

Title	アニマルキャップ細胞群を用いた胚全体構造の構築への挑戦
Sub Title	Attempt to create overall embryonic structure by the combination of artificially induced blastula centers
Author	森本, 健太(Morimoto, Kenta)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2015
Jtitle	生命と情報 No.22 (2015.) ,p.88- 94
JaLC DOI	
Abstract	<p>近年、幹細胞を用いた再生医療が非常に注目を浴びており、網膜や腸などの特定の臓器・組織の分化を引き起こすことが可能になっている。しかし、未だ胚の全体構造を作製するには至っていない。そこで、私はアフリカツメガエルの初期胚において分化万能性を持つアニマルキャップ(AC)細胞群を用いて、この課題に挑戦することにした。AC細胞群から人工的な胚の全体構造を導くためには、2つの胞胚期シグナルセンターの作製が必要不可欠であると判断した。今回、腹側動物極の1割球へのWnt8 mRNAの単独注入によってBCNE(blastula Chordin- and Noggin-expressing)センターを、もう一割球へのWnt8 mRNAとVegT mRNAの共顕微注入によってNieuwkoopセンターを形成できると想定されるACを作製した。この疑似胞胚期センターを含むAC片と本来のAC片のサンドウィッチ培養を行ったところ、運動能を有する培養片を作製することに成功した。さらに、組織学的解析から、脊索が確認され、その脊索がBCNEセンターに由来することが明らかになった。</p> <p>正常胚と同等の域とはまだ程遠い状態であるが、少なくともオーガナイザーに由来する領域や運動能を有す培養片が得られたことは、ボディプランの全体像を理解する上で極めて重要な意義をもつと言えるだろう。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0088

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Attempt to create overall embryonic structure
by the combination of artificially induced blastula centers

アニマルキャップ細胞群を用いた胚全体構造の構築への挑戦

環境情報学部 4年 森本健太

要旨

近年、幹細胞を用いた再生医療が非常に注目を浴びており、網膜や腸などの特定の臓器・組織の分化を引き起こすことが可能になっている。しかし、未だ胚の全体構造を作製するには至っていない。そこで、私はアフリカツメガエルの初期胚において分化万能性を持つアニマルキャップ(AC)細胞群を用いて、この課題に挑戦することにした。

AC細胞群から人工的な胚の全体構造を導くためには、2つの胞胚期シグナルセンターの作製が必要不可欠であると判断した。今回、腹側動物極の1割球への *Wnt8* mRNAの単独注入によってBCNE (blastula Chordin- and Noggin-expressing)センターを、もう一割球への *Wnt8* mRNAと *VegT* mRNAの共頭微注入によってNieuwkoopセンターを形成できると想定されるACを作製した。この擬似胞胚期センターを含むAC片と本来のAC片のサンドウィッチ培養を行ったところ、運動能を有する培養片を作製することに成功した。さらに、組織学的解析から、脊索が確認され、その脊索がBCNEセンターに由来することが明らかになった。

正常胚と同等の域とはまだ程遠い状態ではあるが、少なくともオーガナイザーに由来する領域や運動能を有す培養片が得られたことは、ボディプランの全体像を理解する上で極めて重要な意義をもつと言えるだろう。

Keywords: アニマルキャップ, BCNEセンター, Nieuwkoopセンター, β -Cat, VegT

1. 序論

1細胞である受精卵は同調的に分裂を始め一定数まで細胞数を増やし、内因的にプログラムされた情報を基に細胞を分化させ、複雑でありつつも秩序高い細胞間ネットワークを構成しながら、一つの多細胞生命体を築き上げて行く。この受精卵に秘められた生命の創造メカニズムを解明するため、仮説構築と検証を繰り返し、誘導現象をはじめとする多くのモデルが提唱されている。今では、先駆者たちの提唱した定性的なモデルを踏まえ、近年発展の著しい生物学的手法を用いることで網羅的且つ定量的に発生過程の詳細が明らかになってきている。いよいよ我々は、これまでの発生生物学の叡智を集結させて、脊椎動物レベルの多細胞生命体を人工的に創り出すことを目指しても良い段階に突入しているといっても過言ではなからう。

