

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24年 5月8日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590178

研究課題名（和文） マウス初期内胚葉からその派生組織への分化過程における Sox17 因子の役割

研究課題名（英文） The role of Sox17 during mouse early endoderm to its derivatives

研究代表者

金井 正美 (KANAI MASAMI)

東京医科歯科大学・実験動物センター・教授

研究者番号：70321883

研究成果の概要（和文）：胚性内胚葉/原始腸管からは肺・膵・肝・腸などヒト成人病疾患に深く関与する組織・器官に発生する。本研究では *Sox17* 欠損マウスに特異的に表現系の認められた胚性内胚葉分化について、派生組織への分化プロセスを検証する目的で、発生初期(9.5 日胚)の肝臓原基そのものを用いた *in vitro* 組織培養系を確立し、更に正常胎児組織との DNA array 法及び、ノックアウト ES 細胞を用いたキメラ解析等で内胚葉細胞から派生組織への *Sox17* 因子の役割と自立的分化能の詳細な検討を行い、*Sox17* 欠損胚の表現系を回復させるクローンを選定し、機能的下位遺伝子の同定を行っている最中であり、ターゲット遺伝子検索を行っている。

研究成果の概要（英文）： The definitive gut endoderm give rise to various cell-types constituting digestive tract, liver, pancreas and associated visceral endoderm. In order to examine primordium endoderm (9.5 dpc) development, we have cultured them for 3 days, and then analyzed the development/maturation in each explant. We have examined that chimeric study between *Sox17* null ES cells introducing to wild blastocyst and their DNA array. Our observation strongly indicate that a critical role of *Sox17* in the determination of the cell into the endoderm and its derivative organ in mammals. These findings lead us to the possibility that *Sox17* is one of the key genes for the isolation of the endodermal stem cells and obtaining of the endodermal cells derived from ES cells in the human therapeutic research for the future.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2009 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：内胚葉、発生・分化、ノックアウトマウス、腸管形成、肝臓、胆のう

1. 研究開始当初の背景；21世紀移植医療創出の観点から、哺乳類の胚性内胚葉の初期分化、さらに各種内胚葉系組織へ

の発生のメカニズムについて、国内外において精力的な研究がなされ、この5-6年の間にその分化機構に関わる分子メ

カニズムが急速に明らかになってきた。この内胚葉研究の飛躍的な前進のきっかけに私たちの単離した内胚葉形成因子“SOX 17”の発見が一旦を担っていると自負している。私たちの作出したSox17欠損マウス/ノックアウトES細胞を用いて詳細な検討を行うことで、初期内胚葉発生プロセスを形態学的にまた分子生物学的に明らかにすることを本研究課題の最終目標としている。

2. 研究の目的; 胚性内胚葉/原始腸管からは肺・膵・肝・腸などヒト成人病疾患に深く関与する組織・器官に発生する。本研究ではSox17欠損マウスに特異的に表現系の認められた胚性内胚葉分化について、派生組織への分化プロセスを検証する目的で、発生初期(9.5日胚)の肝臓原基そのものを用いた*in vitro*組織培養系を確立し、更に正常胎児組織とのDNA array 法及び、ノックアウトES細胞を用いたキメラ解析等で内胚葉細胞から派生組織へのSox17因子の役割と自立的分化能の詳細な検討を行う。
3. 研究の方法; 培養系遺伝子導入方法を用いて、Sox17欠損胚へSox17を導入することで、腸管形成の再開を行う培養系を開発した。即ち、形態上腸管形成部位に影響の認められないhead-fold stageの胚を用いて、72時間培養を行い、遺伝子導入後神経管形成期まで発生可能な系の開発を行った。アッセイ系としては、胚性内胚葉の細胞欠損に関してはEM包埋後に厚切り切片で細胞同定を行う。また欠損部位に本来発現すべきshh (腸管の部位特異性を決定する液性因子)をwhole mount *in situ* hybridization法にて確認する。遺伝子部位決定の為に、GFPを同時に導入することで固定前のサンプルの選抜を行う。
4. 研究成果; Sox17欠損胚の表現系を回復させるクローンを選定し、機能的な下位遺伝子の同定を行っている最中であり、ターゲット遺伝子検索を行っている。それ以外には、8体節から13体節までのSox17発現細胞の予定領域に2体節期でDiIラベルを行い、28時間whole embryo cultureを行い、細胞をトレースし細胞動態を観察した。その結果、2体節でマーキングした内胚葉lateral領域の細胞はwhole culture後には、HNF6陽性胆のう領域 (Sox17陽性)に移動することが証明された。また、Sox17 null ESCAG-EGFP陽性胚のキメラ解析を行い、肝芽ではEGFP陰性のnull ES(HNF4単独陽性、赤

