

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03261

研究課題名(和文) マウス胚エピブラスト形成時の品質管理機構とその発生の正確性における役割

研究課題名(英文) Mechanisms and roles of the quality control of epiblast during its formation in mouse embryos

研究代表者

佐々木 洋 (Sasaki, Hiroshi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：10211939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：胚内の個々の細胞の状態には「ばらつき」があるが、胚がばらつきを克服して正確に体を作る仕組みはほとんど分っていない。本研究は、その仕組みの1つである、我々が発見したマウス着床前胚のエピブラスト形成時の細胞競合による細胞分化状態のばらつき解消現象に注目し、その仕組みと役割との解明を目的とした。遺伝子発現の比較から細胞競合に関わるシグナルの候補を得、また、網羅的スクリーニングが可能なES細胞を用いた細胞競合模倣系を樹立した。さらに、細胞競合の抑制は着床後初期胚で一過的な細胞配置の乱れを起こすが、次第に補正されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果の学術的意義は、発生過程で見られる数少ない生理的な細胞競合現象であるマウス着床前胚のエピブラスト形成時の細胞競合について、その分子機構を解明するための具体的な手掛かりを与えたこと、また、その着床後胚における役割を明らかにしたことである。特に、着床後初期胚の組織構築の乱れが次第に補正されたことは、胚は細胞競合以外にも発生を正確に進める仕組みを持つことを示す重要な知見であり、今後、その仕組みの研究を進めることにより胚の持つ多様な発生調節能力の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：During development, "variability" exists in the state of individual cells within the embryo, but little is known about how the embryo overcomes this variability to accurately form the body. In this study, we focused on the cell competition that resolves variability of cell differentiation during epiblast formation in mouse preimplantation embryo and aimed to understand its mechanisms and roles. Comparison of the gene expression profiles revealed a candidate signal of cell competition. We also established an in vitro model of cell competition with ES cells, which can be used for functional screening. Furthermore, we found that the inhibition of cell competition caused transient disruption of cell arrangement in the early post-implantation embryos, but cell arrangement was gradually corrected.

研究分野：マウス初期胚発生

キーワード：細胞競合 着床前胚 細胞分化 エピブラスト Hippo シグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生の正確性について。発生はなぜ正確なのか？これは発生学の重要な未解決問題の一つである。発生は、一つの受精卵から細胞分裂と分化を繰り返すことで多数の細胞からなる組織・体を正確に作り上げる。これまでに発生学は発生の様々な過程を制御する遺伝子とその役割を解明し、シグナル 転写因子 細胞分化・形態形成という発生制御機構の概要を明らかにしてきた。一方で、近年の細胞レベルの精緻なライブイメージングや1細胞 RNA-seq の研究は、胚内の個々の細胞の挙動や遺伝子発現などの状態は均質ではなく、「ゆらぎ」や「ばらつき」があることを明らかにした。胚というばらつきのある細胞の集団はなぜ正確に体を作ることができるのか？発生はなぜ正確なのか？ばらつきのある細胞が集団として正確に体を作るためには、個々の細胞が隣接細胞の状態を認識して状態を調和させるなどの細胞間コミュニケーションが必要と考えられる。しかし、胚発生の、いつ、どこで、どのように、そのようなコミュニケーションが起こっているのか？また、そのコミュニケーションは発生の正確性や個体の完成度(健康)に対してどの程度重要な役割を果たしているのか、ほとんどわかっていない。

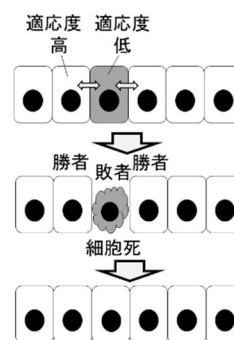


図1. 細胞競合の概念図

(2) 細胞競合について。隣接細胞間の状態認識を行う細胞間コミュニケーションの一つに細胞競合がある。細胞競合では、一つの組織内に適応度(fitness)の異なる細胞が存在した場合、相対的に適応度の低い細胞を敗者として細胞死により排除し、適応度の高い細胞が勝者として増殖する(図1)。私はこれまでに、細胞競合が発生の正確性に重要なのではないかと考えて研究を行い、まずマウス胚由来の培養細胞で細胞競合が起こることを見出し[1]、さらに、マウス胚において、細胞競合が着床前胚の細胞分化のばらつきを解消することを見出した[2](図2)。

