

研究課題別評価

1. 研究課題名 細胞系譜マッピングによる哺乳類の胚軸形成機構の解析

2. 研究者氏名 藤森俊彦

3. 研究の狙い：

脊椎動物の体には少なくとも前後、背腹、左右の3つの軸を設定することができる。これらの体軸は、発生の非常に初期に決定される。特にほ乳類において軸形成がどのようにして始まるかを明らかにしたいと考えた。他の脊椎動物では発生中の胚を直接観察する事が容易であることから受精直後からどのように胚軸が決まるかが明らかにされてきた。ほ乳類では胚発生は卵管および子宮の中で進み、胚を生きたままに観察する事は容易ではないが、最近のマウスを用いた研究から、軸形成機構については多くの事が明らかになりつつある。3つの軸のうち、最初に能動的に決められるのは前後軸であると考えられ、形態的に胚軸の前後が明瞭になるステージから発生時期をさかのぼる方法での研究がいくつかのグループにより行われてきている。その結果、形態的にはまだ胚軸が明確でない受精後5.5日目に着床部分からもっとも遠位にある内胚葉(visceral endoderm)で Cer-1 などのマーカーとなる遺伝子の発現が見られ、この細胞が移動して将来の前側になることが示されている。さらに発生時期をさかのぼった着床の直後は、技術的にもアプローチが難しい時期であり、形態的指標や有用な分子マーカーも存在せず、多くの問題が未解決である。

本研究においては、胚の細胞を標識し、2細胞期から前後軸の明瞭な7日目胚までの連続する細胞系譜の詳細なマッピングを行い、いつどこで胚の中に非対称性が現れ、それが胚軸にどう反映されるかを探ることを目標とした。これにより、現在理解されている所までのギャップを埋め、軸が最初に方向づけされる段階で機能している分子を同定する為の基礎的情報を獲得し、軸形成のメカニズム解明へ一歩進むことを本研究の目的とした。

ほ乳類胚の持つ調節性は明らかである。キメラマウスを作製する実験などで見られる様に、着床前の内部細胞塊の細胞は様々な状況に応じて運命を変更する事が可能で、前後軸が決定されているとは言えない。しかし、これはあくまでも緊急時に発動される調節メカニズムを含んでおり、本来の発生はどのようなプログラムで進められているか、胚がどの程度までモザイク的な発生を見せるか、胚の細胞間での違いがどう現れてくるのかを別の問題として問う点にも意義がある。そこで、できるだけ正常な発生に近い状態のもとで、胚の軸がどのように決められて行くかを検討することを目指した。

4. 研究結果：

a) Cre-loxP システムを用いた4細胞期までの細胞の標識とその細胞系譜の解析

従来までの色素などを用いた細胞の標識法に比べ、Cre レコンビナーゼを用いたゲノム上の組み換えによる細胞の標識法は、不可逆的であることや標識のシグナルが薄まってしまわないなどのメリットがある。CAG-CAT-Z マウスをレポーターとして用い、特定の割球の核に Cre 発現ベクターを注入して細胞を標識した。4細胞期までの胚の中で一つの割球をランダムに選び標識し、その割球に由来する細胞が8.5日目胚の中でどんな存在様式を示すか調べた。その結果、2細胞

期の割球間には、将来の発生運命に関して明瞭な差はみられないこと、4細胞期になると胚体外外胚葉と、それ以外の組織への分化運命の方向付けが始まるが、依然将来の体軸に関しては性質の差はみられないことが明らかになった。また、胚の中のどの細胞層においても、標識された細胞と、されていない細胞がランダムに混ざり合っていることから発生中に胚の中で大幅な細胞の配置換えがおきることが分かった。2細胞期、あるいは4細胞期に標識した胚を胚盤胞の時期に解析すると、標識細胞がまとまって存在していることから細胞の配置換えは着床後におこると考えられた。これらの結果から、細胞の配置換えが着床後に胚の中でおき、胚軸の方向付けもされることが予想された。

