

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570263

研究課題名(和文) 体節の分節化と脊椎骨の分節化の関係の解析

研究課題名(英文) Analysis of relationship between somite segmentation and vertebra segmentation

研究代表者

高橋 雄 (Takahashi, Yu)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究者番号：60321858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：脊椎骨の分節構造は体節の分節構造に由来している。脊椎骨の形成過程には、体節の前半部と後半部が組み変わる再分節化が伴っている。Uncx4.1-LacZ トランスジェニックマウスを用いて、体節の前後パターンと再分節化の関係を解析した結果、脊椎骨の部位による遺伝子発現の違いや、マーカー遺伝子の発現境界と再分節化の境界は必ずしも一致しないことがわかった。また体節が形成されず前半部の性質を欠くMesp2欠損マウスと、後半部の性質を欠くRipply1/2ダブル欠損マウスを用いて脊椎骨の形成過程を観察した結果、椎間板と椎体の繰り返しパターンは、体節の前後パターンに必ずしも依存しないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Formation of the vertebral body from somites involves a process called resegmentation, by which the caudal half of a sclerotome is combined with the rostral half of the next sclerotome. We examined the relationship between resegmentation and rostro-caudal patterning of somite by using the Uncx4.1-LacZ transgene. Our results suggested that in the thoracic and lumbar vertebrae, the Uncx4.1-expressing caudal sclerotome gave rise to the intervertebral disc (IVD) and rostral portion of the vertebral body (VB). In the cervical vertebrae, the caudal sclerotome contributed to the IVD and both ends of the VB. This finding suggests that the rostro-caudal gene expression boundary does not necessarily coincide with the resegmentation boundary. Expression analysis of IVD marker genes including Pax1 in the wild-type, Mesp2 KO, and Ripply1/2 DKO embryos also supported the idea that a metameric pattern of IVD/VB is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somite.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：体節形成 脊椎骨 resegmentation 椎間板

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の脊椎骨・肋骨は、体の前後軸に沿って規則正しく配列した体節から形成される。個々の体節の前半部と後半部は、発現している遺伝子群が異なっている（前後極性）。体節の前後極性が形成されることが、規則正しい体節の形成や後の形態形成に重要であると考えられてきた。我々はこれまで、体節の分節化と前後極性の形成に関わる転写因子 Mesp2 や Notch シグナルの役割について研究を続けてきた。

体節から脊椎骨が形成される際には、1個の体節の後半部と次の体節の前半部が結合して、1個の脊椎骨（椎体）が形成される。これを再分節化 resegmentation という。つまり体節の分節構造が脊椎骨の分節構造の前提となっており、もし体節が分節しなければ、脊椎骨も分節しないはずである。また、再分節化の際に体節の前半部と後半部が異なる挙動を示すことから、正しく前後極性が形成されることが脊椎骨の形成に必須と考えられている。ところが、我々はこれまでの研究で奇妙な事実を見いだした。転写因子 Mesp2 のノックアウトマウスでは、体節が分節化せず、後半部のマーカー遺伝子の発現が全体に広がり、前半部のマーカー遺伝子の発現が失われている。つまり全体が後方化しており、前後極性も失われている。このマウスで脊椎骨を観察すると、体節後半部からできることが知られている神経弓の部分は確かに分節せず、連続的に癒合しているが、椎体の部分は不規則になるものの、分節化している。これは従来の考え方では説明できず、非常に不思議で興味深いことである。

ところで再分節化の過程は、ニワトリ胚では微小手術でウズラの1個の体節や体節の半分を移植する実験によって実証されているが、マウス胚では古典的な形態観察の記載があるのみで、実験的に示されていない。またニワトリでも微小手術の難しさからか、知

