

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960809

氏名

市川 尚文

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ハイデルベルク （国名： ドイツ ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

哺乳類着床期胚におけるニッチが体軸形成を制御する仕組みの解明3. 派遣期間： 平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： 欧州分子生物学研究所 (EMBL)部局名： 発生生物学ユニット5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

[背景と目的]

私たちヒトを含む哺乳類の発生において、胚盤胞と呼ばれる初期胚が母体の子宮に着床することはその後の正常な発生に必須の過程である (Hemberger et al., 2020; Wang and Dey, 2006)。着床前の胚盤胞は、将来の体全体へと分化するエピブラストと、胚体外組織である栄養外胚葉 (TE) および原始内胚葉 (PrE) から構成される球状の構造をとる。着床後、これら胚体外組織は胎盤などを形成し、胚の成長を支持する一方、胚は円筒状へと大きく形態変化し、前後・背腹・左右の 3 つの体軸を順に獲得する。また、胚は原腸陥入と呼ばれる、外胚葉、中胚葉、内胚葉の 3 つの主要な細胞系譜を適切に配置する過程を経る (Arnold and Robertson, 2009; Rossant and Tam, 2009; Takaoka and Hamada, 2012)。これまで主に遺伝学的手法を用いて、体軸形成や原腸陥入に重要な遺伝子やシグナル伝達が同定されてきた。一方で、**着床期の胚の形態形成やパターン形成における、細胞動態およびその制御機構についてはほとんど不明**なままである。これは子宮の存在により、着床期の発生を直接観察することが困難なことに起因している。

Ex vivo の培養系は胚発生を母体外で観察や定量、操作するために必要な実験設定であり、長年開発が試みられてきた。これまでのマウス着床期胚の培養は二次元上で行われてきたが、胚体外組織が培養基板に接着して過増殖を引き起こすため、一度平坦化した胚の三次元再構築が必要であった。従って、その過程は実際の子宮内発生とは大きく異なっており、円筒状の形態形成は約 20% の効率に留まっている (Bedzhov and Zernicka-Goetz, 2014; Hsu, 1971; Hsu, 1972; Morris et al., 2012; Pienkowski et al., 1974; Tachi, 1992)。本研究では、マウス着床期胚発生を再現するため、**ゲルを用いた三次元培養系を開発し、ライブイメージングおよび定量的な画像解析による細胞動態の解析**を可能にすることを目的とした。さらに、**胚体外組織と胚組織の間に存在する相互作用**を同定し、胚の形態形成やパターン形成におけるメカニズムを明らかにすることで、哺乳類初期発生研究における重要な基礎を導くことを目指した。

[結果]

● 栄養外胚葉にかかる張力の低下は組織陥入を伴う胚体外外胚葉の形成に必要である

子宮内発生を三次元環境中で再現するため、受精後 4.5 日目 (E4.5) の胚を基底膜由来マトリゲルと I 型コラーゲンを混合したゲルに包埋した。しかし、培養開始 24 時間後においても、培養胚は子宮内発生胚 (*in utero* 胚) のような円筒形の形態を示さなかった。蛍光免疫染色とマイクロピペットを用いた張力測定実験から、*in utero* 胚では極側栄養外胚葉 (pTE) が頂端側収縮によりエピブラスト側へと陥入している (Christodoulou et al., 2019; Copp, 1979) のに対し、培養胚では pTE が隣接する壁側栄養外胚葉 (mTE) により引っ張られることで、頂端側収縮とエピブラスト側への陥入が阻害されていることがわかった。そこで、pTE にかかる mTE からの張力を除くことができれば、頂端側収縮を引き起こすことができるという仮説を立て、以下の二つの方法でこれを検証した。

まず、赤外レーザーパルスを用いて pTE と mTE の間の細胞間接着を切除したところ、20 分以内に pTE の頂端側収縮が誘導された。続いて、微細ニードルを用いた顕微切除術により mTE を物理的に取り除いたところ、pTE は頂端側収縮に続き、切除後 2 時間でエピブラスト側への陥入を生じ、胚体外外胚葉 (ExE) を形成した。これらは仮説を支持する結果であり、**着床期の胚発生には pTE にかかる張力の低下が必要である**ことが示唆された。生体内で mTE は胎盤の形成に関わるが、以降の三次元培養では mTE を切除した胚を用いることで、エピブラストとそれに隣接する胚体外組織について調べることにした。

