

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770219

研究課題名(和文) マウス初期発生における体軸形成機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of body axis formation of mouse postimplantation development

研究代表者

塩井 剛 (Shioi, Go)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・専門職研究員

研究者番号：60391968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの体軸、特に、前後軸の形成機構を明らかにするため、前後軸に沿って非対称に発現する遺伝子の探索を行った。そうしたところ、最も早く非対称に発現する遺伝子はOtx2とDkk1であることが明らかになった。過去の知見と合わせて考察すると、Otx2の非対称な発現を誘導する遺伝子が、前後軸を決める役割を担っていることが推測された。また、ライブイメージングに適した全胚培養の実験系を確立した。この系により、生きたままのマウス胚の細胞挙動を解析することが可能になり、これまでに報告例のない幾つかの事実を発見した。

研究成果の概要(英文)：To reveal the mechanism of the anterior-posterior (A-P) axis formation in a mouse embryo, the expression pattern of head organizer genes have been reexamined. I found that OTX2 gene was asymmetrically expressed from the very beginning of their expression. The gene which makes Otx2 express asymmetrically might have an important role to develop A-P axis. I also established a culture system of mouse embryos for live-imaging experiments. Then, the behavior of each embryonic visceral endoderm cell during the A-P axis formation has been examined by live-imaging experiments. I found some characteristic cell behaviors which remained to be reported.

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：前後軸形成 胚培養 ライブイメージング レポーターマウス 細胞挙動

### 1. 研究開始当初の背景

マウス胚では、前後軸が形成される前に、proximal-distal (PD) 軸が形成される。proximal 側には胚体外組織が位置し、distal 側に将来の胚になる Epiblast が位置する。1998 年、Beddington のグループは、PD 軸のみ確認できる時期に、distal 側の visceral endoderm (DVE) に局所的に発現する遺伝子、Hex 遺伝子を最初に報告した。Hex 遺伝子は、E6.5 の時期では anterior visceral endoderm (AVE) に発現する。彼らは、E5.5 の時期に Dil でラベルされた DVE の細胞群が、E6.5 では AVE へと移動することを明らかにした。AVE は epiblast の将来の anterior を決定するものであることから、この報告により、前後軸の起源が PD 軸にあることが示唆された。2004 年、同じく Beddington のグループは、Hex 遺伝子のプロモーターに GFP をつないだ Hex-GFP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、培養下で DVE に GFP を発現する細胞の挙動を観察した。そうしたところ、GFP 発現細胞群が一方方向に移動し、AVE を形成する様子が観察された。2000 年には、Hex と同様に、DVE および AVE に発現する遺伝子として、Aizawa のグループが Otx2 遺伝子を、Harvey のグループが Cer1 遺伝子を、それぞれ報告している。2004 年、Hamada のグループは、DVE および AVE に発現する別の遺伝子、Lefty1 遺伝子を報告した。彼らは Lefty1 遺伝子と Hex 遺伝子の DVE における発現様式を比較し、Lefty1 遺伝子と Hex 遺伝子を発現する細胞が必ずしも一致しないことを報告した。これにより、DVE を形成する細胞群が均一な細胞集団ではないことが示された。また、各グループは、blastocyst 期に、DVE に発現する遺伝子が ICM の一部の細胞に発現していることを報告している。以上の報告をもとに、一般的に以下のようなモデルが提唱されている。

(1) DVE/AVE に局所的に発現する遺伝子が存在する。

(2) DVE/AVE を形成する細胞群は均一な遺伝子発現を示す集団ではない。

(3) DVE を形成する細胞が、発生の進行に伴って移動し、AVE を形成する。

(4) DVE を形成する細胞は blastocyst 期に運命づけられている。

しかしながら、2011 年、Hamada のグループが Lefty1 遺伝子を発現する細胞の系譜・挙動を解析し、AVE を形成する細胞と DVE を形成する細胞が系譜的に一致しないことを報告した。これは AVE の起源が DVE でないことを示している。この結果は、上に挙げた(3、4)とは相容れない。この事実は、これまでの前後軸形成に関する研究が不十分であり、確証高い根拠が無いまま推測に基づいてモデルが構築されてきたことの一例である。前後軸形成のメカニズムには、まだ未解明な部分が多く残されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、体軸形成、とりわけ、前後軸形成のメカニズムを明らかにすることを目標にする。最初に形成される PD 軸は胚発生初期に一過的に存在する軸であるのに対し、前後軸は胚発生が終わった後も存続する体軸である。また、胚発生時に起こる様々な形態形成、例えば、頭部形成、体節形成などにも前後軸の存在は必要不可欠である。すなわち、前後軸形成のメカニズムを明らかにすることは、胚発生時に起こる様々な現象のメカニズムを明らかにするためにも非常に重要である。過去の報告を慎重に追試・検討しながら、従来には無かった手法も取り入れ、前後軸形成のメカニズムの真実に迫るのが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 「多重免疫染色法による DVE/AVE 細胞の heterogeneity の解明」