本研究では、アフリカツメガエルの初期胚に存在するACを用いて、胚の全体構造の人工的な構築を目指していく。人工的に胚の全体構造を造り出すためには、細胞運命を決定するシグナル分子を分泌する領域であるシュペーマンオーガナイザーが必要である(Spemann and Mangold, 1924)。シュペーマンオーガナイザーの形成にはBCNE(blastula Chordin- and Noggin-expressing)センターとNieuwkoopセンターが不可欠となり、それらは胞胚期に存在する(Kuroda *et al.*, 2004)。AC細胞を用いて人工胚を形成させるためには、分化万能性を持つ細胞群は胞胚期(ヒトで言う胚盤胞期)に存在することから考えるに、ACをこれらの両胞胚期センターへと分化させるしかない。幸い、その手法は既に確立されている。 β -Cateninの核局在をWnt8/ β -Cateninシグナルの活性化によって人工的に誘導できることから(Christian and Moon, 1993)、Wnt8 mRNAを顕微注入した胚からBCNEセンターを模倣したACを、そしてWnt8 mRNAとVegT mRNAを共注入した胚からNieuwkoopセンターを模倣したACを作製できる(Ishibashi *et al.*, 2008)。そこで、8細胞期腹側動物極の1割球にWnt8 mRNAを顕微注入し、もう一方の腹側動物極割球にWnt8 mRNAとVegT mRNAを共顕微注入することで、一つのAC内にBCNEセンターとNieuwkoopセンター両方の性質を含むACを得ることができるとは思われる。本論文では、このB-N-AC (BCNE and Nieuwkoop centers-Contained AC)を用いて人工的な胚の全体構造作製に挑戦していく。

2. 方法

2.1. 人工授精

本実験ではアフリカツメガエルの人工授精で得られた胚を使用した。メスのアフリカツメガエルにヒト絨毛性ゴナドトロピン(#HCG10000, 富士製薬工業)を皮下および筋肉に計600 U注射し、人工的に卵成熟を導いた上、排卵させた。オスのアフリカツメガエルから摘出した精巣を用いて作製した精子懸濁液を未受精卵に数滴混ぜ合わせ人工授精を行った。得られた受精卵は0.1x スタインバーグ氏溶液中で22 °Cの温度条件下で培養した。また、ゼリー層は1%チオグリコール酸溶液(100 mlの0.1x スタインバーグ氏溶液に1 mlのチオグリコール酸[#208-01026, 和光純薬工業]と5N NaOHを3 ml混ぜたもの)を用いて取り除いた。

2.2. B-N-ACとサンドウィッチ法

8細胞期腹側動物極の1割球にWnt8 mRNAを1 pg, もう一方の腹側動物極の1割球にVegT mRNAを160 pg顕微注入した(図2A)。顕微注入は1x スタインバーグ氏溶液で行い、注入から1時間後に胚を0.1x スタインバーグ氏溶液に移し、St. 9まで培養した。注入を行ったSt. 9の胚を1x スタインバーグ氏溶液に移し、0.3 mm四方サイズとなるACを切り出すことでBCNEセンター及びNieuwkoopセンター両方の誘導能を模倣したB-N-ACを得た。得られたB-N-ACと、未処理の胚から切り出したACを、それぞれのACの内側面が向かい合うようにして重ねた。

2.4. HE染色

サンドウィッチ片のうち運動能を有していた培養片はPBSFA溶液(10x PBS, ホルマリン, 超純水を

1:1:8で混ぜ合わせたもの)で固定した。固定胚は70% EtOH, 100% EtOH, キシレンの順に置換した後、パラフィン内に包埋した。包埋した胚はマイクロトームを用いて厚さ8 μm に切断し、プレパラート上の温水の表面に載せて伸展させた。プレパラートは一晩乾燥させた上で、レモゾール, 100% EtOH, 70% EtOH, 水の順に置換した後、ヘマトキシリン溶液に1分間浸した。その後流水と湯で洗浄し、エオシン溶液に1分間浸け、水, 70% EtOH, 100% EtOH, レモゾールの順に置換した。染色した組織切片の載ったプレパラートは、カナダバルサム(038-01045, 和光純薬工業)を1/10量のキシレンで弛緩させた溶液を用いて封入した。

