

「オーガンリソースとしての中胚葉細胞と器官形成クロックの研究」

(H12年度～H16年度、H14予算額：3.1億円(3.1億円))

研究代表者(研究総括責任者)：武田洋幸(国立遺伝学研究所)

融合研究機関：国立遺伝学研究所、国立医薬品食品衛生研究所

研究の概要・目標

1. 何を目指している

中胚葉器官の形成・再生のリソースとなる中胚葉幹細胞の分化・維持のメカニズムと生体内での繰り返し構造を創り出す分子時計(器官形成クロック)の分子実体を解明する。

3年後の目標

- ・幹細胞システム、器官形成クロック、ヒレ再生に關与する遺伝子群の網羅的単離
- ・メダカ突然変異体のスクリーニングと解析の開始
- ・マウス相同遺伝子の単離と機能解析の開始

5年後の目標

- ・幹細胞システム、器官形成クロック、ヒレ再生の分子実体の解明
- ・中胚葉器官の形態形成、再生の人为的制御の基盤技術の確立

2. 何を研究している

- ・中胚葉尾芽幹細胞と再生組織幹細胞の分化誘導のメカニズム
- ・器官形成クロックの成立・維持のメカニズム
- ・組織コンパートメント化(分節化)のメカニズム

3. 何が新しいか

- ・胚の全ての組織を作り出す尾芽領域の幹細胞システムに注目した点。
- ・再生研究に器官形成クロックという概念を導入して形態形成を伴う再生を目指した点。
- ・器官再生能を有する魚類を使った発生遺伝学解析(*forward genetics*)と哺乳類の遺伝子破壊技術(*reverse genetics*)を有機的に組み合わせた点。

諸外国の現状

1. 現状

中胚葉組織の器官形成メカニズムの解明において、主に中胚葉誘導因子と体節中胚葉の分化因子を中心とした解析が世界的に進歩している。しかしながら、初期中胚葉から体節中胚葉への方向付けや器官コンパートメント形成の過程である分節化についての解析は端緒についたばかりである。また、分節化の分子メカニズムの根幹である器官形成クロックを器官再生に応用していくための基礎的研究も全くおこなわれていない。さらに現状では、器官形成に關与する重要な遺伝子をすべて把握しているとは言い難く、重要遺伝子の単離がこの分野の緊急の課題になっている。この状況を克服するために、新たな突然変異体の単離や遺伝子の *in situ* スクリーニングがマウスに比べて遙かに容易な小型魚類と強力な遺伝子解析手段を持つマウスの実験系を融合しようとする機運が生じている。米国のベンチャー企業はこの戦略で動き始めている。

2. 我が国の水準

この研究の基盤となる発生学の水準は近年の幹細胞技術の開発に伴い飛躍的に進歩しており、特にこの研究課題の基盤をなす中胚葉誘導とその分化や体節の分節化をコントロールする分子メカニズムについては、哺乳類、鳥類、魚類を用いて世界をリードする研究成果をあげている。中胚葉組織を用いたヒレ再生に関する分子遺伝学的研究、また器官形成クロック関連遺伝子の研究も世界をリードしているといつてよい。このように個々の研究では、各動物種の特徴を活かした世界的な成果を挙げているが、それらを融合してさらに研究を発展させる必要がある。

研究進展・成果がもたらす利点

1. 世界の水準との関係

2つの動物実験系の融合研究で、中胚葉器官の発生と中胚葉幹細胞の分化・増殖機構の理解が急速に進み、国内の器官形成研究が米国の企業と肩を並べるまでに発展することが期待される。

世界的には、ある細胞の分化を誘導することは比較的容易になると考えられるが、我々が試みようとしている、時間の概念を導入し、特定の位置情報をもたせた、より正常の形態形成を伴った再生技術は、世界に先駆けた一步進んだ再生研究として注目に値するものになると自負している。

2. 波及効果

本研究により、これまで未知の部分が多くかった中胚葉発生と分化再生に係わる多くの分子メカニズムが明らかにされる。

本研究により作成された突然変異メダカや遺伝子欠損マウスは、再生治療や遺伝子治療の研究のためのよいモデル動物となると考えられる。

また、単離され解析された遺伝子の多くは、再生治療に用いる遺伝子の選定や安全性と効果の判定に重要な役割を果たすと考えられる。

1. 研究概要

(1) 目的、意義、必要性

中胚葉器官の形成・再生のリソースとなる中胚葉幹細胞の分化・維持のメカニズムと生体内で器官に繰り返し構造を与える分子時計(器官形成クロック)の実体を解明する。発生遺伝学的解析に適した小型魚類メダカと強力な遺伝子解析手段を持つマウスを用いて研究を行っている2つの研究機関の融合により、最も効率の良い研究体制を形成した。特定の器官における発現遺伝子の網羅的単離とその機能解析を強力に推進する。ポストゲノムを先取りした今回の研究は、今後の再生技術基盤の確立に寄与すると考える。