見は胸椎に限られ、全身の脊椎骨での結果は得られていない。さらに棘突起や肋骨の由来については明確な結論は得られていない。

## 2. 研究の目的

そこで我々は、最新の発生工学を駆使することにより、マウス胚で体節後半部の細胞を標識し、その細胞系譜を追跡することを考えた。すなわち体節後半部のマーカー遺伝子 Uncx4.1 の遺伝子座に DNA 組み替え酵素 Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインしたマウスを作製する。この Uncx4.1-Cre マウスとレポーターマウス R26R-Z を交配して得られるマウス胚では、Uncx4.1 が発現した体節後半部でのみ Cre リコンビナーゼがはたらき、普遍的なプロモーターの制御下で永続的に -ガラクトシダーゼが発現し、体節後半部に由来する細胞がラベルされることになる。これによりマウスで初めて、体節から脊椎骨が形成される再分節化の過程が視覚化される。一度ノックインマウス系統が確立すれば、交配するだけで何度でも多数の胚が得られる。また、一個体で頸椎、胸椎、腰椎など脊椎骨全体で、神経弓や肋骨についても、体節後半部に由来する細胞がどこに分布しているか、詳細に観察できる。

次にこの遺伝子座を Mesp2 ノックアウトマウスのバックグラウンドに導入すれば、体節がなく全体が後方化した体節中胚葉から、脊椎骨が形成される過程が観察できる。正常発生では体節の前半部と後半部の間が分かれて、再分節化が起きるはずであるが、Mesp2 ノックアウトマウスでは体節の境界もなく、前半部と後半部の区別もないのに、どこがどのようにして分かれるのかを検討する。それと平行して、野生型と Mesp2 ノックアウトマウスにおいて、椎体と椎間板の分化マーカーや血管など周囲の組織の空間的配置を検討する。さらに、Mesp2 ノックアウトマウスとは逆に体節全体が前半部の形質を示す（前方

化する) Ripply1,2 ダブルノックアウトマウスについても同様の検討を行う。

### 3. 研究の方法

1) 体節後半部のマーカー遺伝子 *Uncx4.1* の遺伝子座に、Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインしたマウスを作製する。この *Uncx4.1-Cre* マウスとレポーターマウス R26R-Z を交配し、両方のアリルをもつ胚を用いて、体節後半部の細胞系譜を追跡する。

具体的には、体節形成期から脊椎骨や肋骨が完成する時期までの各発生段階の胚について、遺伝子型を同定し、連続凍結切片を作製し、X-gal 染色により組織化学的に体節後半部に由来する細胞の分布を観察する。マウス胚では体の部位によって頸椎、胸椎、腰椎、仙椎、尾椎と脊椎骨が分化し、それぞれ異なった形態を示すが、各領域について脊椎骨が形成される過程を詳細に観察する。

ノックインマウス作製には時間を要し、予定通り進まない状況も考えられるので、その場合は既に保有する *Uncx4.1-LacZ* トランスジェニックマウスを用いた解析を行う。このマウスは *Uncx4.1* を発現している細胞で  $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する。*Uncx4.1* の発現に依存するため永久的ではないが、一定期間の細胞系譜は追跡できる。

2) *Uncx4.1-Cre* を *Mesp2* ノックアウトマウスのバックグラウンドに導入し、体節がなく全体が後方化した体節中胚葉から、脊椎骨が形成される過程を観察する。全体が標識された細胞から脊椎骨ができるはずであるが、どの部分がどのように分離するのか検討する。

3) 野生型、*Mesp2* ノックアウトマウス、Ripply1,2 ダブルノックアウトマウスにおいて、*Uncx4.1* 以外に硬節のマーカー遺伝子 *Pax1*, *Pax9*、椎体と椎間板の分化マーカー *Fibromodulin*, *TGF- $\beta$ 3* や関節マーカー *GDF5*,

