

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：63904

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2009～2014

課題番号：21116005

研究課題名（和文）初期胚細胞コミュニティにおける遺伝子と細胞の挙動の解析

研究課題名（英文）Behavioral analyses of genes and cells in early mammalian development

研究代表者

藤森 俊彦（Fujimori, Toshihiko）

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教授

研究者番号：80301274

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 183,200,000円

研究成果の概要（和文）：ほ乳類の初期発生では細胞の配置、挙動、遺伝子発現が確定されておらず、胚の中の細胞コミュニティの中で細胞の分化や体軸、胚の形の情報がどのように形成されていくか明確でなかった。本研究によって、着床前胚における細胞分化は段階によって制御様式が異なることが明らかになった。また、ES細胞を用いた解析により詳細な分子機構を解明した。細胞の挙動などを解析するためのツールとして細胞内のオルガネラなどを可視化するレポーターマウスを作製し広く公開した。また、ライブイメージング用の顕微鏡装置の開発を行った。更に、胚盤胞に対するモノクローナル抗体を作製し、そのスクリーニングに使うマイクロデバイスの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：During early mammalian development, the behaviors of cells, regulation of cell differentiation and patterns of gene expression are variable. It has not been uncovered how cell differentiation, formation of body axes and shapes of embryo are regulated in the cellular community within an embryo. We have been studying to reveal mechanisms underlying these regulations. We found the regulating mechanisms for cell differentiations are different depending on the steps of differentiation. Detailed molecular interaction was revealed by the analyses using embryonic stem cells. We established a series of transgenic mouse lines to visualize organelles with fluorescent proteins. We also developed new microscope systems for the live imaging of developing mouse embryos. Monoclonal antibodies against molecules expressed in mouse blastocyst were made, and the micro devices were developed for the screening of antibodies by immunostaining of blastocysts.

研究分野：発生生物学

キーワード：哺乳類 初期発生 細胞分化 ライブイメージング 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の初期発生においては、細胞の配置、挙動、遺伝子発現は確定されておらず、胚の中の細胞コミュニティの中で、細胞の分化や、体軸の形成、胚の形の情報がどのようにして具現化されるかは明確ではない。決定論的に進まない哺乳類初期発生の理解には、固定したサンプルの解析だけでは限界がある。そこで、初期胚における細胞・遺伝子の動態の解析、ES細胞を用いた分化制御機構の詳細な解析を進めた結果、マウス初期胚での細胞系譜解析から、将来の体軸は細胞系譜には依存しないことが示唆された。胚の中でいかに細胞間の違いが生じ、安定した分化形質や体軸へと変換されるかが次の課題であった。

2. 研究の目的

本研究は、ライブイメージング技術、ES細胞で初期胚の細胞を模した詳細な分子機能の解析法を開発・実用化し、哺乳類初期胚における細胞コミュニティの実体を理解すべく、初期胚での細胞分化時の遺伝子発現の動的解析、着床後からの細胞、遺伝子の動態の解析を行うことを目的とした。これらの研究を通して、胚の中でそれぞれの細胞がどのように振る舞い、その際に分化形質がどのような分子メカニズムに基づいて決められるか、細胞コミュニティとして胚が如何に形成されるかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)細胞の性質を決める因子群の挙動と機能の解析

着床前発生においては、栄養外胚葉、原始内胚葉、エピプラストという3つの分化状態にある細胞が見られる。それぞれの細胞がどのようにして分化してくるかを解明する為に、それぞれの細胞層で発現する遺伝子の発現制御下に蛍光タンパク質の cDNA を融合した BAC コンストラクトを導入されたマウス胚を用いて、遺伝子発現のライブ観察を行う。更に、これらのマウスから ES 細胞を樹立し、蛍光タンパク質を標識として、分化状態の異なる細胞を分離し、それらの細胞の状態を解析する。

更に、マウス胚盤胞をそのまま動物に免疫し、マウス胚盤胞に対するモノクローナル抗体を作製する。モノクローナル抗体のスクリーニングは、胚盤胞を抗体染色することで進める。モノクローナル抗体のスクリーニング作業の高効率化を実現するマイクロ流体技術を活用した抗体スクリーニングデバイスの開発を行う。本デバイスを用いれば 16 種類の異なるサンプルを簡便にかつ同時にスクリーニングを行うことが可能である。今後は、抗原同定および抗原分子の機能解析を目指す。