2.5. BDA染色

HE染色と同様に組織切片をプレパラートに載せ、キシレン, 100% EtOH, 70% EtOH, 水の順に置換した。パラフィン除去を行ったプレパラートを1x wash buffer (1M Tris-HCl, 1.5M NaCl, pH 7.5 を10倍希釈したもの)で洗浄し、Streptavidin-AP solution (1x wash buffer 150 ml, Streptavidin-AP 7.5 μl)に室温下に3時間浸した。そして、1x wash bufferで洗浄した後、AP buffer (1M Tris-HCl 50 ml, 0.5M MgCl_2 50 ml, DW 400 ml)で5分洗い、BM purple溶液 7 mlとAP buffer 140 ml を混ぜ合わせた溶液に浸し、暗所4°C条件下で1日静置した。

3. 結果

3.1. ACのサンドウィッチによる外植片の培養

人工胚の作製にむけて、胞胚期に存在するBCNEセンターとNieuwkoopセンターがまず必要になると考えた。この二つの胞胚期センターを有するB-N-ACを作製するため、8細胞期の腹側動物極の1割球に *Wnt8* mRNAを1 pg顕微注入し、もう一方の腹側動物極割球に *Wnt8* mRNAを1 pgと *VegT* mRNAを160 pg共顕微注入した。得られたB-N-ACと未処理胚から切り出したACを組み合わせて作製したサンドウィッチ片を培養し、経過観察を行った(n = 138)。また、未処理胚から切り出した2つのACを組み合わせて培養したものをコントロールとした(図1A, n = 30)。作製した培養片のうち29.7% (41/138)はコントロールと同様に細胞伸長を起こさず、不整形表皮へと分化したが、70.2% (97/138)は20時間後に細胞伸長を起こしていた(図1B)。培養から72時間後には、一部の培養片では小刻みな運動能を有し、セメント腺や腸様構造を確認することができた(図1C, D, 付録動画)。

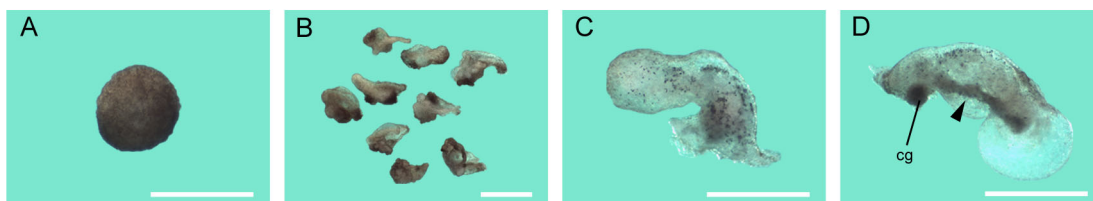


図1. B-N-ACと未処理胚由来のACでのサンドウィッチ片

(A) 未処理胚由来のAC同士でのサンドウィッチ片。不整形表皮が形成された。(B) B-N-ACと未処理胚ACのサンドウィッチ片を32時間培養したもの。培養片は高確率で細胞伸長を起こした。(C, D) B-N-ACと未処理

胚ACのサンドウィッチ片を72時間培養したもの。Cは小刻みな運動能を有していた。Dはセメント腺と腸様構造(矢頭)が確認できる。cg, cement gland. スケールバーは1 mm.

