになった。また、これらの極性マーカーの発現がどのような分子シグナルによって制御されているのかを明らかにするために薬理学的実験を行った。その結果、BMP シグナルおよび Wnt シグナルが背側領域の誘導に大きく関与していることが明らかになったが、Shh シグナルの関与は颯太的に低かった。次に、これらのシグナルが眼杯形成過程においてどのような時空間的な制御を受けているかを詳細に解析するために、各シグナルを可視化することのできる ES 細胞株を作製し、眼杯形成過程におけるシグナル活性のダイナミクスを三次元イメージングによって観察した結果、Wnt シグナルが眼杯形成に先立って局所的に上昇する現象が観察された。これらの実験結果により、自己組織的な *in vitro* の眼杯形成はダイナミックな複数の分子シグナルによって制御された背腹軸パターン形成を伴うものであることが明らかになった。このことは網膜神経上皮組織には外部からの位置情報シグナルに依存することなく、複数の分泌シグナルを介して、自発的に背腹軸パターンを形成するメカニズムが内在することを示している。

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 8 件)

1, Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor

dynamics in human ES cell-derived neocortex. Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, Eiraku M, Sasai Y. Proc Natl Acad Sci U S A. 110, 20284-9, 2013. doi: 10.1073/pnas.1315710110. (査読有り)

2, Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance.

Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Sasai Y, Adachi T. J Biomech. 46, 1705-13, 2013. doi: 10.1016/j.jbiomech.2013.03.035. (査読有り)

3, Modeling cell proliferation for simulating three-dimensional tissue morphogenesis based on a reversible network reconnection framework.

Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Sasai Y, Adachi T. Biomech Model Mechanobiol. 12, 987-96, 2013. doi: 10.1007/s10237-012-0458-8. (査読有り)

4, Reversible network reconnection model for simulating large deformation in dynamic tissue morphogenesis.

Okuda S, Inoue Y, Eiraku M, Sasai Y, Adachi T. Biomech Model Mechanobiol. 12, 627-44 2013. doi: 10.1007/s10237-012-0430-7. (査読有り)

5, Robust formation and maintenance of continuous stratified cortical neuroepithelium by laminin-containing matrix in mouse ES cell culture.

Nasu M, Takata N, Danjo T, Sakaguchi H, Kadoshima T, Futaki S, Sekiguchi K, Eiraku M, Sasai Y. PLoS One. 7, e53024, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0053024. (査読有り)

6, In vitro organogenesis in three dimensions: self-organising stem cells.

Sasai Y, Eiraku M, Suga H. Development. 139, 4111-21, 2012. doi: 10.1242/dev.079590. (査読有り)

7, Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs.

Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, Saito K, Yonemura S, Eiraku M, Sasai Y. Cell Stem Cell. 10, 771-85, 2012. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.009. (査読有り)

8, Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells.

Eiraku M, Sasai Y. Curr Opin Neurobiol. 22, 768-77, 2012. doi: 10.1016/j.conb.2012.02.005. (査読有り)

〔学会発表〕(計 7 件)

1, 多能性幹細胞からの in vitro での立体神経組織形成

永樂 元次

第 13 回日本再生医療学会総会, 3/3 2014, 京都国際会館

2, in vitro での立体網膜組織の自己形成とその原理

永樂 元次

第 36 回日本分子生物学会年会, 12/5 2013, 神戸

3, in vitro での立体網膜組織の自己形成とその原理

永樂 元次

第 84 回動物学会大会, 9/26 2013, 岡山大学

4, in vitro での立体網膜組織の自己形成とその原理

永樂 元次

第 86 回日本生化学会大会, 9/12 2013, パシフィコ横浜

5, in vitro での立体網膜組織の自己形成とその原理

永樂 元次

第 12 回日本再生医療学会総会, 3/23 2013, パシフィコ横浜

6, Self-organized formation of optic cup in vitro
Mototsugu Eiraku

Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 5/30 2012, Kobe Japan

7, Self-organized formation of optic cup in vitro
Mototsugu Eiraku

16th Stem Cell Network Workshop: Stem Cell Treatments for Eye Diseases: 4/16, 2012, University of Western Sydney (Campbelltown Campus)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.riken.jp/en/research/labs/cdb/hum_stem_cell/fourdim_tissue/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永樂 元次 (Eiraku Mototsugu)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学

総合研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：40415097