色)が観察された。胆嚢、膵臓の前駆領域はワイルドEGFP陽性細胞で成り立ち、胆嚢領域で陰性mutant ES細胞で構成されている部位は胆のうマーカーDBAレクチン陰性を呈した。以上の結果はSox17が胆嚢形成に必須であることの証明である。また、前腸内胚葉の分化過程においてSox17陽性細胞はHex陽性細胞とほぼ同時に出現し、その後、肝臓予定領域と膵臓予定領域の間に滑り込むようにmovementする。またこの領域のSox17陽性細胞から胆のう、胆管が形成されることが明らかとなり、内胚葉の部位特異性にSox17陽性細胞が積極的に関与することが証明された。

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 12 件)

1. Sato T, Kanai-Azuma M, 以下 18 名
Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of Sertoli cells in mouse and hamster testes. PLoS One.; 6(12), 2011
2. Pfister S, Kanai-Azuma M, 以下 8 名
Sox17-dependent gene expression and early heart and gut development in Sox17-deficient mouse embryos. Int J Dev Biol., 55(1):45-58, 2011
3. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, 以下 9 名
Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva.
Biol Pharm Bull, 34(1):13-23, 2011
4. Tashiro F, Kanai-Azuma M, 以下 8 名
Maternal-effect gene Ces5/Ooep/Moep19/Floped is essential for oocyte cytoplasmic lattice formation and embryonic development at the maternal-zygotic stage transition.
Genes Cells, 813-828, 2010
5. Uemura M, Kanai-Azuma M, 以下 9 名
Expression and function of mouse Sox17 gene in the specification of gallbladder/bile-duct progenitors during early foregut morphogenesis.
Biochem Biophys Res Commun, 357-363, 2010
6. Hara K, Kanai-Azuma M, 以下 7 名
Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis.
Dev Biol, 427-439, 2009
7. Hiramatsu R, Kanai-Azuma M, 以下 8 名
A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice.
Development, 129-138, 2009
8. Matoba S, Kanai-Azuma M, 以下 6 名

- Establishment of testis-specific SOX9 activation requires high-glucose metabolism in mouse sex differentiation. *Dev Biol.* 324(1):76-87, 2008
9. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, 以下3名
Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva.
Biol Pharm Bull. 31(6):1059-1062, 2008
 10. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, 以下3名
Exosome-like vesicles in *Glycydium blomhoffii* venom. *Toxicon.* 51(6):984-993, 2008
 11. Mizukami T, Kanai-Azuma M, 以下4名
Five azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, specifically inhibits testicular cord formation and Sertoli cell differentiation in vitro. *Mol Reprod Dev.* 75(6):1002-1010, 2008
 12. Kabir-Salmani M, Kanai-Azuma M, 以下9名
The membrane-spanning domain of CD98 heavy chain promotes alpha (v) beta3 integrin signals in human extravillous trophoblasts.
Mol Endocrinol. 22(3):707-715, 2008

[学会発表] (計 41 件)