3.2. HE染色・BDA染色を用いた培養片の組織学的解析

次に、72時間の培養を行った培養片に対して、組織切片を作製しHE染色を行うことで培養片の内部構造を組織学的に解析した。またそれと同時に、*Wnt8* mRNAのみを顕微注入する割球、もしくは*Wnt8* mRNAと*VegT* mRNAを共顕微注入する割球に対してBDA (biotin dextran-amine)を注入し、ストレプトアビジン・アルカリフォスファターゼによる染色を行うことで、BCNEセンターを模倣した領域またはNieuwkoopセンターを模倣した領域の予定運命追跡を行った。その結果HE染色により、培養片において腸構造、脊索、筋組織、間充織、そして体腔内上皮が確認された(図2B-F, H-L)。また、確認された腸構造は単層立方上皮により形成されているものと、単層円柱上皮により形成されているものがあり、細胞形態分化を起こしていた(図2B)。さらに、BDA染色の結果から、腸構造はNieuwkoopセンターを模倣した*Wnt8* mRNAと*VegT* mRNAを共顕微注入した割球に由来する細胞から構成されていることが確認された(図2B')。一方、筋組織と間充織、そして体腔内上皮は、*Wnt8* mRNAのみを顕微注入した割球に由来する細胞と*Wnt8* mRNAと*VegT* mRNAを共顕微注入した割球に由来する細胞、いずれの細胞群からも構成される組織であった(図2D', F', H', K', L')。空胞化した脊索は、*Wnt8* mRNAを顕微注入した割球に由来する細胞で形成されていた(図2C'-E')。

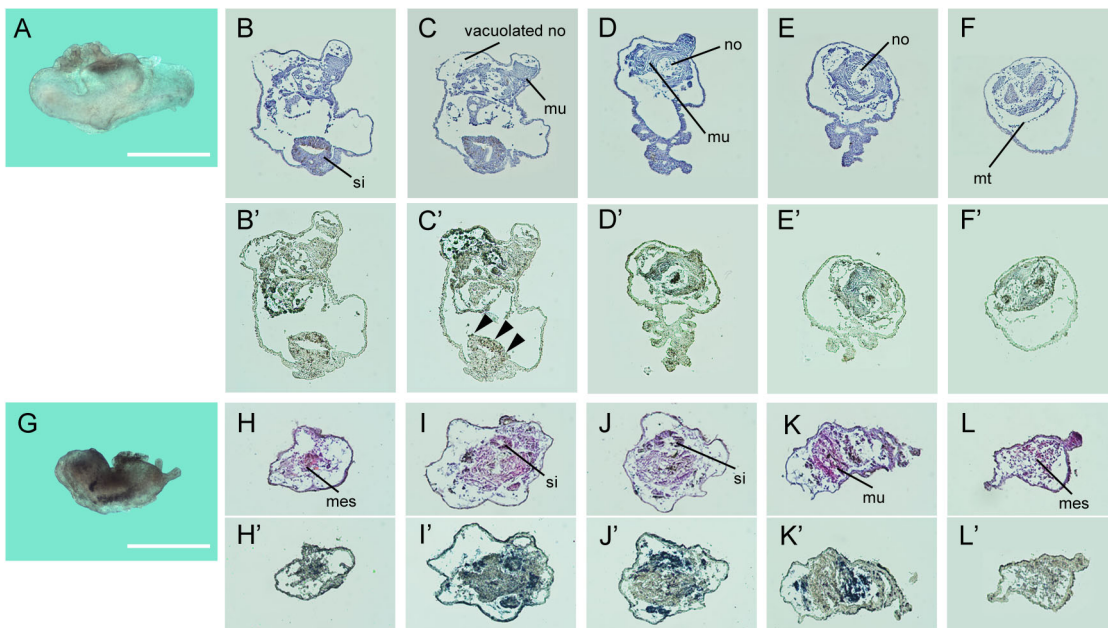


図2. 72時間培養したサンドウィッチ片とその組織切片

(A, G) B-N-ACと未処理胚由来のACでのサンドウィッチ片。培養片Aでは*Wnt8* mRNAのみを顕微注入する割球にBDAを同時に顕微注入した。培養片Gでは*Wnt8* mRNA, *VegT* mRNAを顕微注入する割球にBDAを同時に顕微注入した。(B-F, B'-F') 培養片Aの組織切片に対して行ったHE染色およびBDA染色結果。HE染色から、腸構造、筋肉、脊索、体腔内上皮の形成が確認でき、BDA染色から筋肉と脊索が青く染まっていた。(H-L, H'-L') 培養片Gの組織切片に対して行ったHE染色およびBDA染色結果。HE染色から腸構造、筋肉、

