

# ウサギ胚をモデルとしたヒト初期胚発生機構の解明

自然科学研究機構 生理学研究所

行動・代謝分子解析センター 遺伝子改変動物作製室

小林 俊寛

## 【背景と目的】

ヒトの初期発生、特に着床後、多能性をもつエピブラストが三胚葉および生殖細胞への分化する過程の解明は、幹細胞の運命決定メカニズムの理解に繋がるだけでなく、ヒトES/iPS細胞から目的細胞への分化誘導効率改善や、発生初期が原因で起こる疾患の発症機序の解明に貢献できると期待される。しかし、その時期のヒト胚は、倫理的、実際的に入手が不可能で、その過程は長らく謎に包まれてきた。モデル動物としては、繁殖等の扱いやすさに加え、遺伝子改変の容易さから、マウスを用いて初期発生研究において多くの知見が積み重ねられてきた。しかしながら、そもそも齧歯類とそれ以外の哺乳動物では初期発生において多能性をもつエピブラストの形態が大きく異なっており、マウスやラットなどでは卵筒型の形態をとるのに対し、ヒトを含む霊長類、家畜など多くの種は円盤型の形態をとる（図1A）。そのため、発生に必要なシグナルの空間的な制御が両種間で大きく異なることが古くから示唆されていた。それに加え、最近、我々や他のグループの研究から、初期発生の中でも特に、すべての生殖系列の元となる始原生殖細胞 (Primordial germ cell: PGC) の発生において、その運命決定機構がマウスとヒトで大きく異なることが明らかになった。特に顕著なのはマウス PGC でその増殖・維持に必須である SOX2 が、ヒト PGC ではほとんど発現が認められず、代わりに同じ SOXファミリーである、SOX17が高発現し、その運命決定に重要であることが示された<sup>1,2</sup>。したがって、ヒト初期発生を理解するためには、齧歯類以外の新たなモデル動物の解析が必要であると考えられる。そこで本研究では、実験動物として確立されており、比較的高度な発生工学技術も適応可能なウサギの初期胚をモデルとした。ウサギはヒトなどと同様に多能性のエピブラストが円盤型の形態をとるだけでなく（図1A）、我々の予備実験の結果から、PGCにおけるSOX2, SOX17の発現パターンもヒトに近いことが明らかになった（図1B）。そこでこれらの初期胚を利用し、三胚葉および生殖細胞が生じる過程を詳細に追跡することで、ヒト初期発生の時空間的な情報を得ることに繋がるのではないかと考えた。さらに、ウサギの胚では困難さを伴う分子メカニズムの解析を、申請者らが開発したヒトES細胞から三胚葉およびPGCへの分化誘導法<sup>3</sup>を用いて行うことで、ヒト初期胚の運命決定制御機構を解明することを目的とし、研究を進めてきた。

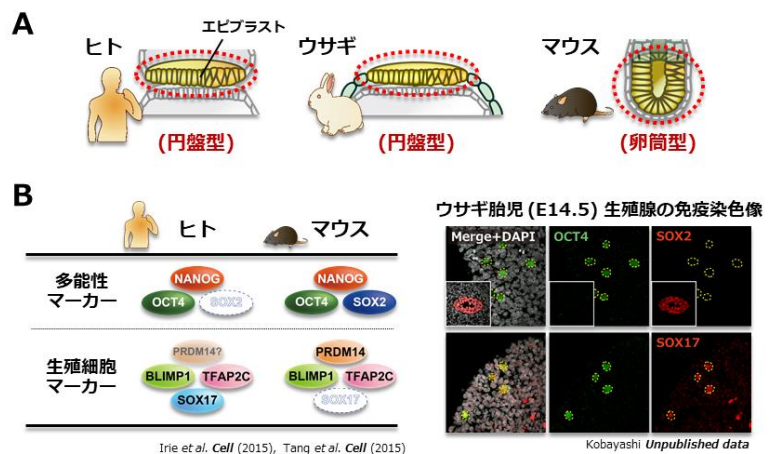


図1. ヒト、ウサギ、マウスの初期発生における多能性エピブラストの形態と PGC の遺伝子発現の違い

## 【ウサギ胚の解析】

まず、ウサギ胚の発生、とくに原腸陥入の開始前後の胚の詳細な解析を行った。ウサギは受精から約 4 日目に胚盤胞を形成し、その後しばらく着床せずに子宮の中で発生が進み、原腸陥入開始後の胎生 7 日目 (embryonic day (E) 7) 付近で着床が起こる。そこで、胚盤胞形成後の E5 から E7 までの胚を経時的に子宮から回収し、固定後、蛍光免疫染色を行った。マーカーには、将来胚になる部分であるエピブラストのマーカーとして OCT4、エピブラストの後方部、原始線条、中胚葉で発現が見られる BRACHYURY (T) を用い、多重染色後の胚を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、E5, E6 胚では T の発現は認められないが、E6.5 胚において、エピブラスト後方部に T の発現が認められ、E7 ではその陽性細胞が増加し、明瞭な原始線条を確認することができた（図2A 上段）。そこで次に、そのような発生の経時変化に伴い、三胚葉および PGC がどのように分化してくるかを明らかにするため、内胚葉・PGC で発現する SOX17 および栄養外胚葉・生殖細胞で発現する TFAP2C の発現も蛍光免疫染色により確認した。すると、E6.5 胚の T 陽性エピブラスト後方部から OCT4 陽性且つ SOX17 および TFAP2C 陽性の細胞が出現してくることが確認できた（図2A 下段）。おそらくこれは発生の最も初期段階にある PGC であると考えられる。E7 ではそれら PGC の