*GDF6*、軟骨分化に関連した遺伝子およびタンパクの発現を比較観察する。また、筋節や血管など周囲の組織の空間的配置を検討する。

### 4. 研究成果

1) 体節後半部のマーカー *Uncx4.1* の遺伝子座に、Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインするためのターゲティングベクターを7回設計し直し、ES細胞に導入するためエレクトロポレーションを行ったが、確実な相同組み替えクローンは得られなかった。その後、新しいゲノム編集ツールである CRISPR を併用してエレクトロポレーションを行った結果、多数の相同組み替えクローンが得られた。これを用いてキメラ作製を行い、60%キメラマウスを得た。現在、生殖系列移行のため交配中である。そのため体節後半部の運命については *Uncx4.1-Cre* ノックインマウスに準ずる *Uncx4.1-LacZ* トランスジェニックマウスを用いて解析を行った。

2) 体節後半部で  $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する *Uncx4.1-LacZ* トランスジェニックマウスを用いて、体節から脊椎骨が形成される過程を解析した結果、頸椎と胸椎・腰椎では再分節化のパターンが異なることがわかった。まず、脊椎骨が形成される前の 11.5 日胚では、*Uncx4.1* の発現パターンに違いが見られた。胸部・腰部の硬節では *Uncx4.1* 陰性の前半部と *Uncx4.1* 陽性の後半部の比率がおよそ 1 : 1 であったが、頸部の硬節では *Uncx4.1* の発現が前方に広がり、前半部と後半部の比率が 1 : 2 に近かった。次に脊椎骨原基が形成された 12.5 と 13.5 日胚において観察すると、胸椎・腰椎では、*Uncx4.1* を発現する後半部の細胞は、椎間板と椎体の前方部分に分布していた。一方、頸椎では *Uncx4.1* を発現する細胞は、椎間板と椎体の前方部、後方部の両方に分布していた。つまり椎間板の両側にまたがっていた。このことは体節前

半部 / 後半部のマーカー遺伝子の発現境界と再分節化の境界は必ずしも一致しないことを示唆している。

3) 次にこのトランスジーンを体節が形成されない *Mesp2* ノックアウトマウスのバックグラウンドに導入し、体節中胚葉から脊椎骨が形成される過程を観察した。その結果、全体が後方化した硬節から椎体と椎間板が形成されることがわかった。*Mesp2* ノックアウトマウス 11.5 日胚の外側硬節では、*Uncx4.1* 発現細胞が均一に広がっているのに対し、内側硬節では不均一な発現が観察された。すなわち *Uncx4.1* の発現は硬節全体にみられるが、発現の強い一部の細胞が密度の高いクラスターを形成して周期的に配列していた。12.5 および 13.5 日胚になると、細胞密度の高い集団が椎間板原基となり、その間が椎体原基となることがわかった (図 1)。これらのことから、いわゆる体節の前後極性とは独立して椎間板 / 椎体の分化を決定する機構が存在することが示唆された。

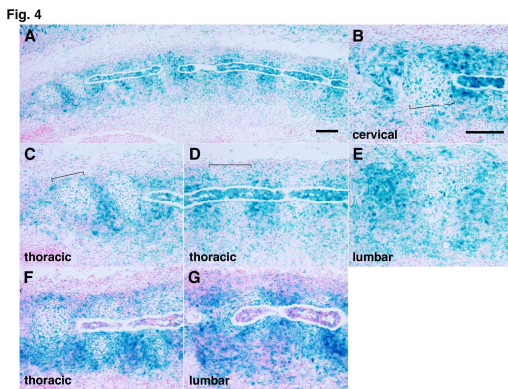


図 1 *Mesp2* ノックアウトマウスでは後方化した硬節から椎間板と椎体が形成される

4) 野生型と *Mesp2* ノックアウトマウスにおいて、*Uncx4.1* 以外に硬節のマーカー遺伝子 *Pax1*, *Pax9*、椎間板の分化マーカー *Fibromodulin*, *TGF- $\beta$ 3* や関節マーカー *GDF5*、軟骨分化に関連した遺伝子の発現を比較観察した。その結果、*Mesp2* ノックアウトマウス