間充織が確認でき、BDA染色から腸と筋肉、間充織が青く染まっていた。si, small intestine; mu, muscle; no, notochord; mt, mesothelium; me, mesenchyme. スケールバーは1 mm.

4. 議論

本研究では、初期発生において最も重要なシグナルセンターであるBCNEセンターとNieuwkoopセンター、この両方の性質をもつACを用いて人工的に胚の全体構造を導くことに挑戦した。その結果、脳や眼組織などの明確な頭部構造を誘導することはできなかったが、作製した培養片は、軸伸長を伴い、腸管や空胞化脊索構造を形成し、そして筋組織による運動能の獲得を導くことができた。このことから、原始的な胚様体を初期発生のメカニズムに則って人工的に創造することに成功したといえよう。ここでは、1) 培養片の組織学的解析により明らかになった組織形成メカニズム、2) 頭部構造を含む人工胚作製にむけての検討、そして3) 幹細胞を用いた再生医療における貢献、について議論していく。

4.1. 培養片の組織学的解析により明らかになった組織形成メカニズム

B-N-ACと未処理胚から切り出したACとのサンドウィッチ培養片は、腸管、脊索、筋組織、間充織、そして体腔内上皮が形成されていた。中胚葉に由来する筋組織と間充織、体腔内上皮は、BDA染色の結果から、Nieuwkoopセンターだけでなく、BCNEセンター由来の細胞群からも分化することが確認された(図2F', H', K')。FGFを活性化させたAC細胞群の培養片には間充織や体腔内上皮が形成されることが知られていることから(Kimelman, 1991; Faas *et al.*, 2013)、これはNieuwkoopセンターからの中胚葉誘導物質であるNodalの分泌とそれに伴うFGFシグナルの活性化によって形成されたのであろう。また、内胚葉組織である腸管はほとんどの細胞がNieuwkoopセンター由来の細胞群であったが、ごく一部にBCNEセンターに由来する細胞の染色が確認できた(図2C'矢頭)。腸管は器官形成の過程で腸管神経前駆細胞や神経堤由来の繊維芽細胞に囲まれる。それ故、BCNEセンターから神経細胞へと分化した細胞群が細胞浸潤を引き起こし、腸管上皮の周囲を囲んだと考えられる。そして、明確な脊索構造ではないものの空胞化した脊索が確認されたが、これはBCNEセンターに由来していた(図2C'-E')。これまで、BCNEセンター領域の移植実験によって、中軸中胚葉である脊索はBCNEセンターに由来することが示唆されていたが(Kuroda *et al.*, 2004)、今回のAC培養片による結果から、脊索がNodalによる中胚葉誘導を受けたBCNEセンターから分化した領域であることを強く示唆している。

4.2. 頭部構造を含む人工胚作製にむけての検討

今回、*Wnt8* mRNAのみを顕微注入することでBCNEセンターを模倣し、*Wnt8* mRNAと*VegT* mRNAを共顕微注入することでNieuwkoopセンターを模倣した。*Wnt8* mRNAを8~32細胞期の初期胚腹側領域に顕微注入すると、顕微注入した細胞領域を中心に異所的な二次軸が形成される(Christian and Moon, 1993)。これは、*Wnt8*が*Wnt8/β-Catenin*シグナルを活性化させβ-Cateninを核局在化することで、BMPアンタゴニストであるChordinやNogginの発現が上昇し、頭部構造が形成される(De Robertis and Kuroda, 2004)。しかし、内在性*Wnt8*はSt. 9~10以降において、*Wnt8/β-Catenin*シグナルの活性化によって中胚葉の腹側化を導く(Hoppler and Moon, 1998; Ramel and Lekven, 2004)。つまり、背腹軸の決