(2)胚の細胞内小器官を蛍光標識するマウス

の作製

マウス胚をライブイメージングする際に、遺伝子発現の他、オルガネラなどの細胞の特徴を同時に観察することによって得られる情報が多い。また、蛍光タンパク質を用いた様々レポーターマウスは既に存在していたが、用いられているプロモーターの特性が安定しなかったり、トランスジェニックラインによって発現組織がまちまちな場合が多く、一般的に用いるには不便な状態にあった。そこで、Rosa26 遺伝子座に loxP によって囲まれた蛍光タンパク質 cDNA をノックインする状態で一連のマウス系統の作製を行う。

4. 研究成果

(1) ES 細胞を用いた in vitro 培養系による胚内で細胞の性質を特徴づける機構の解析では、癌抑制遺伝子 p53 はこれまでマウス ES 細胞の多能性維持において、転写因子 Nanog の発現を分化誘導過程で抑制することにより、負の役割を担っていると考えられ、これは iPS 細胞誘導過程における抑制的効果とも符合していた。しかし、我々は、p53 欠損 ES 細胞が、胚盤胞注入により正常にキメラ胚形成に寄与する事を示し、p53 欠損は ES 細胞の多能性発揮に必要な事ではない事を証明した。一方で、p53 欠損 ES 細胞は試験管内分化誘導系では分化マーカー遺伝子発現誘導に異常を示した。これより、ES 細胞が多能性を発揮する過程が、正常発生と試験管内分化誘導では異なる事が、初めて明らかになった。

Nanog, Cdx2, Gata6 および PDGFR の遺伝子発現を BAC トランスジェニックマウスを用いてライブ観察を行った。その結果栄養外胚葉の分化は細胞の胚内における位置依存的に決まること、その運命は発生途上でも変更可能であることを解明した。更に、エピプラストと原始内胚葉の分化は胚盤胞中期以降に制御されることが明らかになった。

胚盤胞に対するモノクローナル抗体を染色によりスクリーニングを進め約 800 クローンの胚盤胞を染めることのできる抗体を得た。クローンの重複、抗原分子の重複の可能性があり、今後さらに絞り込みを行い、分子の同定、その機能解明へと進める。スクリーニング用のマイクロデバイスは、胚盤胞の染色だけでなく、マウス着床前胚の培養にも活用可能な状態に至った。

(2) Rosa26 遺伝子座に loxP によって囲まれた蛍光タンパク質 cDNA をノックインする状態で一連のマウス系統を理化学研究所・CDB 変異マウスユニットにおいて作製を行った。これらのマウスでは、Cre によって組換えが誘導される前は、蛍光タンパク質は発現していないが、Cre によって時期・組織特異的に発現を誘導することが可能であり、生殖系列で一旦組換えてしまえば、その後の子孫では恒常的に蛍光タンパク質の発現が得られる。核、細胞骨格、オルガネラなどを緑

色や赤色の蛍光タンパク質で標識したマウスを作製、公開した。更に、タンパク質の分解の違いにより細胞周期を可視化するマウスを同様な手法によって作製した。また、一つの遺伝子座から二種類の蛍光タンパク質を発現するマウスを作製した。これらのマウスは初期発生に限らず広く用いられている。(3)本研究を通じて、利用できるマウスシステムの充実と、培養・観察機器の進歩に伴って、発生途上の哺乳類初期胚をライブ観察することが一般的な技術として定着した。複数の固定胚から得られるイメージを、想像で繋げて理解していた発生が、個々の個体を連続観察して得られる理解へと置き換えることが進みつつある。これによって、哺乳類胚においては、特定の分化形質へ向かう際にも限られた経路だけでなく、比較的多様な経路を経て進み、分化形質が自由度が高いことが明らかになりつつある。哺乳類特有の問題である、胚を取り巻く環境としての卵管や子宮と、胚との相互作用を考える必要が強く認識された。胚発生を考える際に、胚や胚の中の細胞が環境からどのような情報を得て、それをどのように細胞に内包されている情報とどのように統合して、細胞の振る舞いが決まっているかを解明していく必要がある。

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 21 件)

Nakagawa S, Shimada M, Yanaka K, Mito M, Arai T, Takahashi E, Fujita Y, Fujimori T, Standaert L, Marine JC, Hirose T. The lncRNA *Neat1* is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development*. 2014; 141:4618-27. 査読有
doi: 10.1242/dev.110544.

Shi D, Komatsu K, Hirao M, Toyooka Y, Koyama H, Tissir F, Goffinet AM, Uemura T, Fujimori T. *Celsr1* is required for the generation of polarity at multiple levels of the mouse oviduct. *Development*. 2014; 141:4558-68. 査読有
doi: 10.1242/dev.115659.

Imuta Y, Koyama H, Shi D, Eiraku M, Fujimori T, Sasaki H. Mechanical control of notochord morphogenesis by extra-embryonic tissues in mouse embryos. *Mech Dev*. 2014; 132:44-58. 査読有
doi: 10.1016/j.mod.2014.01.004.

