

令和元年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18550

研究課題名(和文) マウス個体発生における細胞競合に関する研究

研究課題名(英文) The study of cell competition in mouse development

研究代表者

橋本 昌和 (HASHIMOTO, Masakazu)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：60580496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの着床前胚において、将来の身体の元となるエピブラストはわずか10個ほどの細胞から構成されているため多能性の獲得が厳密に制御される必要があるが、その機構はこれまで明らかにされていなかった。本研究ではHippoシグナルの下流であるTead-Yap複合体の転写活性のゆらぎに依存した多能性マーカーの発現量の違いによる細胞競合によって、均質で高い多能性をもったエピブラストが形成されることを見出した。この細胞競合現象は発生過程におけるゆらぎを補正する重要な機構であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピブラストはからだのほぼ全ての細胞の元となっているため、高く均質な多能性を有している必要があるが、その獲得機構はこれまであまり明らかにされてこなかった。本研究から、エピブラストが強固な多能性を獲得するメカニズムを見いだすことができた。着床前胚のエピブラストはin vitroにおけるES細胞やiPS細胞に相当するが、これらは多能性の状態が均質ではないことが現在の再生医療における問題点である。本研究成果によってES細胞やiPS細胞の多能性を均質化する手法を開発できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The epiblast is a pluripotent cell population first formed in preimplantation embryos and its quality is important for proper development. In this study, we examined the mechanisms of epiblast formation and found that the Hippo pathway transcription factor Tead and its coactivator Yap regulate expression of pluripotency factors and cells showing low Tead activity are eliminated from the epiblast through cell competition. Cell competition functions as a safeguard against developmental fluctuations in pluripotency factor expression by Tead activity to ensure the production of an epiblast with naive pluripotency.

研究分野：発生生物学

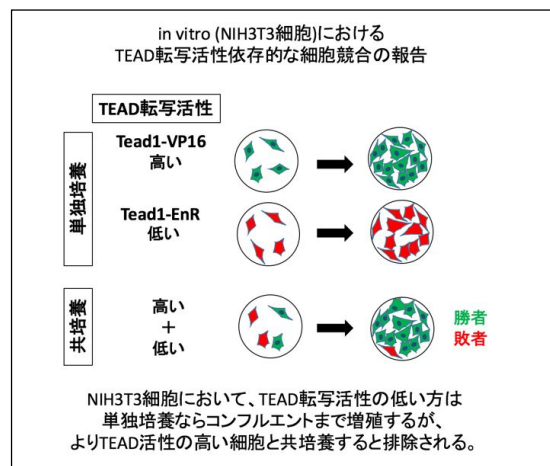
キーワード：細胞競合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

八工の上皮組織において、リボソーム関連遺伝子の変異によって蛋白質合成が低下した細胞や、極性を失い脱上皮化した細胞は他の正常細胞によって淘汰されることが知られている。この仕組みは細胞間コミュニケーションに基づく細胞競合と呼ばれており、がんの発症を抑制したり、発生期においてはサイズをコントロールするなどの重要な役割を担っている。細胞競合は近年、哺乳類においても起こることが報告されているが、そのメカニズムの詳細や生物学的意義はまだよくわかっていない。これまでの細胞競合に関する研究は八工や培養細胞を用いたものが多く、またガン前駆細胞を人為的に発生させ、その排除メカニズムを解明するものがほとんどであった。マウスなどの高等生物で *in vivo* の生理的条件下における細胞競合現象の報告例は極めて少なく、本当に生理的条件下で起こる現象なのか疑問視する声さえあった。

申請者の所属する大阪大学佐々木洋教授の研究室ではマウス線維芽細胞を用いて、細胞分化や増殖を制御する転写因子 TEAD とそのコアクチベーター YAP の活性(以下、TEAD 転写活性)を制御すると、TEAD 転写活性の高い細胞が低い細胞を、アポトーシスを介して排除する細胞競合現象が起こることを過去に報告していた(右図)が、これがマウス胚などの *in vivo* の環境下で起こりうる現象かどうかは不明であった。



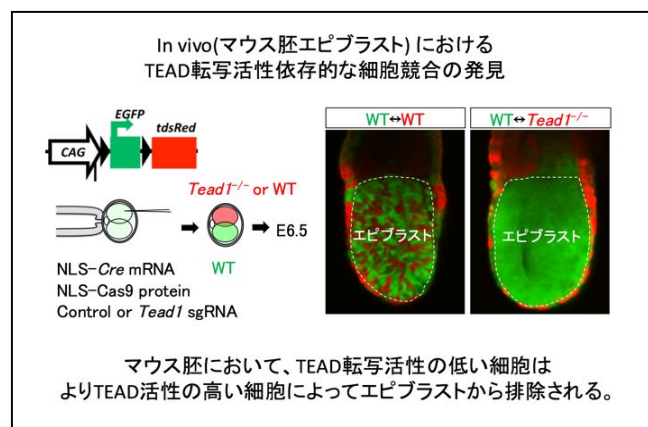
2. 研究の目的

同一の遺伝情報を持つ個体においても、個々の細胞の増殖能、分化能、代謝活性は均一ではなくゆらいでおり、細胞の集団である組織において不適合な細胞は排除されてゆく。細胞競合は細胞間コミュニケーションに基づいた、不適合細胞の排除を支えるメカニズムであり、組織の正常な発生や代謝活動に必須であるが、哺乳動物における分子基盤の詳細はあまり明らかにされていない。特に隣接細胞の状態を認識するメカニズムについてはほとんどわかっていない。そこで本研究では *in vivo* のマウス個体発生において TEAD 転写活性依存的に細胞競合現象が起きるのかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