DVE/AVE に発現する遺伝子は複数あり、それらを発現する細胞同士がどの程度一致しているのかに関する情報は極めて少ない。その原因は、過去の研究のほとんどが発色による *in situ* hybridization に依存しており、個々の細胞を区別して同定するまで至っていないことにある。本研究では、DVE/AVE に発現する遺伝子の抗体を収集あるいは作製し、蛍光色素を利用した多重免疫染色を行うことにした。蛍光色素を利用した染色法は組織へのダメージが少なく、また、共焦点顕微鏡の利用により分解能の高い染色像が得られるからである。この方法により、個々の細胞を明確に区別し、DVE/AVE 細胞の heterogeneity を明らかにすることにした。また、DVE/AVE に発現する遺伝子のレポーターマウスを作製し、heterogeneity に注意しながら DVE/AVE の個々の細胞の挙動を明らかにすることにした。

(2) 「全胚培養系を用いたライブイメージング実験」

過去の多くの研究は固定した各ステージの胚を染色・観察するなどの実験に終始している。しかし、前後軸形成が起こる時期は細胞分裂が盛んであり、胚の大きさも急激に拡大する。また、前後軸形成には細胞移動を伴うことが明らかになっている。これらのことから、各ステージの固定試料を観察するだけでは、十分な時間分解能を持った情報が得られず、非常に限られた情報しか得られないと考えられる。このような方法では、前後軸形成期に起こる現象を十分に理解できるとは到底考えられない。前後軸形成期のダイナミックな変化を理解するには、経時的変化を詳しく知ることが必要不可欠である。そこで本研究では、最新のライブイメージング技術を採用した。まず、ライブイメージング実験に適したマウス胚の培養系を確立することにした。そして、DVE/AVE に発現する遺伝子のレポーターマウスを利用して、DVE/AVE を形

成する細胞群をラベルし、その挙動を詳細に解析することを目指した。また同時に、VE/AVE を形成する細胞群をラベルするだけでなく、DVE/AVE 以外の細胞も同時にラベルし観察することで、前後軸形成期の細胞分裂・移動、細胞死を、胚全体の視点から包括的、かつ、詳細に把握することを試みた。

(3)「領域特異的なレポーターマウスの作成」

DVE/AVE 以外の VE 細胞も含め、全ての VE 細胞に特異的に蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスを作製・利用することで、Epiblast と明確に区別して、VE 細胞の挙動を包括的に把握することが可能になる。また、Epiblast は将来に胚組織になる部位であり、発生初期には VE に囲まれている。これまでの報告からは、AVE から Epiblast に対して何らかのシグナルが送られ、Epiblast の anterior が規定されると考えられている。しかし、AVE が形成される以前から、VE 細胞と Epiblast の細胞が協調的な挙動をしている可能性は否定できない。さらには、VE と Epiblast の間で組織を超えて細胞が移動することも報告されている。VE 特異的レポーターマウスや、Epiblast 特異的レポーターマウスを作成することで、これらの可能性や過去の報告例をクリアに検証・追試できるものと期待し、実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1)「前後軸に沿って最も早く非対称に発現する候補遺伝子の発見」

前後軸形成に重要な役割を担うと考えられている、DVE に発現する遺伝子、Cer1、Dkk1、Hex、Lefty1、そして Otx2 に対する抗体を用いた免疫染色法によって発現解析を行った。そうしたところ、それらの全てが、DVE が形成される前のステージで発現を一旦失うことが確認された。その後、再び発現を始めたときには、Dkk1 と Otx2 だけが将来の前後軸に沿って非対称な発現を示していた。DVE が形成する細胞群では、Cer1 と Lefty1 を発現する細胞は一致していた。Hex は Cer1 と Lefty1 を発現している細胞に加え、さらに広い範囲で発現が認められた。Otx2 は Hex よりさらに広い範囲で発現していた。Dkk1 は Otx2 を発現している細胞群の中でも proximal の細胞で発現していた。以上の結果をまとめると、Otx2 を発現している細胞群の中に、Cer1、Dkk1、Hex、Lefty1 を発現している細胞が全て含まれることになる。興味深いことに、DVE が形成される直前には、Otx2 と Dkk1 のみが非対称な発現を示していた。すなわち、前後軸に沿って最初に非対称な発現を示す遺伝子が、Otx2 と Dkk1 であることが示唆された。

(2)「マウス胚のライブイメージング実験系の確立」

本研究で対象とするステージのマウス胚の培養方法は既に存在していたが、多量の培地が必要であったり、胚を培地の中で固定し

ないように回転させながら培養することが必要であった。そのため、多サンプルを扱いながらライブイメージング実験をするには適していなかった。本研究では、ゲルを利用することで胚の位置を固定し、多サンプルを同時に撮影することを可能にした。また、培養装置を備えた顕微鏡システムを利用することで、ライブイメージング実験にも対応できるようになった。