(2) 研究概要

中胚葉性器官のリソースとして、幹細胞システムが機能している初期胚の尾芽組織およびその尾芽より供給された細胞群が繰り返し構造を獲得する体節形成に注目した。尾芽組織・体節形成領域で発現する遺伝子、突然変異体の網羅的単離をメダカを用いて行うとともに、メダカで得られた重要遺伝子の機能をマウスを用いた遺伝子破壊により解析する。これにより、幹細胞システムの維持や器官形成クロックの分子実体を明らかにする。また、魚類の強力な再生能力に注目した研究も実施する。本研究により中胚葉性幹細胞の増殖・分化・再生の基盤技術を確立する。

(3) 研究統括責任者

武田洋幸

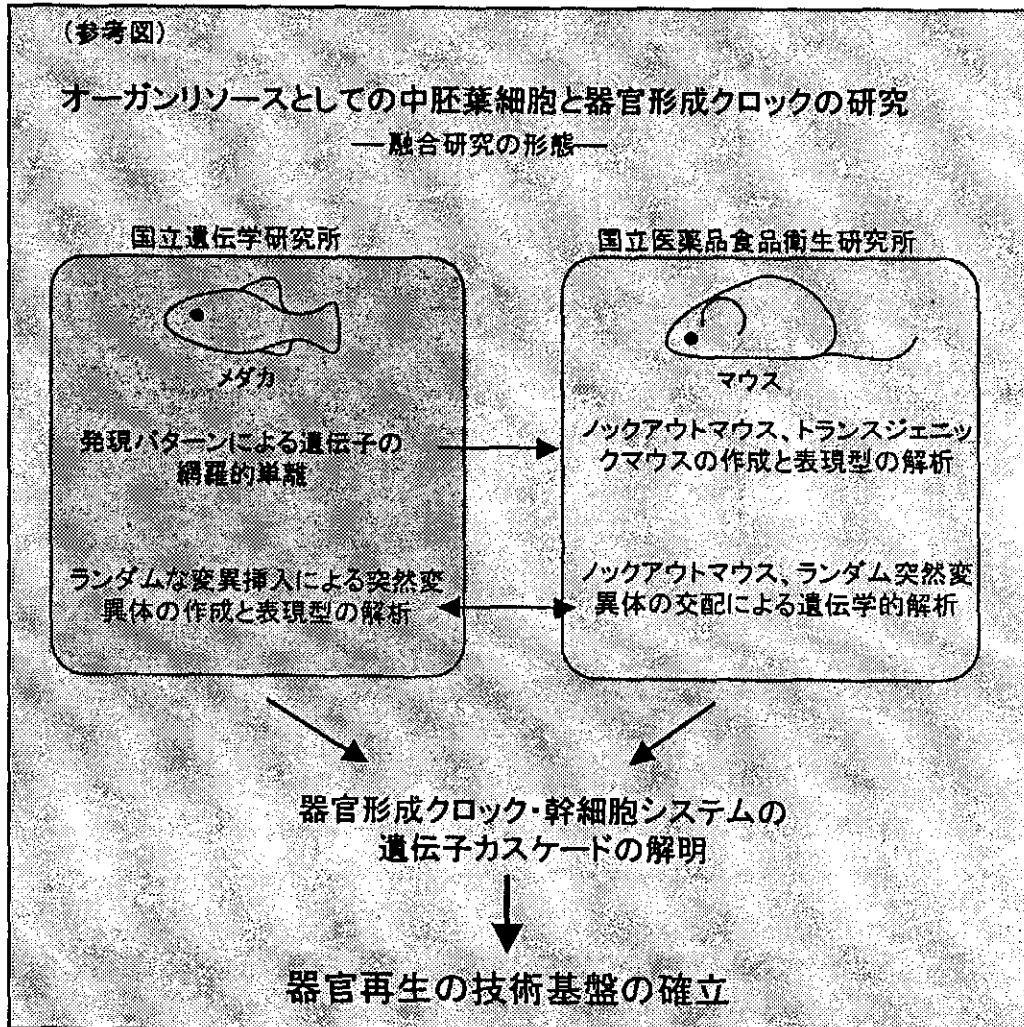
(国立遺伝学研究所・教授:現東大教授)