定においてはWnt8が背側決定因子を模倣するが、内在性Wnt8は腹側化を誘導するため、BCNEセンターの模倣に用いた *Wnt8* mRNAが胚の後方化を促進することによって、培養片における頭部構造が欠損した可能性がある。そこで、同じく二次軸誘導能をもつdnGSK3を用いて、 β -Cateninの分解を抑制し、Wnt8/ β -Cateninシグナルを活性化してBCNEセンターを模倣することが有用だと考えられる。

4.3. 幹細胞を用いた再生医療における貢献

将来皮膚に分化する細胞でありながらも、分化万能性を有するACを用いて胚の全体構造を人為的に作製する。この目標に対して、運動能、そして脊索を有する培養片を作製することに成功した本実験系は妥当なものといえる。昨今、再生医療の熱が高まっており、網膜再生医療の臨床試験導入も相まってiPS細胞を用いた臓器再生の研究が活発化している(Kuroda *et al.*, 2015)。血管構造を含んだ機能的なヒト肝臓の作製に成功したのもその一例である(Takebe *et al.*, 2013)。しかし、臓器は複数種類の細胞で構成され、さらにその細胞が規則正しい空間的配置をとることで初めて機能を発揮するため、iPS細胞を用いても人工的に臓器を作製することには未だ苦戦を強いられている。さらに、臓器間相互作用を鑑みれば、主流である単一の臓器に着目したアプローチでは限界があろう。今後は全体構造の構築を睨んだトップダウンアプローチを行うことが必要になってくるのは間違いなく、本研究はその再生医療への応用の足がかりとなるであろう。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、研究方針を始め、細かく的確なご指導ご鞭撻を頂きました黒田裕樹准教授に心より感謝申し上げます。そして、多くの助言をくださったケラボメンバーの皆様にもこの場で感謝を申し上げます。最後に、素晴らしい研究の場を提供してくださった富田勝教授に感謝致します。

6. 参考文献

- Christian, J.L., and Moon, R.T. (1993) Interactions between Xwnt-8 and Spemann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of *Xenopus*. *Genes Dev.* 7, 13–28. [PMID: 8422982]
- De Robertis, E.M., and Kuroda, H. (2004) Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 285–308. [PMID: 15473842]
- Faas, L., Warrander, F.C., Maguire, R., Ramsbottom, S.A., Quinn, D., Genever, P., Isaacs, H.V. (2013). Lin28 proteins are required for germ layer specification in *Xenopus*. *Development.* 140, 976–986. [PMID: 23344711]
- Hoppler, S., and Moon, R.T. (1998). BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the *Xenopus* mesoderm. *Mech. Dev.* 71, 119–129. [PMID: 9507084]
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hanafusa, H., Matsumoto, K., De Robertis, E.M., Kuroda, H. (2008). Expression of *Siamois* and *Twin* in the blastula *Chordin/Noggin* signaling center is required for brain formation in *Xenopus laevis* embryos. *Mech. Dev.* 125, 58–66. [PMID: 18036787]
- Kimelman, D. (1991). The role of fibroblast growth factor in early *Xenopus* development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638, 275–282. [PMID: 1664686]

- Kuroda, H., Iwamiya, T., Morimoto, K. (2015) The Experimental Procedures to Create Life and Transplantable Heart. *SFC J.* 15, 262-282
- Kuroda, H., Wessely, O., De Robertis, E.M. (2004). Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via Chordin, Noggin, beta-Catenin, and Cerberus. *PLoS Biol.* 2, E92. [PMID: 15138495]
- Ramel, M.C., and Lekven, A.C. (2004). Repression of the vertebrate organizer by Wnt8 is mediated by Vent and Vox. *Development.* 131, 3991-4000. [PMID: 15269175]
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., Taniguchi, H. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.* 499, 481-484. [PMID: 23823721]

付録動画

<http://web.sfc.keio.ac.jp/~t12879km/SW.mp4>