(3)「Otx2 のレポーターマウスの作成と発現細胞の挙動解析」

Otx2 のレポーターマウスの作成に成功し、内在性の発現と同様に、レポーター遺伝子が非対称な発現を示すことを確認した。次に、Otx2 レポーターマウスをライブイメージングしたところ、Otx2 の非対称な発現と将来の前後軸に相関関係があることが明らかになった。また、それと同時に、最初に Otx2 を強く発現する細胞と、前後軸形成後に Otx2 を強く発現する細胞が一致していないことも明らかになった。Dkk1 も同様であった。最初に Otx2 を強く発現する細胞は、その後、発現を弱め、posterior を占めるのに対し、最初に Otx2 を弱く発現する細胞は、その後、発現を強め、anterior に移動するようになった。このことから、Otx2 が VE で発現を始めるときには、既に前後軸が決定されていると考えられる。また同時に、Otx2 と Dkk1 の非対称な発現を誘導する分子の存在が想定される。

(4)「VE 細胞の挙動解析」

全ての細胞核に蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスを用いてライブイメージング実験を行った。取得した画像上で、細胞核に印を付けて、個々の細胞のトラッキングを行った。それにより、VE の細胞挙動を解析した。現在までに明らかになったのは次の通りである： 姉妹細胞の分裂は同調している、姉妹細胞は移動や分裂をしても隣り合うように位置する、DVE より proximal に存在する将来の anterior に位置する細胞群も DVE と同様な移動パターンを示す、将来の posterior に位置する細胞群は移動せず、その場で分裂を繰り返す。以上の細胞挙動には、これまでの報告と一致しないものや報告されていないものが含まれており、新しい知見になる可能性が大いに見込まれる。

(5)「Epiblast 特異的レポーターマウスの作成」

VE にのみ H2B-EGFP を発現する VE 特異的レポーターマウスと、Epiblast にのみ H2B-mCherry を発現する Epiblast 特異的レポーターマウスを作成した。これらを交配させて得られる胚は、VE が緑色蛍光を、Epiblast が赤色蛍光を出すようになる。VE と Epiblast の組織間で細胞移動が起きた場合、固定胚でも区別することができると期待される。また、これらを交配させて合わせてライブイメージングすることで、VE と Epiblast の細胞をよりクリアに区別しながら細胞挙動を解析

できると期待される。これにより、全細胞で H2B-EGFP を発現するレポーターマウスで細胞挙動を解析する場合に比べ、解析にかかる負担が軽減されることも期待できる。

#### 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 1件)

Visualization of cell cycle in mouse embryos with Fucci2 reporter directed by Rosa26 promoter.

Abe T, Sakaue-Sawano A, Kiyonari H, Shioi G, Inoue K, Horiuchi T, Nakao K, Miyawaki A, Aizawa S, Fujimori T.

Development. 2013 Jan 1;140(1):237-46. doi: 10.1242/dev.084111. (査読あり)

[学会発表](計 13件)

Go Shioi, Hideharu Hoshino, Kana Bando, Kazuki Nakao, Toshihiko Fujimori and Shinichi Aizawa  
Live Imaging Analysis of Mouse Postimplantation Development  
CDB Symposium 2013: The making of a vertebrate, March 4-6 2013, Kobe Japan

Hoshino Hideharu, Go Shioi, Takaya Abe, Kazuki Nakao, Shinichi Aizawa  
OTX2 and DKK1 Exhibit the Earliest Asymmetric Expression in Distal Visceral Endoderm  
CDB Symposium 2013: The making of a vertebrate, March 4-6 2013, Kobe Japan

Go Shioi, Hideharu Hoshino, Kana Bando, Kazuki Nakao, Toshihiko Fujimori and Shinichi Aizawa  
Live Imaging Analysis of Mouse Postimplantation Development  
46<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese society of developmental biologists, May 29-31, 2013, Matsue, Japan

Hoshino Hideharu, Go Shioi, Takaya Abe, Kazuki Nakao, Shinichi Aizawa  
OTX2 and DKK1 Exhibit the Earliest Asymmetric Expression in Distal Visceral Endoderm  
46<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese society of developmental biologists, May 29-31, 2013, Matsue, Japan

Go Shioi, Hideharu Hoshino, Kana Bando, Kazuki Nakao, Toshihiko Fujimori and Shinichi Aizawa

Live Imaging Analysis of Mouse Postimplantation Development  
The 61st NIBB Conference: Cellular Community in Mammalian Embryogenesis, Jul 10-12, 2013, Okazaki, Japan

Go Shioi, Hideharu Hoshino, Kana Bando, Kazuki Nakao, Toshihiko Fujimori and Shinichi Aizawa  
Live Imaging Analysis of Mouse Postimplantation Development  
The 36<sup>th</sup> Annual meeting of the molecular biology society of japan, Dec 3-6, 2013, Kobe, Japan

Go Shioi, Hideharu Hoshino, Kana Bando, Kazuki Nakao, Toshihiko Fujimori and Shinichi Aizawa  
Live Imaging Analysis of Mouse Development during AVE Formation  
47<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese society of developmental biologists, May 27-30, 2014, Nagoya, Japan

[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

塩井 剛 (SHIOI Go)

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 専門職研究員

研究者番号: 60391968

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：