(4) 融合研究機関

文部科学省 国立遺伝学研究所

厚生労働省 医薬品食品衛生研究所

(5) 研究期間 平成12年度～平成16年度



(6) 融合研究の形態及びメリットについて

	国立遺伝学研究所	国立医薬品食品衛生研究所	融合の形態
サブテーマ1 中胚葉系幹細胞の成立と自己組織化	<p><u>研究内容</u> 魚類の中胚葉誘導、尾芽幹細胞の自己組織化、自己複製、ヒレ再生過程に関与する遺伝子と突然変異体の網羅的単離及びそのマウス相同遺伝子の単離。 マウスで得られた遺伝子の発現を指標としたメダカ突然変異体のスクリーニングとその表現型の解析。</p> <p><u>融合のメリット</u> 魚類の中胚葉・尾芽形成に関与する遺伝子をマウスで解析することにより、より普遍的な機能を知ることができる。 マウスで得られた知見を基に新たな変異体スクリーニングの系を確立できる。</p>	<p><u>研究内容</u> 魚類で得られた遺伝子の機能をノックアウトマウスを作製して解析する。その表現型の解析により遺伝子カスケードを解明する。</p> <p><u>融合のメリット</u> 魚類のスクリーニングの系で新規重要遺伝子のマウス相同遺伝子が容易に単離でき、マウスで機能解析ができる。</p>	国立遺伝研の研究者が国立衛研のチームへ合流し、魚類の幹細胞システムに寄与する遺伝子のマウス相同遺伝子を単離する。国立衛研で遺伝子欠損マウスを作成してマウスにおける機能を明らかにする。国立衛研の研究者が国立遺伝研に出張して、マウスで得られた知見を基に新たなメダカ変異体スクリーニングの系を確立する。 交流 (5) 遺伝研(8)→衛研 遺伝研 ← 卫研(10) 交流 (5)
サブテーマ2 器官形成クロックの分子メカニズム	<p><u>研究内容</u> 器官形成クロックに異常を示すメダカ突然変異体及び新たなクロック関連遺伝子を単離しそのマウス相同遺伝子を単離する。 マウスで得られたクロック関連遺伝子の機能を魚類を使って詳細に解析する。</p> <p><u>融合のメリット</u> マウスと比較することによりクロック関連遺伝子の尾芽形成・ヒレ再生における普遍的機能を知ることができる。</p>	<p><u>研究内容</u> ノックアウトマウスの作成、解析を通して尾芽中胚葉に存在する器官形成クロックの分子実体を明らかにし、それに基づく組織コンパートメント決定の機序をマウス、メダカそれぞれの変異体を用いて解明する。</p> <p><u>融合のメリット</u> 魚類の変異体や遺伝子の解析からクロック関連遺伝子の機能をより詳細に知ることができる。 魚類のヒレ再生の分子メカニズムを、マウスへ応用するための基盤ができる。</p>	国立衛研の研究者が国立遺伝研のチームへ合流し、クロック関連遺伝子の魚類相同遺伝子や魚類変異体の単離・解析に共同で当たる。魚類で得られた器官形成クロックの知見をマウスの系に応用するために、国立遺伝研の研究者が国立衛研へ出張して共同で実験を行う。 交流 (5) 遺伝研 ← 卫研(10) 交流 (5) 遺伝研(8)→衛研

2. 所用経費一覧表

(1) 研究費の配分一覧 (サブテーマ毎)

研究総括責任者：武田洋幸（国立遺伝学研究所、現在は東京大学）

(単位：千円)

サブテーマ名	サブテーマ リーダー	12 年度 予 算	13 年度 予 算	14 年度 予 算
1. 中胚葉性幹細胞の成立と自己組織化のメカニズム	武田洋幸	153,500	166,300	134,668
2. 器官形成クロックの分子メカニズム	相賀裕美子 井上 達	153,495	143,716	175,400
合 計 額		306,995	310,016	310,068

(2) 年度毎予算額推移 (機関毎)

(単位：千円)

年度 機関	12 年度予算	13 年度予算	14 年度予算	合 計
国立衛研	136,453	108,175	107,455	352,083
国立遺伝研	170,542	201,841	202,613	574,996
合 計	306,995	310,016	310,068	927,079