まずは線維芽細胞の知見を活かし、この TEAD 転写活性依存的な細胞競合がマウスの個体発生という *in vivo* においても起こるのかどうかを検証し、生理的条件下の発生過程におけるその役割を知るというストラテジーを考えた。

2 細胞期のマウス胚の片割球に CRISPR/Cas9 システムによって *Tead1* をノックアウトして蛍光ラベルした



モザイク胚(WT \leftrightarrow Tead1 KO 胚)を作成し、細胞競合の有無を調べた。

また、何も操作を加えない野生型胚において、TEAD 転写活性依存的な細胞競合が起こるかを検証した。Caspase 阻害剤で細胞死を抑制した状態で、胚を培養し、コントロール培養との比較を行い、排除されうる細胞の特徴を調べた。

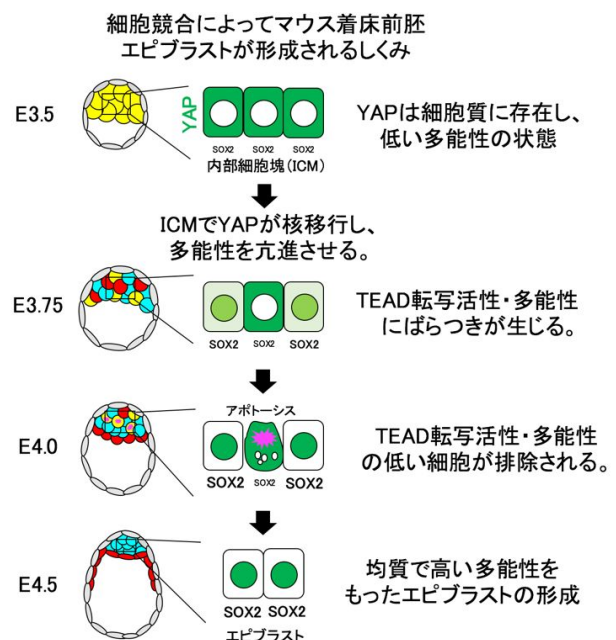
4. 研究成果

WT \leftrightarrow Tead1 KO 胚の将来の個体を形成するエピプラストの領域特異的に Tead1 KO 細胞が排除されることを見出した(右上図)。単純な Tead1 KO 胚は正常にエピプラストを形成することができるので、野生型細胞との競合によって Tead1 KO 細胞がエピプラストから排除されることが示唆された。さらにこの細胞競合現象は着床前という非常に早い段階で起きていることがわかり、着床前のエピプラストにおいて TEAD 転写活性が重要であることが示唆された。

この発見を発端に、生理的条件下のマウス着床前胚において、内部細胞塊からエピプラストと原始内胚葉が形成されるが、その際にエピプラストにおいて Hippo シグナルによって制御される転写因子 TEAD のコアクチベータである YAP が細胞質から核へ移行し、Sox2 などの多能性因子の発現を亢進させることを明らかにした。この YAP の核移行レベルには細胞間で非常に大きなばらつきがあり、これによって多能性関連遺伝子の発現にもばらつきが生じる。しかし、このばらつきは細胞競合によって多能性の低い細胞がアポトーシスを介して排除されることで、エピプラストは均質かつ高い

多能性をもった組織となることを明らかにした。この現象はマウス個体発生における最初の競合現象によるプログラム細胞死であり、後の発生を正常に進めるためにも重要な細胞選別機構であると考えられる。

これまでの細胞競合の研究の多くは前述のとおり、培養細胞や八工を用いたものであり、哺乳類の個体を用いた解析例は非常に少ない。マウスに関しては、海外において Myc、Bmpr1a、Tsc2 など、少数の遺伝子に着目してモザイク胚を作成し、細胞競合研究を行っているところがあるが、さまざまな遺伝子について解析できる場所はほとんどない。原因は上述の技術的難易度が高かったことが考えられるが、申請者の得意とするマウス遺伝学的手法を駆使して、多くの研究者が興味をもっているもののこれまでほとんど行われていなかった実験を進めることができた。また、本研究対象の着床前胚における細胞競合現象は、体の全ての細胞を構成しなおかつ少数の細胞数からなるエピプラストにおける細胞選別機構であり、この破綻は後の発生過程において多くの細胞に影響をおよぼす可能性が高い。また Tead 活性依存的な細胞の排除は既報の E6.0 における Myc 依存的な細胞競合現象より早い時期に起こっており、マウス個体発生において最も早い時期に起こる競合現象を見ていると言え、そのインパクトは非常に大きい。さらに、多能性獲得過程でエピブ



ラストの Yap が細胞質から核へ移行することについても、これまで知られていない発生生物学における新しい知見であり、初期発生の分野に大きなインパクトを与えると考えられる。さらには多能性細胞は再生医療にも用いられる非常に重要な細胞であるため、その細胞樹立における選別機構の研究は細胞競合・発生生物学の分野のみならず、再生医療、幹細胞生物学などの分野にも強い影響を与える研究になると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hashimoto M, Sasaki H.

Epiblast formation by Tead-Yap-dependent expression of pluripotency factors and competitive elimination of unspecified cells.

Developmental Cell ,50, 1-16, 査読有, 2019

〔学会発表〕(計 2 件)

橋本昌和 2018 年日本発生生物学会

Tead/Yap accelerates the naïve pluripotency in inner cell mass for the establishment of high quality epiblast through the activity-dependent competitive cell death

橋本昌和 2017 年日本分子生物学会

マウス着床前胚のエピブラストは Tead/Yap 活性依存的な選択的細胞死を経て多能性を均質化させる

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。