数が、エピブラスト後方部において増加していた (図2B)。また一方で、E7 に見られる原始線条の前方部では OCT4 陰性、SOX17 陽性の細胞が出現し、これは後に消化器などの元となる胚性の内胚葉であると考えられる (図2B)。以上の結果から、原腸陥入開始とほとんど時同じくして PGC が出現し、原腸陥入の進行に伴い内胚葉の細胞が出現してくることが明らかになった。このことは私たちが以前、ブタの胚で観察した結果と類似しており、円盤型のエピブラスト形成をする哺乳類に共通の発生機序であると考えられる<sup>3</sup>。

### 【ヒト PGC および内胚葉の転写因子

#### ネットワーク

ウサギ胚において、エピブラスト後方部から出現する PGC、あるいは原始線条前方部から出現する内胚葉で発現が認められた SOX17 は、ヒト PGC の成立に必須である一方で、古くから種を越えて内胚葉の形成にも重要な遺伝子であることが知られている。そこでこれら 2 つの全く異なる細胞種において共通する転写因子が、それぞれの細胞でどのような機能を果たしているかを明らかにしようとして試みた。興味深いことに、以前我々はヒト ES 細胞からの分化誘導系において、SOX17 を強制発現するタイミングの違いが、PGC か内胚葉の細胞どちらを誘導するかを決定していることを明らかにした<sup>3</sup>。ヒト ES 細胞を ACTIVIN と WNT シグナルで刺激しておよそ 12 時間後の細胞は BMP に反応して高効率で PGC が誘導できる一方、24 時間後の細胞は BMP に反応して中胚葉、もしくは ACTIVIN に反応して内胚葉に誘導可能な、原始線条中の中内胚葉の性質をもっているが、それぞれのタイミングでサイトカインの代わりに SOX17 を強制発現すると、12 時間後からは PGC が、24 時間後の中内胚葉からは内胚葉が誘導できる。そこで、そのタイミングの違いが SOX17 への応答性にどのような違いをもたらし、2種類の細胞を分化誘導できるかを明らかにするため、RNA-seq による各種細胞のトランスクリプトーム解析と、ChIP-seq による各細胞種における SOX17 のターゲットの同定を試みた。その結果、PGC、内胚葉それぞれの細胞種において、共通するあるいはそれぞれに特異的な SOX17 の結合パターンが明らかになった。共通する結合領域の一つとして、BLIMP1 のプロモーターおよびエンハンサー領域が挙げられる。BLIMP1 はマウスの PGC において、その最初期から発現が認められ、運命決定に重要であることが知られている<sup>4</sup>。ヒトにおいても欠損した ES/iPS 細胞株を用いると、PGC の分化誘導効率が著しく低下することが知られ<sup>1,5</sup>、PGC において種間で機能的に保存される、重要な転写因子の一つである。これが SOX17 により直接的に制御されている可能性が示唆される。一方で、内胚葉においても発現、および SOX17 の結合が認められることから、内胚葉においても何らかの機能を持っているのかもしれない。また特異的な結合では、特に、トランスクリプトーム解析からも明らかになったそれぞれの細胞について重要な遺伝子のプロモーター領域に結合が認められた。さらに、SOX17 が結合する DNA 配列のモチーフ解析を行ったところ、それぞれの細胞種に重要な転写因子の結合モチーフが見つかり、これらがそれぞれの細胞種で co-factor となって運命決定制御を行っていると考えられる。

#### 【結論】

本研究において、ウサギ初期胚の解析から、円盤型のエピブラストにおける三胚葉および PGC の発生過程が明らかになった。ウサギは、以前我々がモデルとして用いたブタよりも、小型で扱いやすく、ライフサイクルが早いため、ヒト初期発生を理解する上でのモデル動物として有用であると思われる。一方で、最近、ヒトに近い非ヒト霊長類であるカニクイザルでは、PGC の出現は初期羊膜を起源とするという報告がなされた<sup>6</sup>。ブタやウサギでは羊膜形成が原腸陥入後に起こるため、これらの動物種とは起源が異なる可能性も考えられる。しかしながら、ヒトやカニクイザルの多能性幹細胞を用いた *in vitro* の分化誘導系では、エピブラスト由来の中内胚葉に向かう途中の細胞から PGC を高効率で分化誘導できることから、エピブラストも起源であるという説も否定できないと考えられる<sup>7</sup>。この点については、最近開発が進むヒト初期胚の *in vitro* 培養、あるいはヒト初期羊膜への分化誘導法など、発生・分化過程を追跡できるシステムにより、今