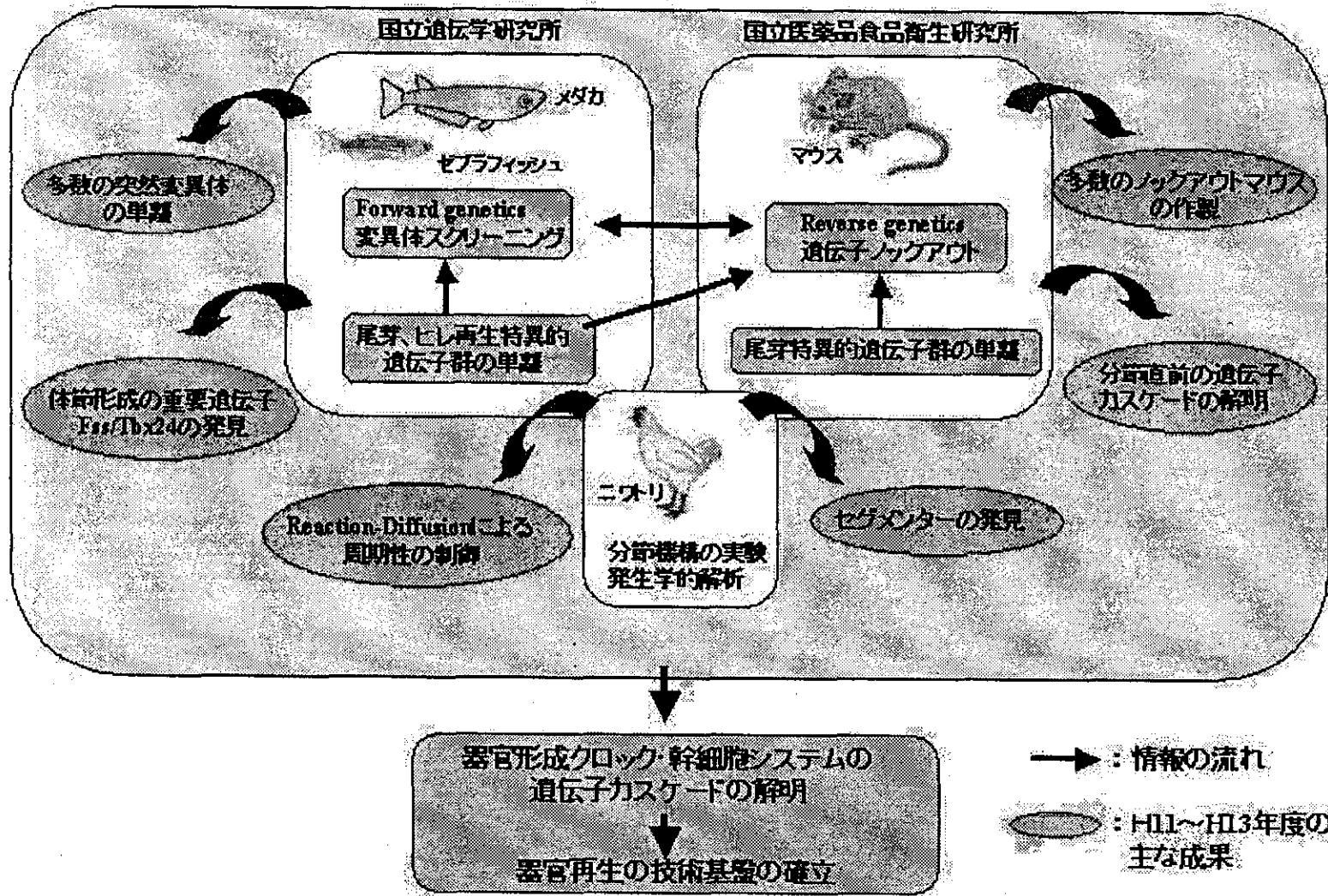
3. 研究成果の概要

本研究プロジェクトでは、マウスと小型魚類のそれぞれを用いて研究を展開している国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研、マウス）と国立遺伝研（遺伝研、小型魚類）の2つの機関を融合して、それぞれの実験系の利点を活かして中胚葉性器官の発生・再生原理解明に向けた研究を進めている。また、これら2つの機関に、他機関の一線級の研究者を招聘して様々な視点から研究を行なう開放的なシステムもある。つまり、本研究プロジェクトは、研究対象を同じくする（中胚葉性器官の発生・再生原理）国内の研究者を一同に集めたものといえる。そして研究成果の瞬時の共有と迅速な共同実験の推進がこの研究プロジェクトの原動力となって多くの成果をあげてきた。実際、マウスと小型魚類の体節形成に関する研究成果の一部は、2000年Nature reviews genetics誌に相賀（サブリーダー）、武田（統括責任者）が共著で総説として発表している。