● 三次元ゲル培養法はマウス着床期胚発生を再現し、定量的評価を可能にする

三次元ゲルに mTE を切除した E4.5 胚を包埋し、24 時間後に培地交換を行い、のべ 48 時間培養した (図 1A)。本法を 3D-gel embedded embryo culture (3D-geec) と名付け、*in utero* 胚と比較することで、胚発生を定量的に評価した。胚の形状およびエピブラストと臓側内胚葉 (VE) の細胞数から、48 時間培養後の 3D-geec 胚は E6.0 の *in utero* 胚に相当することがわかった (図 1B-D)。*in utero* 胚においても、胚のサイズや細胞数におおきなばらつきが存在することがわかる。そこで、エピブラストと VE の合計細胞数を元に、3D-geec 胚の発生段階を計算したところ、**培養開始 24 時間後 (D1) と 48 時間後 (D2) でそれぞれ E5.20、E6.04 の *in utero* 胚と同等である**ことが明らかとなった。

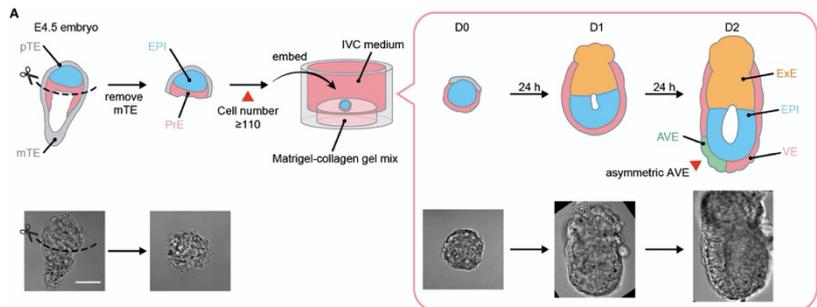
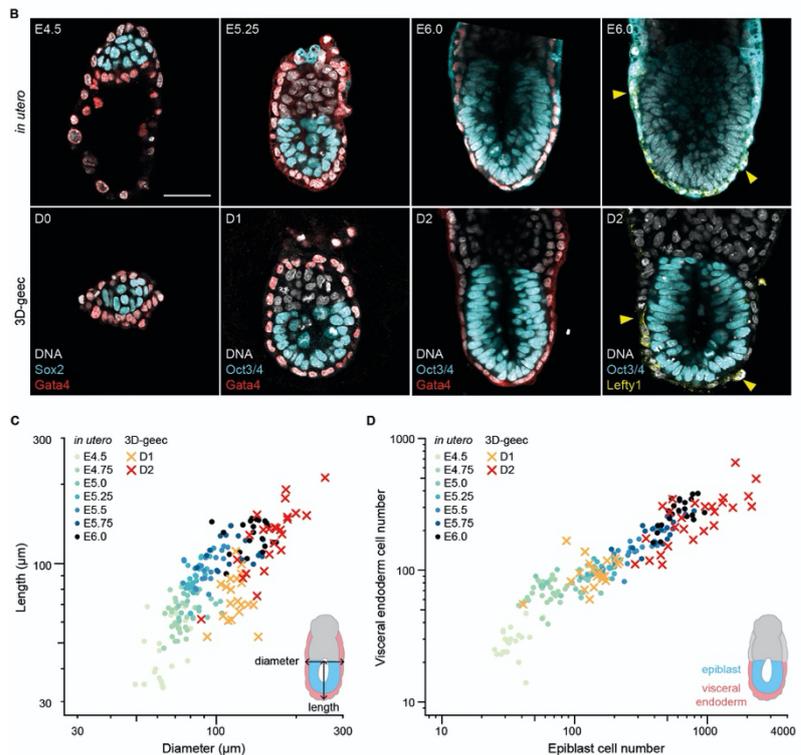


図 1. マウス胚の三次元培養.

