

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659097

研究課題名(和文) BAC搭載HACを用いた肝上皮紋様形成ライブイメージングマウスの開発

研究課題名(英文) Development of a mouse model for live-imaging of hepatic epithelial patterning in mouse embryonic liver using a HAC carrying BACs

研究代表者

横内 裕二 (YOKOUCHI, Yuji)

熊本大学・生命資源研究支援センター・特任教授

研究者番号：60252227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：内胚葉系臓器は上皮細胞から構成された管状組織の樹状パターンを有する。それは臓器原基の構成細胞群の細胞間相互作用によって自立的に形作られる。この樹状パターンはフラクタルであることから、その紋様は何らかの数学的法則に則って形作られると思われるがその法則は不明であった。これまでに確保した3種類のCre系統の特性を生かし2細胞群挙動のライブイメージングを行うために、ROSA26レポーターの一種であるAi-3tTomを開発した。本マウスはCre依存的にミリスチル化tandem Tomatoを強く発現する。このマウスをGFP発現Creドライバーと組み合わせて使用することで目的を実現できるようになった。

研究成果の概要(英文)：Endodermal organs have tree-like structures of endodermal epithelia which are essential for performing their functions. The structures are autonomously organized by cell-to-cell interactions among different cell populations. As their final tree-like pattern of the endodermal epithelial tubes are fractal, the patterns appear to be formed based on some mathematical rules. However, the rules have been unknown because we were not able to perform real-time observation of the behaviors of the cells involved. In order to perform simultaneous real-time imaging for different two cell populations in histogenesis of the embryonic organs using Foxa2-nEGFP-CreERT2, WT1-EGFP-Cre, and Tek-Cre, we generated Ai-3tTom, a new ROSA26 reporter line. This mouse line can express myristyl tandem Tomato in a Cre-dependent manner from the ROSA26 locus, which emits very strong red fluorescence. Therefore, we are able to perform a real-time live imaging of the cells using this mouse line.

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：細胞分化 組織形成 肝臓 イメージング GFP RFP 上皮

1. 研究開始当初の背景

肝臓、肺などの内胚葉系臓器は、その機能を果たすための上皮細胞から構成

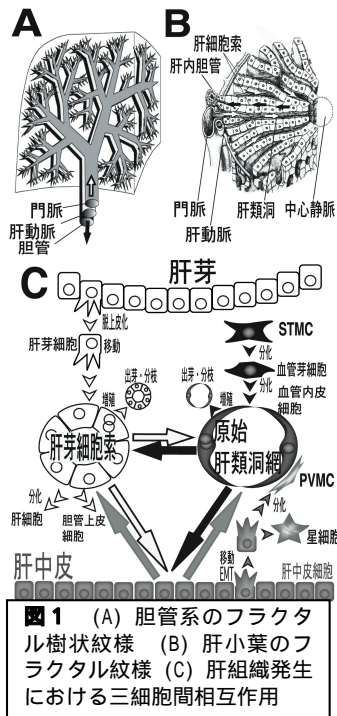


図1 (A) 胆管系のフラクタル樹状紋様 (B) 肝小葉のフラクタル紋様 (C) 肝組織発生における三細胞間相互作用

された管状組織の樹状パターンを有する。それは、臓器原基の周辺領域における3種類の細胞集団群(内胚葉系上皮細胞、血管内皮細胞、中皮細胞)間の相互作用によって自立的に形作られる。最終的に形成される上皮管系の樹状パターンは、いわゆるフラクタルであることから、その

紋様は何らかの数学的法則に則って形作られると思われる。しかし、これまでこれらの細胞の挙動をリアルタイムで観測する手段がなかったため、その法則性の実体は不明である。

2. 研究の目的

(1) 開始当初の目的

本研究の最終目標は、肝臓原基の上皮管系の樹状パターン形成時における数学的法則性を見いだすことである。そのために本計画では、(A)ヒト型人工染色体ベクター(HAC)を用いて、肝組織形成時の3細胞集団の挙動を同時に蛍光でモニターできるマウス(3BAC-HACマウス)を作製する。(B)3種類の細胞の挙動を3波長で同時にライブイメージングし計測する手法をニワトリ胚を用いて確立する。(C)最後に3BAC-HACマウス胚の肝臓における3種類の細胞の挙動を記録し肝上皮樹状パターン形成における数学的法則性を見いだす。