(3) マウス着床前胚における生理的な細胞競合について。着床前のマウス胚は胚盤胞となり着床する。後期胚盤胞には、多能性細胞からなるエピプラストが作られるが、我々は、その時、内部細胞塊でHippo経路の転写のコファクターYAPが核移行して転写因子TEADが次第に活性化してSOX2等の多能性因子の発現を誘導する事でエピプラストができることを見出した(図2)。形成中のエピプラストでは、個々の細胞におけるTEAD-YAPの活性はばらついており多能性因子の発現にばらつきが生じる。そしてエピプラスト細胞間で細胞競合が起こり、多能性因子の発現の低い低品質な細胞が敗者として排除されることで、多能性因子の発現の高い高品質な細胞からなるエピプラストが形成されることを見出した(図2)[2]。すなわち、ここでは細胞競合による品質管理が、発生過程に生じる細胞分化(遺伝子発現)のばらつきを解消している。

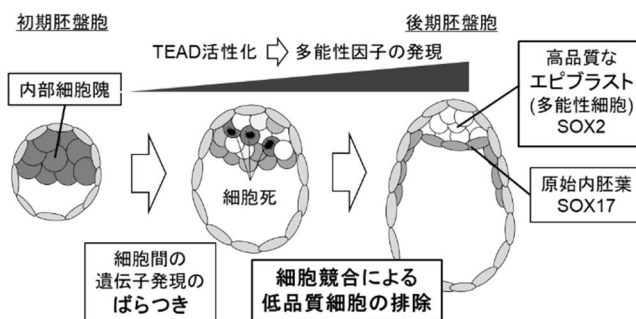


図2. マウス着床前胚のエピプラスト形成における細胞競合の役割

2. 研究の目的

本研究の目的は、胚はどのようにしてばらつきを克服して正確に発生するのか、という問いに対する一つの答えを得ることである。具体的には、我々が見出した、着床前胚のエピプラスト形成時にみられる生理的な細胞競合による細胞の品質管理の現象に注目し、その細胞競合の分子機構と、その品質管理が発生の正確性に果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現プロファイルの比較による細胞競合の分子機構の解明。エピプラスト形成時の細胞競合の分子機構を解明するために、細胞競合の勝者と敗者細胞の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。着床前胚を *in vitro* で培養し、エピプラスト形成過程の初期胚盤胞から後期胚盤胞までカスパーゼ阻害剤(Z-VAD-fmk)で処理して敗者細胞のアポトーシスによる排除を抑制した胚とコントロール胚を用意した。それぞれの胚盤胞から内部細胞塊を単離し、単一細胞に解離してRamDA-seq法によりcDNAライブラリーを調製して1細胞RNAseqを行い、個々の細胞における遺伝子発現プロファイルを得た。プロファイルの解析にはiDEP[3]、Seurat[4]、iTalk[5]、Metascape[6]を用いた。細胞競合に関わる候補因子の解析には、受精卵へのエレクトロポレーション法によるゲノム編集を用いて候補因子の変異胚を作成し[7]、F0で表現型を解析した。また、Trp53変異体の解析には、ゲノム編集によって新たに樹立した変異体系統も用いた。

(2) 細胞競合の分子機構の解明に向けた新たな *in vitro* の細胞競合系の樹立。着床前胚で網羅的な遺伝子解析や細胞競合関連因子の機能的スクリーニングを網羅的に行うことは困難である。そこで、そのような機能的解析に使用することを目的として、胚性幹 (ES) 細胞を用いて着床前胚のエピプラスト形成時の細胞競合を模倣した系を作成した。Tet-ON のシステムを用いて、薬剤 (ドキシサイクリン、DOX) 依存的に Hippo 経路のプロテインキナーゼ LATS2 あるいは LATS2 のキナーゼ活性欠損型 (LATS2-KD) と蛍光タンパク質を発現する ES 細胞を樹立した。キメラ胚の作製は 8 細胞期胚への ES 細胞のインジェクションにより行った。