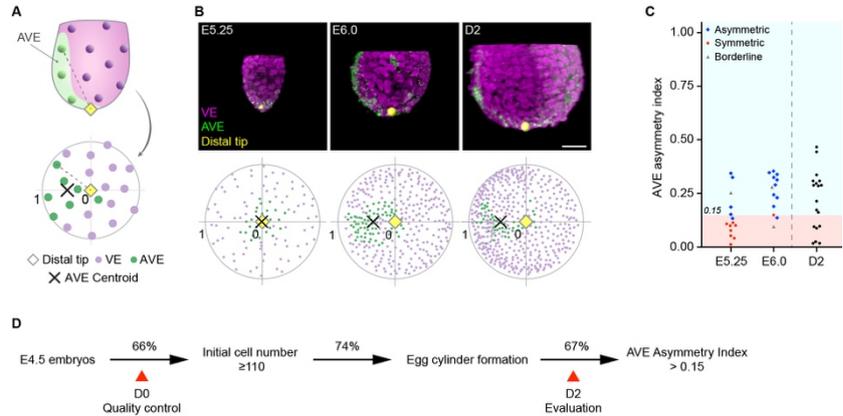
(A) 3D-geec の模式図 (上段) と胚の代表的な位相差顕微鏡画像 (下段)。自然交配により得られた E4.5 胚の mTE を切除したのち、細胞数が 110 以上の質の良い胚をマトリゲルとコラーゲンの混合ゲルに包埋し、IVC 培地で培養する。48 時間後の胚発生を形態と前後軸形成 (図 2) を元に定量的に評価できる。(B) 培養 0 日目 (D0) から 2 日目 (D2) までの 3D-geec 胚 (下段) と子宮内で発生した *in utero* 胚 (上段)。Sox2 および Oct3/4 はエピブラストマーカー。Gata4 は PrE/VE マーカー。Lefty1 陽性の AVE (黄矢頭で挟まれた領域) は将来の前側に局在する。スケールバーは 50 μm 。(C, D) 3D-geec 胚と *in utero* 胚のサイズ (C) と細胞数 (D) の比較。



次に、3D-geec 胚の細胞分化やパターン形成を評価するため、前後軸形成の鍵となる前側臓側内胚葉 (AVE) の局在を調べた。VE マーカーおよび AVE マーカーを免疫染色し、全 VE における AVE の三次元空間内の位置を二次元極座標上に投影した。胚の最も遠位点を中心とし、AVE の重心位置までの相対的距離を AVE asymmetry index として算出した (図 2A)。in utero 胚のうち、E5.25 胚の多くは AVE 未形成であるのに対し、E6.0 胚のほとんどで AVE が形成されている。このことから、AVE asymmetry index が 0.15 以上の胚を前後軸が形成された胚であると判断することにした (図 2B, C)。この判断に基づくと、D2 の円筒上の胚のうち 67% (n=12 of 18) が前後軸を形成し、円筒状の形態形成自体は 74% (n=17 of 23) の効率で生じた (図 2D)。これらを合わせ、**3D-geec 法により 49%の成功率で前後軸を有する着床後胚を再現できる**ことが示された。

図 2. 3D-geec 胚の AVE 形成。

(A) AVE asymmetry index の算出方法。(B) E5.25、E6.0、D2 胚の代表的な免疫染色画像。スケールバーは 50 μm 。(C) AVE asymmetry index が 0.15 を閾値とし、3D-geec 胚の AVE 形成を定量的に評価できる。(D) D2 の 3D-geec 胚において円筒状形成は 74% (n=17 of 23) の効率で生じ、67% (n=12 of 18) が前後軸を形成する。