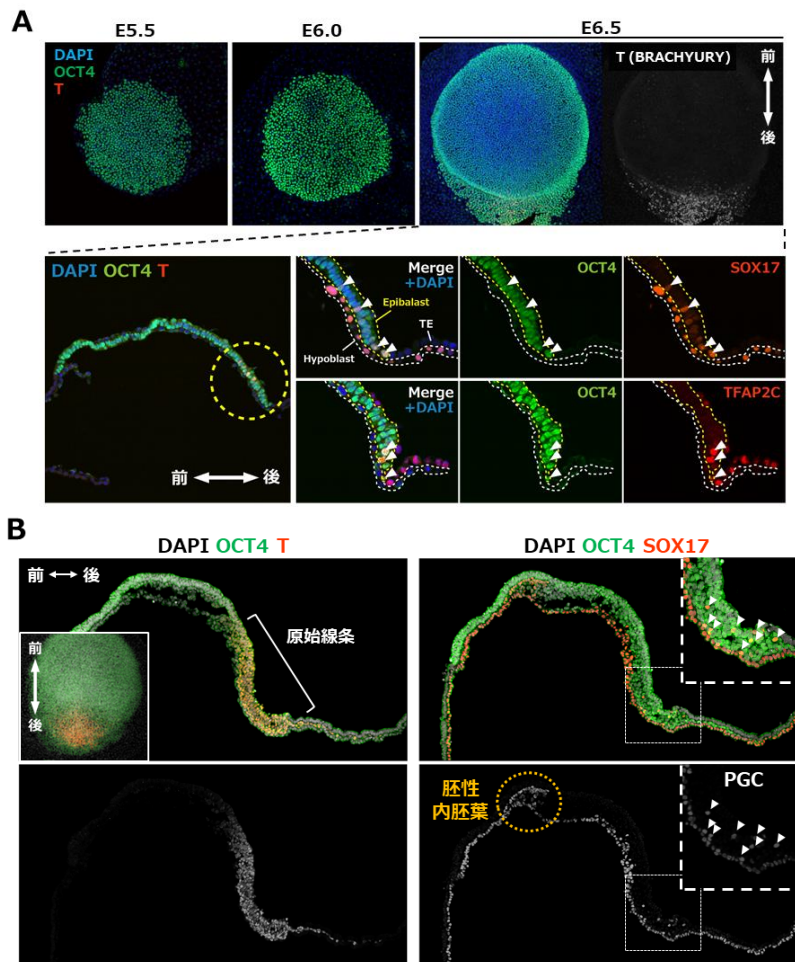


図2. 蛍光免疫染色によるウサギ初期胚の解析

後の解明が進められると予想される。

またヒト ES 細胞を用いた *in vitro* 分化誘導系を用いた PGC、内胚葉の運命決定機構の解明により、それぞれの細胞種における SOX17 を中心とした遺伝子ネットワークが判りつつある。更なる制御機構の解明により、これらネットワークの全貌が明らかになることが期待される。

本研究のように、ヒト初期発生の解明を目指し、ヒトに近い部分を持つモデル動物によりその時空間的な情報を、目的細胞を大量調整可能な *in vitro* のシステムにより分子機構を明らかにするというアプローチは、三胚葉や生殖細胞の運命決定機構だけでなく、臓器の発生や疾患の解明など様々な目的に有用であると思われる。

### 【謝辞】

本研究は所属先である自然科学研究機構 生理学研究所 遺伝子改変動物作製室、および、共同研究先のケンブリッジ大学 ガードン研究所、北山ラベス株式会社で行われました。両研究室メンバー、特に平林真澄准教授、Azim Surani 教授、Walfred Tang 博士、平尾雅郎センター長、長田泰幸研究員には、研究遂行にあたり惜しめない協力を頂き、感謝いたします。また、貴財団には平成29年度研究助成金を賜り、多大なるご支援を頂きました。お陰様で、留学帰国直後という今後の研究に繋げる重要な時期において、研究をスムーズに始めることができました。この場を借りて感謝申し上げます。

### 【引用文献】

- 1 Irie, N. *et al.* SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* **160**, 253-268, doi:10.1016/j.cell.2014.12.013 (2015).
- 2 Kojima, Y. *et al.* Evolutionarily Distinctive Transcriptional and Signaling Programs Drive Human Germ Cell Lineage Specification from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **21**, 517-532 e515, doi:10.1016/j.stem.2017.09.005 (2017).
- 3 Kobayashi, T. *et al.* Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. *Nature* **546**, 416-420, doi:10.1038/nature22812 (2017).
- 4 Ohinata, Y. *et al.* Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* **436**, 207-213, doi:10.1038/nature03813 (2005).
- 5 Sasaki, K. *et al.* Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 178-194, doi:10.1016/j.stem.2015.06.014 (2015).
- 6 Sasaki, K. *et al.* The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. *Dev Cell* **39**, 169-185, doi:10.1016/j.devcel.2016.09.007 (2016).
- 7 Kobayashi, T. & Surani, M. A. On the origin of the human germline. *Development* **145**, doi:10.1242/dev.150433 (2018).