(3) エピプラスト形成時の細胞競合が発生の正確性に果たす役割の解明。エピプラスト形成時の細胞死を抑制するために、Tet-ON のシステムを用いて薬剤投与によりアポトーシス抑制因子 BCL2 を発現誘導できるマウス系統を樹立し、着床前胚特異的に BCL2 の発現を誘導してその後の発生を解析した。また、受精卵へのゲノム編集によりアポトーシス実行因子 Bak, Bax, Bok を欠損したマウス胚を作成し、偽妊娠マウスの子宮に移植して発生させ、着床後初期胚の発生を解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現プロファイルの比較による細胞競合の分子機構の解明。薬剤処理により細胞死を抑制した胚とコントロール胚の内部細胞塊の細胞について 1 細胞 RNAseq を行い、各細胞における遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、コントロール胚ではエピプラストと原始内胚葉の 2 つのクラスターを形成したが、細胞死抑制胚ではそれらには属さないもう一つのクラスターが存在し、遺伝子発現パターンから敗者細胞と考えられた (図 3)。そこで、勝者細胞であるエピプラストと敗者細胞との間で遺伝子発現を比較し、それぞれに特異的に発現する遺伝子を同定した。

敗者細胞特異的に発現している遺伝子について Metascape を用いてエンリッチメント解析をしたところ、敗者細胞で p53 の活性化が示唆された。そこで、受精卵へのゲノム編集により *Trp53* 遺伝子の欠損胚を作成し F0 で表現型の解析を行ったところ、*Trp53* 欠損胚では、後期胚盤胞期においてエピプラストの細胞数が増加し、多能性因子 SOX2 の発現が低下していた (図 4)。また、SOX2 と原始内胚葉特異的転写因子 SOX17 の両方を弱く共発現する分化途上の細胞を持つ胚の割合が増加した。これらの表現型は、系統化した *Trp53* 欠損胚においても見られたことから、ゲノム編集の影響ではなく *Trp53* 遺伝子の欠損によるものであることが示された。これらの表現型はカスパーゼ阻害剤で細胞死を抑制した胚に比べて、遺伝子発現の乱れが少なく細胞の配置も乱れていないものであった。これらのことから、細胞競合の敗者細胞の排除には *Trp53* 遺伝子が必要であること、また、*Trp53* 遺伝子を欠損した敗者細胞は、細胞死せずに細胞分化を継続するためにカスパーゼ阻害によって細胞死を抑制した胚に比べて異常が少なくなっていると考えられた。

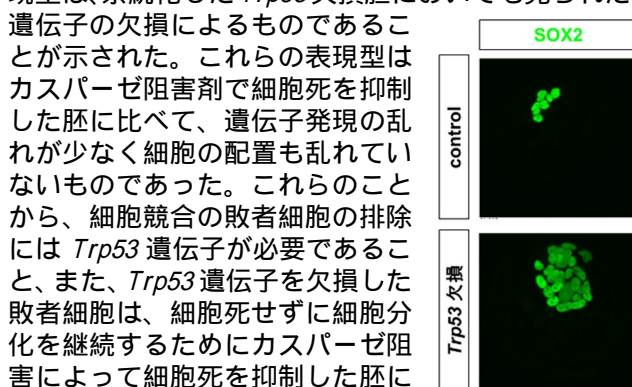


図4. *Trp53*欠損胚の後期胚盤胞エピプラストのSOX2の発現と細胞数

また、勝者及び敗者で特異的に発現している遺伝子のリストからリガンド-レセプターデータベース iTALK で検索 (筑波大学・尾崎遼准教授との共同研究) し、複数の候補因子を得た。そのうちの一つの因子について、着床前胚にゲノム編集などの胚操作によってシグナルを増減することにより、敗者細胞が勝者細胞から過剰なシグナルを受け取ると細胞死が誘導されることを示唆する知見を得た。このシグナル分子は、エピプラスト形成時の細胞競合に関わる因子の一つであると考えられ、今後、この因子に注目して解析を進めることにより、細胞競合機構の一端が解明できることが期待される。