サブテーマごとの研究成果は様式2で述べるので、ここではプロジェクトを通して得られた特筆すべき成果を記す。

- (1) 多数のメダカ突然変異体の単離(武田, 石川, 工藤, 荒木) : H12年度に、遺伝研に水槽2,000個の小型魚類飼育施設（約100m²）が完成した。この施設内で、ゲノム構成がゼブラフィッシュに比べて単純なメダカを用いた突然変異体のスクリーニングが行なわれている。本研究プロジェクトでは、特定の器官に異常を示す変異体が既に50系統以上単離されている。この中で、中胚葉性器官に異常を示すものは約20系統で、尾芽伸長異常、体節の小型化、分節面の乱れ、ヒレ形成異常、血管形成異常、心臓形成異常、骨の欠損、血球欠損、などがある。これらの変異体は、本研究プロジェクトだけにとどまらず、中胚葉性器官の発生原理を探る上で、国内で開発された貴重な実験資源となっている。現在、重要な変異体に関して原因遺伝子の同定に向けてマッピング、染色体歩行が行なわれている。
- (2) 分節直前の未分節中胚葉における遺伝子ネットワークの解明(相賀、井上、古関) : 体節形成直前に一過的に発現する転写因子Mesp2とNotchシグナル系との遺伝学的解析(マウス)により、体節がその分節性を獲得する分子機構を明らかにした。この成果は、2000年Nature Genetics誌で発表され、またnews & viewにもとりあげられ、世界的な注目を集めた。
- (3) 体節中胚葉の成熟に必須な転写因子の発見(武田、荒木) : メダカ変異体の単離と平行して、ゼブラフィッシュの体節形成変異体を用いた研究も行なった。表現型が重篤なゼebraフィッシュ突然変異体、*fused somites*の原因遺伝子の同定を試み、新規のT-box型転写因子、Tbx24が原因遺伝子であることを明らかにした。この成果は、2002年Nature Genetics誌で発表され、新聞誌上でも取り上げられた。
- (4) 組織を切断するセグメンターの発見(高橋) : 移植や組織培養が容易なニワトリの実験系を駆使して、周囲の中胚葉細胞に対して分節を誘導する細胞集団（セグメンター）の存在を明らかにした。このセグメンターの活性はNotchシグナルにより調節されていた。この成果は、Development誌で発表され、新聞誌上でも取り上げられた。
- (5) 器官形成クロックの理論的裏付け(近藤) : 胚操作が容易なニワトリとゼebraフィッシュを用いて、分節周期を制御する器官形成クロックがTuringのreaction-diffusion方程式に従っていることを示す決定的な実験結果を得た（現在、投稿中）。
- (6) 尾芽、再生ヒレにおける新規遺伝子群の単離(工藤) : 小型魚類からの中胚葉系組織に発現する遺伝子群の単離、ヒレ再生に伴って発現量が変化する遺伝子群、マウス尾芽領域に発現する遺伝子群の単離をin situ screening法やマイクロアレイ法により精力的にすすめた。その結果、体節、尾芽、ヒレ再生の各段階などで特異的に発現する遺伝子を多数個単離することに成功した。これらの遺伝子の機能はノックアウト法などにより解析する。

研究成果の概要 <課題全体>



4. 研究成果公表等の状況

課題名（研究総括責任者（研究機関名））：オーガンリソースとしての中胚葉細胞と器官形成クロックの研究（武田洋幸（国立遺伝学研究所、現在の所属：東京大学）

【研究発表等】

	原著論文による発 表	左記以外の誌上発 表	口頭発表	合 計
国内	0 件	28 件	138 件	166 件
国外	71 件	6 件	35 件	112 件
合計	71 件	34 件	173 件	278 件