Ito S, Yamane M, Ohtsuka S, Niwa H. The C-terminal region of *Xpc* is dispensable for the transcriptional activity of Oct3/4 in mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett*. 2014; 588:1128-35. 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.033.

Leeb M, Dietmann S, Paramor M, Niwa H, Smith A. Genetic exploration of the exit from self-renewal using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014; 14:385-93. 査読有
doi: 10.1016/j.stem.2013.12.008.

Adachi K, Nikaido I, Ohta H, Ohtsuka S, Ura H, Kadota M, Wakayama T, Ueda HR, Niwa H. Context-dependent wiring of Sox2 regulatory networks for self-renewal of embryonic and trophoblast stem cells. *Mol Cell*. 2013; 52:380-92. 査読有
doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.002.

Shigeta M, Ohtsuka S, Nishikawa-Torikai S, Yamane M, Fujii S, Murakami K, Niwa H. Maintenance of pluripotency in mouse ES cells without *Trp53*. *Sci Rep*. 2013; 3:2944. 査読有
doi: 10.1038/srep02944.

Abe T, Sakaue-Sawano A, Kiyonari H, Shioi G, Inoue K, Horiuchi T, Nakao K, Miyawaki A, Aizawa S, Fujimori T. Visualization of cell cycle in mouse embryos with *Fucci2* reporter directed by *Rosa26* promoter. *Development*. 2013; 140:237-46. 査読有
doi: 10.1242/dev.084111.

Abe T, Fujimori T. Reporter mouse lines for fluorescence imaging. *Dev Growth Differ*. 2013; 55:390-405. 査読有
doi: 10.1111/dgd.12062.

Ohtsuka S, Nishikawa-Torikai S, Niwa H. E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS One*. 2012; 7:e45220. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0045220.

Bashar MK, Komatsu K, Fujimori T, Kobayashi TJ. Automatic extraction of nuclei centroids of mouse embryonic cells from fluorescence microscopy images. *PLoS One*. 2012; 7:e35550. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0035550.

Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R, Ohtsuka S, Göttgens B, Niwa H, Smith A. *Esrrb* is a pivotal target of the *Gsk3/Tcf3* axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2012; 11:491-504. 査読有
doi: 10.1016/j.stem.2012.06.008. Erratum in: *Cell Stem Cell*. 2013 May 2;12(5):630.

Abe T, Kiyonari H, Shioi G, Inoue K, Nakao K, Aizawa S, Fujimori T. Establishment of conditional reporter mouse lines at *ROSA26* locus for live cell imaging. *Genesis*. 2011; 49:579-90. 査読有
doi: 10.1002/dvg.20753.

Shioi G, Kiyonari H, Abe T, Nakao K, Fujimori T, Jang CW, Huang CC, Akiyama H, Behringer RR, Aizawa S. A mouse

reporter line to conditionally mark nuclei and cell membranes for in vivo live-imaging. *Genesis*. 2011; 49:570-8. 査読有

doi: 10.1002/dvg.20758.

Shi D, Komatsu K, Uemura T, Fujimori T. Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes Cells*. 2011; 16:282-90. 査読有

doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01484.x.

Murakami K, Araki K, Ohtsuka S, Wakayama T, Niwa H. Choice of random rather than imprinted X inactivation in female embryonic stem cell-derived extra-embryonic cells. *Development*. 2011; 138:197-202. 査読有

doi: 10.1242/dev.056606. Erratum in: *Development*. 2014 Jul;141(14):2913-7.

Fujimori T. Preimplantation development of mouse: a view from cellular behavior. *Dev Growth Differ*. 2010; 52:253-62. 査読有

doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01172.x.

Niwa H, Fujimori T. Stem cell systems in development of mammals. *Dev Growth Differ*. 2010; 52:251. 査読有

doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01181.x.

Niwa H. Mouse ES cell culture system as a model of development. *Dev Growth Differ*. 2010; 52:275-83. 査読有

doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01166.x.

Yuri S, Fujimura S, Nimura K, Takeda N, Toyooka Y, Fujimura Y, Aburatani H, Ura K, Koseki H, Niwa H, Nishinakamura R. Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells*. 2009; 27:796-805. 査読有

doi: 10.1002/stem.14.

④ Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 2009; 460:118-22. 査読有

doi: 10.1038/nature08113.