においても、椎体と椎間板の繰り返しパターンが形成されること、腰椎の部分では椎間板の密度が高く顕著に癒合していることがわかった (図 2)。特に *Pax1* は、予定椎間板領域に最も早期に局在するマーカーと考えられた。野生型 11.5 日胚において、*Uncx4.1* は硬節の後半部に局在するのに対して、*Pax1* の強い発現は硬節の中央部に局在していた。このことは予定椎間板領域の *Pax1* の発現には、体節の前後極性とは独立したメカニズムが関与していることを示唆するものである。

Fig. 5

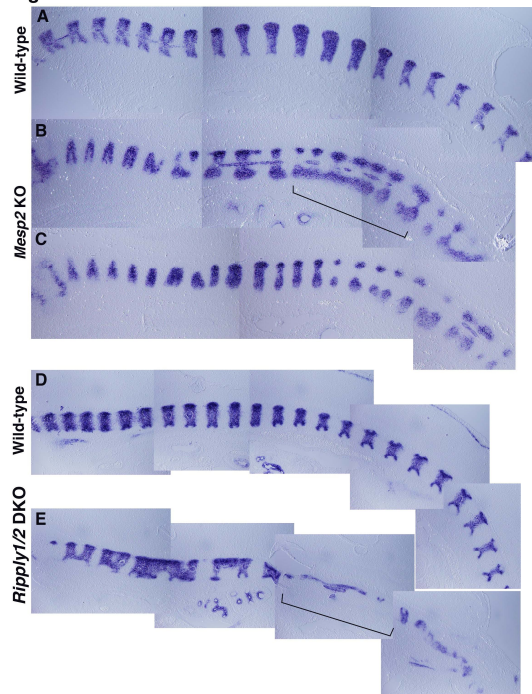


図 2 *Mesp2* ノックアウトマウス及び *Ripply1,2* ダブルノックアウトマウスにおける椎間板マーカーの発現パターン

5) 体節全体が前方化する *Ripply1,2* ダブルノックアウトマウスの脊椎骨についても、上記の分化マーカー等の解析を行った。その結果、*Ripply1,2* ダブルノックアウトマウスにおいても、不規則な椎体と椎間板の繰り返しパターンが形成されること、腰椎の部分では椎間板がほとんど形成されないことがわかった。これらの結果から、体節の前後極性は椎体と椎間板の繰り返しパターンの形成に

必須ではないことが示された。

#### 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 2 件)

Takahashi, Y., Yasuhiko, Y., Takahashi, J., Takada, S., Johnson, R. L., Saga, Y., Kanno, J. Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo. *Developmental Biology*, 380, 172-184. (2013).

doi: 10.1016/j.ydbio.2013.05.020

Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, Tamamura Y, Watanabe T, Haraikawa M, Hamagaki M, Hata K, Kanno J, Yoneda T, Saga Y, Goseki-Sone M, Kaneko K, Yamaguchi A, Iimura T. Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the *Mesp2*-null mouse: A model of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis.

*Bone*, 53, 248-258. (2013)

doi: 10.1016/j.bone.2012.11.033

[学会発表](計 2 件)

Yu Takahashi, Yukuto Yasuhiko, Jun Takahashi, Shinji Takada, Randy L. Johnson, Yumiko Saga and Jun Kanno. Metameric pattern of intervertebral disc/vertebral body is generated independently of Mesp2/Ripply-mediated rostro-caudal patterning of somites in the mouse embryo.

第36回日本分子生物学会 (2013. 12. 3-6)  
神戸

高橋 雄, 安彦行人, 相賀裕美子, 高田慎治, 菅野 純: Metameric pattern of vertebral body/intervertebral disc is correlated with Pax1 expression and is formed irrespectively of rostro-caudal patterning of somites.

第44回日本発生生物学会 (2011.5) 沖縄

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 0 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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 雄 (TAKAHASHI, Yu )  
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長  
研究者番号: 60321858

##### (3) 連携研究者

安彦行人 (YASUHIKO, Yukuto )  
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任  
研究官  
研究者番号: 40370944