(2) 細胞競合の分子機構の解明に向けた新たな *in vitro* の細胞競合系の樹立。エピプラスト形成時の細胞競合では、YAP が強く核移行した細胞が多能性因子の発現が強く細胞競合の勝者に、YAP の核移行が弱い細胞は多能性因子の発現が低く細胞競合の敗者になる。そこでこの現象を *in vitro* で模倣するために、Tet-ON のシステムを用いて DOX 依存的に LATS2 あるいは LATS2-KD と蛍光タンパク質を発現する ES 細胞を作成した。これらの ES 細胞は、それぞれ DOX 投与により

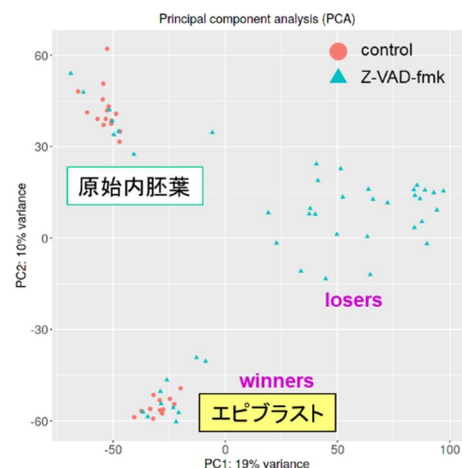


図3. 正常胚と細胞死抑制胚の後期胚盤胞の内部細胞塊細胞の1細胞RNAseqのPCプロット

YAPが細胞質あるいは核に局在した。これらの細胞をそれぞれ別々に8細胞期胚に導入してDOX存在下でキメラ胚を作成すると、どちらのES細胞も後期胚盤胞期にはエピプラストになった。しかし、両者を1:1で混合してキメラ胚を作成すると、YAPが細胞質にある細胞は次第に排除されYAPが核にある細胞のみがエピプラストになった。このことは、これらのES細胞がエピプラストになる過程で、キメラ胚においてエピプラスト形成時の細胞競合と同様の細胞競合を示唆している。そこで次に、これらのES細胞をin vitroで共培養した。通常のES細胞が多能性を維持する培養条件下では、DOXを投与しても細胞競合は見られなかったが、培養条件をin vitroで培養している着床前胚内の状態を模倣したものにすると、どちらの細胞も別々に培養した場合は維持できたが、共培養すると、YAPが細胞質にある細胞が強力に排除されYAPが核にある細胞が勝者になる細胞競合が起きた(図5)。すなわち、着床前胚の細胞競合現象をin vitroである程度模倣できる培養系を作ることができた。この系における細胞競合の過程をライブイメージングしたところ、敗者細胞が勝者細胞によって押しつぶされたりコロニーから押し出されるように排除されてゆく様子が見られ、物理的な力による細胞競合が起きている可能性が示唆された。今後、この系を用いて細胞競合に関連する因子・遺伝子の網羅的な探索を行うことで、細胞競合の分子機構を解明できることが期待される。