〔学会発表〕(計 15 件)

Toshihiko Fujimori, PCP Pathway and Cellular Geometric Pattern in Oviduct Morphogenesis. The 62nd NIBB Conference FORCE IN DEVELOPMENT, Nov.17-19, 2014, (Okazaki Conference Center, Aichi, Okazaki)

木村啓志, マイクロ流体デバイスを用いたバイオ環境操作. 表面技術協会関東支部第 88 回講演会「バイオインターフェイスとしてのマテリアル・デバイス」, 2014 年 10 月 24 日, (東京医科歯科大学, 東京)

Toshihiko Fujimori, Behaviors of cells and gene expression in early mouse development. The 37th NAITO CONFERENCE Bioimaging-a paradigm shift for the life sciences, Jul.15-18, 2014, (ヒルトンニセコヴィレッジ, 北海道, 虻田郡ニセコ町)

Toshihiko Fujimori, Behaviors of Cells and Gene Expression in Early Mouse Development. The 61st NIBB Conference Cellular Community in Mammalian Embryogenesis, Jul. 10-12, 2013, (Okazaki Conference Center, Aichi, Okazaki)

Hitoshi Niwa, Restriction of pluripotency in development - modeling in vitro, The 61st NIBB Conference Cellular Community in Mammalian Embryogenesis, Jul. 10-12, 2013, (Okazaki Conference Center, Aichi, Okazaki)

Toshihiko Fujimori, Approaches to Understand 3D Morphogenesis. The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013, Mar.17-19, 2013, (Okazaki Conference Center, Aichi, Okazaki)

Toshihiko Fujimori, Tools and approaches to understand 3D morphogenesis. in Stem Mouse Embryology Workshop, Mar.10-12, 2013, (Bangalore, India)

Hitoshi Niwa, Molecular mechanism to maintain pluripotency of mouse ES cells. International Symposium on Recent Advances in Stem Cells and Cancer & the 8th Annual Meeting of TSSCR, Oct.14, 2012, (Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan)

Toshihiko Fujimori, Cell polarity and morphogenesis of the mouse oviduct. BSCB/BSDB/JSDB Joint Spring Meeting, Apr.15-18, 2012, (University of Warwick, Coventry, UK)

Hitoshi Niwa, Pluripotency-associated transcription factor network. ISSCR-CSH Asia: Cellular Programs and Reprogramming, Oct. 24-28, 2011, (Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China)

Hitoshi Niwa, Functional dissection of pluripotency-associated transcription factor network. 1st Annual Cambridge Stem Cell International Symposium, Jul. 6-7, 2011, (Cambridge, UK)

Toshihiko Fujimori, Cellular behaviors in early mammalian embryonic development. 第 48 回日本生物物理学会年会, Sep.20-22, 2010, (東北大学, 宮城県, 仙台市)

Toshihiko Fujimori, Behaviors of Cell and Gene Expression during the Preimplantation Mouse Embryo. The First

SKLRB Symposia on Frontiers in
Periimplantation Biology, May 8-12, 2010,
(Beijing, China)

Hitoshi Niwa, Transcription factor
network governing pluripotency. A special
meeting of the CAMBRIDGE STEM CELL
CLUB, Sep. 11, 2009, (Cambridge, UK)

Hitoshi Niwa, Transcription factor
network governing pluripotency. 16th
International Society of Developmental
Biology Congress, Symposium16: Stem
Cells and Pluripotency, Sep. 6-10, 2009,
(Edinburgh, UK)

〔図書〕(計 4 件)

藤森俊彦, 岩波書店, 科学 Vol.83 No1,
iPS 細胞を発生生物学ではどう捉えるかー発
生生物学の常識と非常識. (2013) 73-78,

木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫, エヌティ
ーエス出版, 先端バイオマテリアルハンドブ
ック, “第4章: 医療計測用バイオマテリア
ル, 第13節: マイクロ流体デバイス技術を応
用した invitro 生体モデルの構築”. (2012)
474-477, 書籍分担執筆

小松紘司, 藤森俊彦, メディカルレビュー
社, HORMONE FRONTIER IN
GYNECOLOGY 18, No.1, ライプセルイメー
ジングによる着床前胚発生研究. (2011)
13-18,

藤森俊彦, 共立出版, 細胞周期フロンティア,
マウス初期胚における細胞分裂と発生.
(2010) 168-173,

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/embryo/index.html>
(基礎生物学研究所・初期発生研究部門)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤森 俊彦 (Fujimori, Toshihiko)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・教
授

研究者番号: 80301274

(2) 研究分担者

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

木村 啓志 (Kimura, Hiroshi) (H24 ~ H25)

東海大学・工学部・講師

研究者番号: 40533625

丹羽 仁史 (Niwa, Hitoshi)

独立行政法人理化学研究所・多細胞システ
ム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号: 80253730