1. Ikuo Nobuhisa, 間3名, Masami Kanai-Azuma, 以下2名: Maintenance of immature phenotype of the hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region by SoxF family proteins, The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Dec. 13-16, 2011. Yokohama.
2. M. Kanai-Azuma: Sox proteins in neural stem cells and progenitors, Third International Sox Meeting, Sep.11-14, 2011. Germany.
3. 上村麻実、金井克晃、金井正美: Sox17 変異マウスを用いた新生仔肝炎モデルの病因解析、第 58 回日本実験動物学会、2011 年 5 月 25 日-27 日、船堀
4. Ikuo Nobuhisa, 間4名, Masami Kanai-Azuma, 以下2名: Role of SoxF family proteins in the maintenance of immature phenotype of hematopoietic progenitors in the aorta-gonad-mesonephros region, The 9th Stem Cell Research Symposium, May 13-14, 2011, Tokyo.
5. 金井正美: 始原生殖細胞の移動と Sox17 の関与. 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、東京、2010 年 9 月 4 日-5 日
6. Kyoko Harikae, 間2名, Masami Kanai-Azuma, 以下3名, SRY-dependent inducibility of SOX9 expression in developing mouse ovaries: A sexually bipotential population of granulosa cells and its contribution to sexual plasticity in ovarian follicles. 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Kyoto, June 20 -23, 2010.
7. 金井正美, 以下7名: Sox17 変異マウスでのハプロ不全と新生児肝炎モデル. 第 57 回実験動物学会、京都テルサ、2010 年 5 月 12 日-14 日
8. 金井正美, 以下3名: 前腸から胆嚢、胆管前駆細胞への決定過程における $\langle I \rangle$ Sox17 $\langle I \rangle$ 遺伝子の発現と機能解析. 第 115 回日本解剖学会、岩手大学、2010 年 3 月 28 日-30 日
9. 上村麻実、間7名、金井正美, 以下2名: 初期の前腸形態形成時期の胆嚢/胆管前駆細胞の特異化におけるマウス Sox17 遺伝子の発現と機能. 第 149 回日本獣医解剖学会理事会・総会、東京、2010 年 3 月 26 日-28 日
10. 金井正美, 以下2名: 内胚葉の形態形成運動と Sox17. 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、横浜、2011 年 3 月 28 日-30 日
11. Ranajeet S Saund, Masami Kanai-Azuma, 以下2名: Roles of definitive endoderm in establishment of left-right asymmetry in the mouse embryos. Keystone Symposia on "Cilia, Signaling and Human Disease", Monterey, California, U.S.A., Feb.21 -26, 2010.
12. Uemura M, 間9名, Kanai-Azuma M, 以下1名: Reactivation of mouse Sox17 gene in ventral foregut gallbladder specification at early somite stages. 第 32 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、2009 年 12 月 9 日-12 日
13. 金井正美, 以下3名: Sox17 遺伝子ハプロ不全による新生児肝炎モデル日本解剖学会関東支部会 第97回学術集会、防衛医科大学、2009年10月24日
14. Kanai-Azuma M, 以下4名: Haploinsufficiency of Sox17 causes defective maturation of fetal livers in C57BL6 mice. 16th International Society of Developmental Biologists Congress 2009. Sep. 6-10, 2009. Edinburgh. UK
15. Uemura M, 間7名, Kanai-Azuma M, 以下1名: Sox17 function in mouse hepatopancreatic system. 第42回発生生物学会、2009年 5月28日-31日、新潟.
16. Masami Kanai-Azuma: Haploinsufficiency of Sox17 results in neonatal Hepatitis in C57BL6 mice. 2nd Sox Meeting、淡路島夢舞台、2008年9月16日-19日
17. Shogo Matoba, Masami Kanai-Azuma, 以下6名: Establishment of Testis-Specific SOX9 Activation Requires High-Glucose Metabolism in Mouse Sex Differentiation、国際性分化シンポジウム、九州大学、2008年9月14日-16日
18. 三浦雄太郎、間5名、金井正美, 以下1名: マウス肝臓の後期発生における Sox17 のハプロ不全、第15回幹細胞研究会、静岡県男女参画センター、2008年6月27日-28日
19. Shogo Matoba, 間1名, Masami Kanai-Azuma, 以下2名: Establishment of SOX9 Activation in Pre-Sertoli Cells Requires High Glucose

Metabolism during Mouse Testis Formation、

第 41 回日本発生生物学学会、徳島、2008 年 5 月 26 日-28 日

20. 上村麻実、間 3 名、金井正美、以下 1 名：前腸の内胚葉臓器での Sox17 の役割、第 145 回日本獣医学会、麻布大学、2008 年 3 月 28 日-30 日

〔図書〕（計 2 件）

- ① 金井正美（訳）、丸善株式会社、ジュンケイラ組織学、2011 年、pp. 117-122
② 金井正美、学窓社、獣医組織学・第 5 版・第 15 章、2011 年、pp. 219-230

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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◇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

<http://www.tmd-cea.jp/eam/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 正美 (KANAI MASAMI)

東京医科歯科大学実験動物センター・教授

研究者番号：70321883

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：