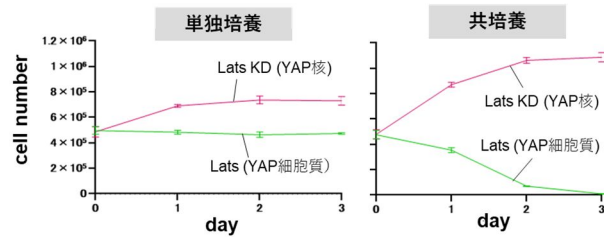


図5. YAPの細胞内局在の異なるES細胞の共培養による細胞競合

(3)エピプラスト形成時の細胞競合が発生の正確性に果たす役割の解明。エピプラスト形成時の細胞競合の役割を解析するために、薬剤投与によりアポトーシス抑制因子BCL2を誘導できるトランスジェニックマウス系統を作成し、妊娠マウスの胎生3.5日まで薬剤投与を行い胎生6.5日の着床後初期胚を回収した。その結果、低頻度でエピプラストの過形成による胚形態の乱れを示す胚が得られた。細胞死の抑制が不十分な可能性を考え、ゲノム編集により着床前胚の内部細胞塊で強く発現しているアポトーシス促進因子Bax遺伝子を破壊した。これらの胚ではアポトーシス死がほぼ完全に抑制され着床後の後期胚盤胞(胎生4.5日胚)において、エピプラストと原始内胚葉の遺伝子発現と配置が乱れ、敗者細胞の排除が起きていないことが確認できた。そこで、Bax変異胚の着床後初期胚を解析したところ、胎生5.5日ではエピプラスト細胞の遺伝子発現は均質になっていた。また、エピプラスト細胞の配置の乱れは約6割の胚で見られたが、胎生6.5日には3割に減少した(図6)。このことから、細胞競合は細胞死によって迅速に適応度の低い細胞を排除することで発生を正確に進める仕組みであることが分かった。その一方で胚は多様な発生調節能力を持ち、細胞競合が働かなくても、その後の発生において細胞分化や配置の異常などの発生の乱れを修正して、ある程度発生を正常に進めることができることも明らかになった。今後、これらの調節能力についてもその仕組みを解明することで、正確な発生を可能にする多様な調節機構が明らかになることが期待される。

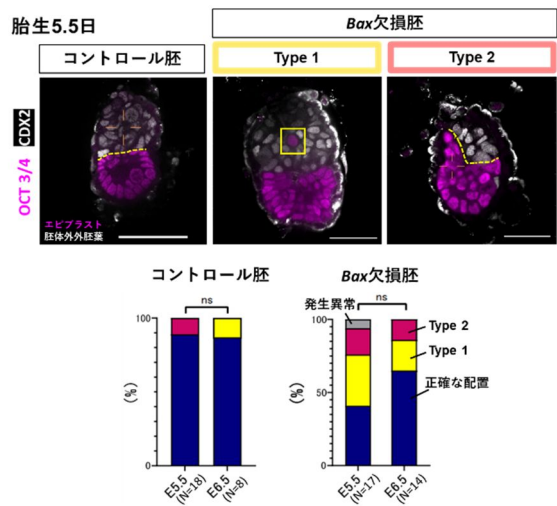


図6. Bax欠損の着床後初期胚にみられる発生異常とその頻度

<引用文献>

Mamada, H., et al., *Cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts is controlled by the activity of Tead family proteins and Myc*. J Cell Sci, 2015. **128**(4): p. 790-803.

Hashimoto, M. and H. Sasaki, *Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells*. Dev Cell, 2019. **50**(2): p. 139-154 e5.

Ge, S.X., E.W. Son, and R. Yao, *iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data*. BMC Bioinformatics, 2018. **19**(1): p. 534.

Satija, R., et al., *Spatial reconstruction of single-cell gene expression data*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(5): p. 495-502.

Wang, Y., et al., *iTALK: an R Package to Characterize and Illustrate Intercellular Communication*. bioRxiv, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1101/507871>

Zhou, Y., et al., *Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1523.

Hashimoto, M., Y. Yamashita, and T. Takemoto, *Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse*. Dev Biol, 2016. **418**(1): p. 1-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今野梨花、橋本昌和、佐々木洋
2. 発表標題 ES細胞を用いたマウスエピプラストにおける細胞競合モデルの確立
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田留衣、橋本昌和、佐々木洋
2. 発表標題 マウス着床前胚のエピプラスト形成過程における品質管理は着床後初期胚の組織構築に重要である
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本昌和、佐々木洋
2. 発表標題 マウス着床前胚におけるエピプラスト形成機構
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masakazu Hashimoto, Rui Shibata, Karin Konno, Hiroshi Sasaki
2. 発表標題 How is the epiblast established in the mouse pre-implantation embryo?
3. 学会等名 第55回 日本発生生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	尾崎 遼 (Ozaki Haruka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------