【特許出願等】 1 件（国内 1 件）

【主要論文への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテーマ 1	サブテーマ 2	合計
Nature genetics	30.91	2	1	3
Nature medicine	27.90	0	1	1
Nature Biotechnology	11.54	1	0	1
Proc. Natl. Acad. Sci. USA	10.789	1	1	2
Development	9.535	3	7	10
J. Biol. Chem.	7.368	2	0	2
Am. J. Pathol.	6.971	1	0	1
J. Immunol.	6.834	3	2	5
J. Bone Miner. Res.	5.877	6	0	6
Developmental Biology	5.54	1	4	5
Genes Cells	4.885	0	1	1
Mechanisms of Development	4.154	3	4	7
Bone	3.998	1	0	1
BBRC	3.055	1	1	2
Stem cells	2.989	1	0	1
主要雑誌小計		26	22	48
発表論文合計		38	33	71

【主な原著論文による発表の内訳】 （アンダーラインは研究担当者）

国外 [発表題名、発表者名、発表誌名等（雑誌名、巻、号、頁、年等）]
(計 71 件)

1. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. Takeshita, S., Kaji, K. and Kudo, A. J. Bone Miner. Res. 15, 1477-1488, 2000

2. Transgenic zebrafish for the detection of mutations caused by compounds in aquatic environments. Amanuma, K., Takeda, H., Amanuma, H. and Aoki, Y. *Nature Biotechnology* 18: 62-65, 2000
3. TNF- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S. and Kudo, A. *J. Biol. Chem.* 275, 4858-4864, 2000
4. Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y.-J., Kawakami, A., Kuroiwa, A., and Takeda, H. *Development*. 128: 4873-4880, 2001
5. Targeted disruption of cadherin-11 leads to a reduction in bone density in calvaria and long bone metaphyses. Kawaguchi, J., Azuma, Y., Hoshi, K., Takeshita, S., Ohta, T., Ozawa, H., Takeichi, M., Chisaka, O. and Kudo, A. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1265-1271, 2001
6. The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells; consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage. Kawaguchi, J., Azuma, Y., Hoshi, K., Takeshita, S., Ohta, T., Ozawa, H., Takeichi, M., Chisaka, O and Kudo, A. *J. Immunol.* 168, 629-634, 2001
7. Expression of zebrafish btg-b, an anti-proliferative cofactor, during early embryogenesis. Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H. *Mechanisms of Development* 104: 113-115, 2001
8. Tbx24, a novel T-box gene, is mutated in the zebrafish somite segmentation mutant fused somites. Nikaido, M., Kawakami, A., Sawada, A., Furutani-Seiki, M., Takeda, H*. and Araki, K*. (*, HT and KA are corresponding authors). *Nature Genetics* 31: 195-199, 2002.
9. Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi A., Kitajima S., Inoue, T., Koseki, H., Saga, Y. *Nature Genetics* 25: 390-396, 2000
10. Zebrafish Mesp family genes, mesp-a and mesp-b are segmentally expressed in the presomitic mesoderm, and Mesp-b confers the anterior identity to the developing somites. Sawada, A., Fritz, A., Jiang, Y., Yamamoto, A., Yamasu, K., Kuroiwa, A., Saga, Y., Takeda, H. *Development* 127: 1691-1702, 2000
11. Mice doubly deficient for the Polycomb-Group genes Mel18 and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H. *Development* 128: 1587-1597, 2001
12. The role of Presenilin1 during somite segmentation. Koizumi, K., Nakajima, M., Yuasa, S., Saga, Y., Sakai, T., Kuriyama, T., Shirasawa, T. and Koseki, H. *Development*. 128: 1391-1402, 2001
13. Inductive signals from the somatopleure mediated by bone morphogenetic proteins are essential for the formation of the sternal component of avian ribs. Sudo, H., Tonegawa, A., Arase, Y., Aoyama, H., Mizutani-Koseki, Y., Moriya, H., Wilting, J., Christ, B., and Koseki, H. *Dev. Biol.* 232: 284-300, 2001
14. Hypomorphic Mesp allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H. and Saga, Y. *Development* 129: 2473-2481, 2002
15. Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by Lunatic Fringe and Notch during somitic segmentation. Sato, Y., Yasuda, K., and Takahashi, Y. *Development* 129: 3633-3644, 2002
16. Directionality of stripes formed by anisotropic reaction-diffusion model. Sjoji, H., Iwasa

Y., Mochizuki, A. and Kondo, S. Journal of Theoretical biology 214: 549-561, 2002

【シンポジウムなどの開催状況】

年次	開催テーマ名	概 要	開催日数	参加人数の累計	
				内	外 国
平 13	分節会議	体節形成の分子機構	3 日	1 0 0	3 0