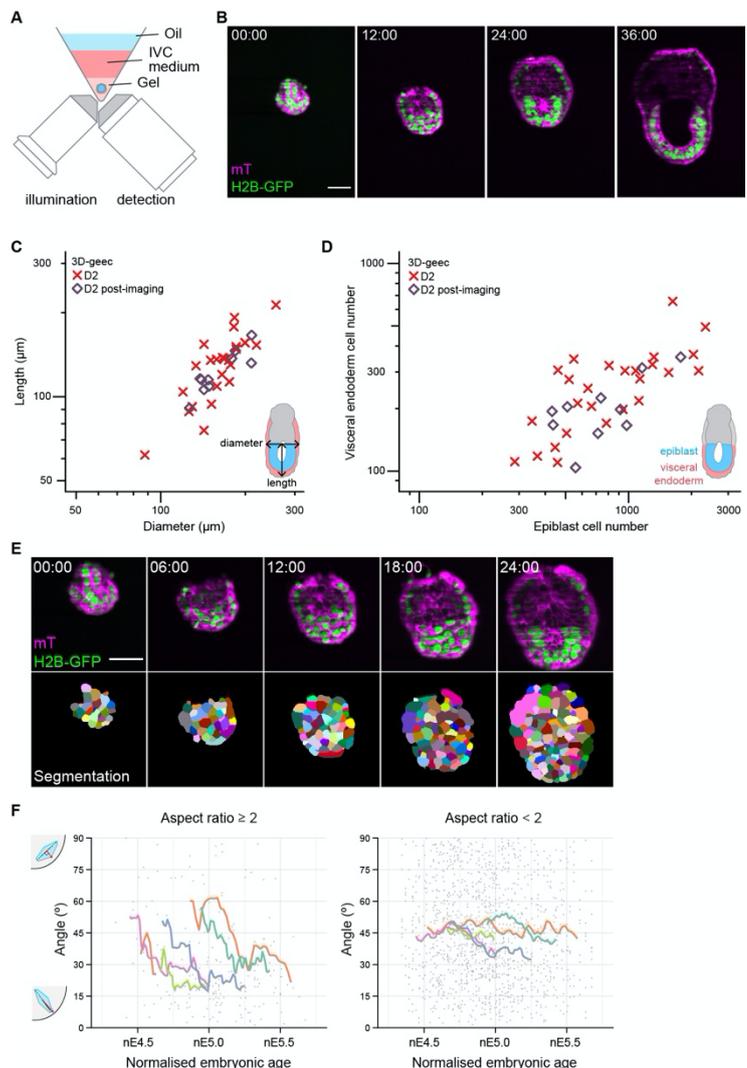


● 倒立型光シート顕微鏡を用いたライブイメージングは着床期の細胞動態を明らかにする

次に、着床期胚発生における細胞動態を観察するため、顕微鏡技術の開発を行った。D2 の 3D-geec 胚は直径 100 μm 以上、長さ 200 μm 以上の大きさに成長する上、ゲルの存在のために深部イメージングが可能な顕微鏡を必要とする。また、48 時間の連続観察のために光毒性と褪色を抑制する必要がある。そこで、受入研究室が EMBL で共同開発した倒立型光シート顕微鏡 (Strnad et al., 2016) を使用した。3D-geec 胚を焦点面に位置するように調整し、20 分ごとに照明したところ、胚発生を妨げることなく、**通常の 3D-geec 胚と同様に 48 時間かけて円筒状に発生する様子が観察できた** (図 3A-D)。

図 3. 倒立型光シート顕微鏡を用いた 3D-geec 胚のライブイメージング。

(A) 3D-geec 胚に適するよう改良した顕微鏡のデザイン。IVC 培地の蒸発を避けるためにミネラルオイルを重層する。(B) 細胞膜マーカー mT と核マーカー H2B-GFP を発現するマウス胚の生細胞観察。20 分ごとに撮影し、48 時間観察した。ここでは 36 時間目までの 12 時間ごとの画像を示す。(C, D) 通常の 3D-geec 胚とライブイメージングした胚のサイズ (C) と細胞数 (D) の比較。(E) 機械学習を用いた三次元細胞膜分割。細胞形状の解析を可能にする。(F) 細胞のアスペクト比 2.0 を閾値として、エピブラスト細胞の長軸と、組織の放射方向のなす角度を発生時間依存的にプロットしたもの。小さい角度は細胞が組織の放射方向に配向していることを示す。スケールバーは 50 μm 。



細胞動態の定量的な解析は組織形態形成やパターン形成の機構的な理解に必須である。これまで、細胞の核の位置に基づく細胞系譜追跡の報告はあるが (Ichikawa et al., 2013; McDole et al., 2018; Udan et al., 2014; Yue et al., 2020)、細胞の形状変化に関する定量的な解析手法は整備不足である。そこで、EMBL の Kreshuk グループと共同で、**機械学習を用いた細胞膜の自動分割アルゴリズム**を開発した (図 3E)。これを用いてライブイメージングデータを解析したところ、3D-geec 培養の最初の 30 時間あまりの間、エピブラスト細胞の体積は目立った変化を示さないが、アスペクト比 2.0 を超える伸長した細胞が増加した。さらに、こうした伸長している細胞は次第にエピブラスト組織の放射方向に沿って配向することがわかった (図 3F)。また、頂端膜マーカーである Ezrin-mCherry を発現する胚のライブイメージングから、頂端膜のクラスターは次第に放射状のエピブラスト中心部、ロゼット構造に集積し、将来の羊膜腔の元になることが明らかとなった。これらより、**エピブラスト細胞の形態変化と極性化がエピブラストの成熟と羊膜腔形成の鍵である**ことが示唆された。