(2) 期間延長後の目的

平成24年度末までにBACベクターを完成することができなかった。その理由はrecombineeringを担当していたテクニシャンが病気により長期欠勤後に中途退職したためである。さらにBAC群をHACへ導入するための外注費およびHAC導入ES細胞よりマウスを作製するための経費も不足していたため、既存のマウス系統群を利用して2種類の細胞群の同時イメージングをおこなうためのマウス系統を作製することにした。

それは「目的とする細胞系譜 Cre 依存的に赤色蛍光で標識するための ROSA26 レポーター系統、Ai-3tTom の作製」である。

この新たな目的が妥当である根拠を以下に示す。平成24年度末において、平行して行っていた基盤Bのために、3種類の Cre driver 系統群 (Foxa2-nEGFP-CreERT2 (内胚葉系譜), Tek-Cre (内皮細胞系譜), WT1-EGFP-Cre (中皮細胞系譜)を維持していた。これらの系統のうち、Foxa2系 Cre driver および WT1系 Cre driver ではそのエクソンに nEGFP または EGFP 遺伝子がノックインされており、それらの胚ではそれぞれ内胚葉細胞系譜、および中皮細胞系譜特異的に Cre 非依存的に緑蛍光を発する。そこで、これらの系統を遺伝的背景とした Tek-Cre; ROSA26 reporter (赤色蛍光)マウスを作製すれば、2種類の細胞系譜の同時ライブイメージングは可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 研究開始当初の方法

(A) 3BAC-HAC マウスの作製

上皮細胞特異的発現を示すマーカーとして E-cadherin を、血管内皮細胞特異的マーカーとして Flk-1 を、中皮特異的マーカーとして WT1 を選び、それらの BAC クローン (BAC-Ecad, BAC-Flk1, BAC-WT1) に Venus cDNA, turboRFP cDNA, Azurite cDNA を in frame で組み込む。これら 3BAC を HAC に組み込んだ 3BAC-HAC を作製しさらに ES 細胞経由で 3BAC-HAC マウスを作製する。

(B) ニワトリ胚を持ちいた 3 波長ライブイメージング法の確立

前項に平行して、胚組織における蛍光を 3 波長で同時にライブイメージングし記録・計測する手法を開発する。

(C) マウス胚肝の 3 波長ライブイメージング 3BAC-HAC マウス胚肝組織における 3 種類の細胞群の挙動を同時にライブイメージングする。

(2) 期間延長後の方法

ROSA26 レポーター系統 Ai-3tTom の作製 Ai9 (CAG プロモーター-loxP-STOPx3-loxP-tandemTomato カセットを有する ROSA26 遺伝子座用ターゲットイングベクター。Dr. Zeng H により開発。Nature Neuroscience 13: 133-140, 2010)の tandemTomato cDNA をミリスチル化 tandemTomato cDNA で置換したベクター Ai-3tTom を作製した。ミリスチル化型に置換することで tandemTomato タンパクは細胞膜に局在化する。これにより核に局在する nEGFP との対比が容易になる。次に本ベクターを C57/BL6 系 ES 細胞にエレクトロポレーションし G418 耐性を指標としたスクリーニングを行う。目的とする相同組換細胞をサ

ザン解析および PCR 解析により同定後、本組換え ES 細胞由来のキメラマウス雄 (F0) を得る。さらに本雄を C57BL6N の雌と交配し F1 を得る。最後に F1 同士の交配により Ai3-tTom 系統を樹立する。

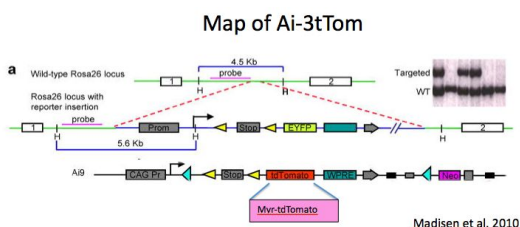


図 2. Ai-3tTom のマップ

4. 研究成果

期間延長後の研究成果について報告する。

(1) ターゲティングベクター Ai-3tTom の構築

Ai9 を FseI 消化後 SAP 処理を行いベクター部分を精製した。次に、tandemTomato ミリスチル化型 cDNA を pTAG より PCR により増幅し FseI 消化後 Ai9/FseI, SAP に挿入した。インサートの挿入方向は接続部の塩基配列を解析することで確認した。