b)胚を in vitro で培養して、細胞の挙動を連続的に解析する手法の開発

胚の中の特定の細胞を標識し、その子孫の挙動を解析する方法にはいくつかの難点がある為、胚の中の全ての細胞を可視化して連続して観察する手法を開発することにした。まず、胚を in vitro で培養する技術の開発を行った。受精後着床以前までの約4日間については、顕微鏡上のCO₂ インキュベーターで胚を培養することが可能となった。着床後については、過去に成功した報告に基づいて実験を行っているが、容易に入手できる材料を使って高効率に発生が進められるよう更に技術を改良中である。胚の中の個々の細胞を可視化する為に、核に移行させるシグナルと融合した蛍光タンパク質 GFP を全ての細胞で発現するトランスジェニックマウスを作製した。まず、SV40の核移行シグナルを付加したGFPをCAGプロモーターの下流で発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを使って条件設定を行い、胚を安定に培養して3次元画像を連続的に取得するタイムラプスシステムを完成した。更に核分裂の際にGFPのシグナルが失われないヒストンに融合したGFPを発現するマウスを作製した。

c)胚盤胞での胚軸と卵割期の割球との関連の解析

卵割期から軸の見られる時期までの連続的な理解が必要であると考え、まずは培養法を確立した

胚盤胞までの時期を解析した。胚盤胞においては、過渡的な軸ではあるが将来胚に寄与するICM(内部細胞塊)が存在する側(Embryonic側)としない側(Abembryonic側)という軸を設定できる。胚が動かないようにアルギン酸ゲルの中に包埋して発生させ、第一卵割面とE-Ab軸との間の角度を調べた。その結果、この角度にばらつきはあるものの、多くの胚で垂直に近い関連がみられた。マウスでは、第2卵割以降細胞の分裂は同調してはおきない。次に、タイムラプス観察によって、細胞の分裂パターンを解析した。その結果細胞の分裂パターンはいくつかに分類され、必ずしも決まったパターンをとらないことが明らかになった。更に、2細胞期からの卵割の順と、胚盤胞でのE-Ab軸との関連を調べた所、ほぼランダムであることが判明した。これらの結果をまとめると、第一卵割面と胚盤胞での軸との間には関連が見られるが、2細胞期の2つの割球の間の性質の差は明瞭ではないことが示唆された。

今後はこれまでに開発したシステムを用いて、さらに詳細に第一卵割から、軸形成の時期までの連続的な細胞系譜の解析を行い、軸形成機構を明らかにすることができると考えている。

5.自己評価：

この三年間を通して、研究計画に基づいて必ずしも速いペースではないが、確実に研究は進められたと考えている。細胞系譜から一通り軸形成機構解析を終了する事を研究開始時には目標として設定したが、残念ながら最終的な目標は達成出来なかった。しかし、この期間を通して、着

床以降に胚の中でダイナミックな細胞の配置換えがおきる事を明確に実験的に示すことができた事は意義がある。また、哺乳類胚は非常に高い調節能を有していることは周知の事実であるが、正常発生においてもこの調節能を利用していることが明らかにできた事も意味が大きい。これまでに準備してきた細胞系譜の追跡のシステムはほぼ実用段階にきており、今後実際に胚の中での細胞の挙動を詳細に解析することができると考えられ、今後本研究を発展した研究を続ける必要がある。以上のように今後の発展性も考慮に入れると、これまでの3年間の研究は有意義であったとすることができる。

6. 研究総括の見解：

哺乳動物では未踏であり極めて困難な課題に挑もうとする非常に意欲的な研究である。マウスを材料として独創的な実験系を確立し、個体発生の本質的問題に真正面から取り組み粘り強く研究を展開した。その結果、哺乳類では、受精直後はもとより卵割初期過程では非常に融通性が高く体軸は決定されていないこと、また着床以降に胚体内でダイナミックな細胞の配置換えが起ることを実証した。一部の目的は未達成ではあるが、成果は今後の飛躍的発展を期待させるものとして高く評価できる。

7. 主な論文等：

主な論文

1. Toshihiko Fujimori, Yoko Kurotaki, Jun-ichi Miyazaki and Yo-ichi Nabeshima. , Analysis of cell lineage in two- and four-cell mouse embryos., Development 130, 5113-5122 (2003).
2. 動物発生工学 発生のプログラム、岩倉洋一郎他編、p50-69、朝倉書店 2002

特許

1. 電気注入法を用いた動物細胞への細胞内導入物質の導入方法およびその装置、
発明者 藤森俊彦、特許出願人 科学技術振興事業団 沖村憲樹、
出願年月日 :平成14年7月9日、出願番号 :特願2002-200223