● ExE の形成はエピブラストの形態形成とパターン形成を促進する

エピブラストの成長や形態形成における隣接する ExE の役割を明らかにするため、ExE 形成不全胚 (mTE を除去していない胚) と ExE 形成胚 (mTE を除去した胚) を比較して、エピブラストの発生を詳細に解析した。ExE 形成胚では、ExE 形成不全胚に比べてエピブラスト細胞数が有意に増加していた。そこで、細胞増殖に関与するシグナル経路について調べたところ、ExE 形成胚では近位-遠位方向で FGF-Dusp4 シグナル経路の活性に勾配が存在することがわかった。このことから **ExE はパラクライン効果を介してエピブラストの FGF シグナルを制御し、組織の成長とパターン形成に関与する**ことが示唆された。

次に ExE の物理的な役割を調べた。エピブラストは VE とはコラーゲンなどの基底膜を介して接しており、その基底側細胞膜上にはインテグリン依存的な細胞-細胞外マトリックス間接着を形成している。一方、ExE との境界にはこうした細胞外マトリックスは検出されず、代わりに前駆羊膜腔が形成される。前駆羊膜腔、またはその前駆体であるロゼット構造は ExE 形成胚では *in utero* 胚と同様の頻度で検出されるのに対し、ExE 形成不全胚ではこれらの形成が抑制されていた。そこで、ExE の物理的な意味づけを EMBL の Erzberger グループと共同で行った。内腔形成を新しい相での液滴の核形成過程であると捉えて、内腔の直径、表面張力および内圧を考慮した数理モデルを構築した。モデルから ExE が不均一な界面を提供することで、均一なエピブラスト内に生じる不安定な内腔構造を安定化させていることが予測できた。このことは沸騰中の水の中に生じる気泡が鍋肌から生じるという、日常的に観察される現象と同じ過程として理解できる。実際にライブイメージングによりこの内腔形成を観察したところ、確かにエピブラスト内部に生じた前駆羊膜腔が ExE との境界面で安定化し、拡大する様子が観察された。以上より、**ExE は物理的に羊膜腔の形成を促進し、エピブラストの形態形成に寄与している**ことが明らかとなった。

[結論と今後の展望]

本研究により、マウス着床期の胚発生を理解するための三次元培養法とライブイメージング手法を確立した。定量的な培養効率の評価系は再現性を保証し、従来の二次元上での培養に比べて高い成功率を示した。倒立型光シート顕微鏡により得られる画像データは、細胞膜分割のような自動画像解析に十分な時空間分解能を有している。特筆すべき点として、このイメージングシステムが一度に 10 個以上の多検体観察とレーザー切除のような光操作を可能にすることが挙げられる。本研究で得られた技術開発は、これまで細胞動態の解析が不可能であった哺乳類の着床期胚発生研究の大きな突破口となった。

本研究では、pTE にかかる張力の低下が ExE 形成に必要であるという予想外の発見を切り口に、大きく進展した。そしてエピブラスト形態形成やパターン形成における ExE の生化学的、物理的役割を明らかにし、ニッチからの制御の重要性を示した。一方で、母体内での発生には mTE を起源とする胎盤や子宮が存在し、これらの胚外組織も胚発生に重要な役割を担っていることが予想される。今後、mTE を残した状態で正常な胚発生を可能にする培養法や、実際の子宮内での発生を観察する方法などの開発が期待される。また、マウスと、ヒトを含む他の哺乳類では着床期の形態形成が大きく異なるため、これら個別の哺乳類についても革新的な培養法が必要である。

なお、本成果は原著論文としてまとめ、学術雑誌に投稿、現在査読の追加実験中である。