(2) 相同組換え細胞の樹立

C57BL6N 系 ES 細胞にターゲティングベクター Ai-3tTom をエレクトロポレーションにより導入し G418 耐性クローンを 48 株樹立した。ターゲティングベクターの左腕相同組換えを検出する PCR 解析を行った結果、21 クローンが陽性であった。次にそのうちの 11 クローンについて 左腕相同組換え検出用サザン解析を行ったところ、10 クローンが目的とするクローンであった。

(3) 組換えマウスの樹立

クローン #28, #32, #44, #46, #47 をプラストシスト胚へ注入し F0 キメラマウスを得た。キメラ率 100% の個体が多く得られた #28, #44, #47 について PCR 解析を行ったところ、全個体が陽性であった。

(4) F1 マウスの樹立

#28, #44, #47 の F0 雄を C57BL6N 雌と交配し F1 を得た。すべての系統について組換え ES 細胞由来の F1 個体を得られており、germline transmission が成功していることが確認された。

(今後の研究計画)

本研究の最終目標は、「肝臓原基の上皮管系の樹状パターン形成に関わる異なった細胞群間の相互作用をライブイメージングし、その相互作用における数学的法則性を見いだすこと」である。現在、本研究計画と平行して行っていた基盤 B のために、3 種類の Cre

driver 系統群 (Foxa2-nEGFP-CreERT2 (内胚葉系譜), Tek-Cre (内皮細胞系譜), WT1-EGFP-Cre (中皮細胞系譜) を維持している。

今後は Foxa2-nEGFP-CreERT2; Tek-Cre; Ai-3tTom を交配により作成し、本系統より内胚葉系上皮細胞 / 内皮細胞をそれぞれ緑蛍光 / 赤蛍光で標識したマウス胚を確保し肝芽細胞と内皮細胞の挙動を同時にライブイメージングする。また WT1-EGFP-Cre; Tek-Cre; Ai-3tTom 系統より、中皮細胞 / 内皮細胞をそれぞれ緑蛍光 / 赤蛍光で標識したマウス胚を確保し中皮細胞と内皮細胞の挙動を同時にライブイメージングする。

(意義と重要性) 本研究によって、肝組織発生における 2 種類の細胞間相互作用を可視化できる可能性が開かれた。本マウスは胚性臓器の組織形成における細胞間相互作用を解析するための強力なツールであり、組織発生における細胞レベルの新たな現象や法則の発見にもつながることが期待できる。

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 0 件)

該当無し。

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Yuji Yokouchi, Daiki Yoshii, Hiroki Takeda, Hiroko Suda, Yukihiro Inomata, and Ken-ichi Yamamura. Functional analysis of the TGF-beta pathway in hepatoblasts during mouse hepatic histogenesis. マウス肝組織形成時の肝芽細胞における TGF-beta 経路の機能解析
47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Co-sponsor: Asia-Pacific Developmental Biology Network. May27-30, Nagoya, WINC AICHI, 2014.

〔図書〕(計 0 件)

該当無し。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当無し。

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)

該当無し。

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

横内裕二-研究内容 | 熊本大学生命資源・研究支援センター 疾患モデル分野

<http://irda-genetics.kuma-u.jp/research/r02.html>

横内裕二-研究業績 | 熊本大学生命資源・研究支援センター 疾患モデル分野

<http://irda-genetics.kuma-u.jp/publication/p03.html>

注釈： 本ホームページは平成 26 年度 5 月現在のもの。平成 26 年度より所属が「山村プロジェクト研究室」に変更。それに伴い、本ページの URL も変更されることが予想されます。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横内 裕二 (YOKOUCHI, Yuji)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
特任教授

研究者番号：60252227

(2) 研究分担者

該当無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

山村 研一 (YAMAMURA, Ken-ichi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
シニア教授

研究者番号：90115197