

脊椎動物の未分化細胞を用いての臓器形成 およびそれらの移植と遺伝子発現

伊藤 弓弦*, 浅島 誠***

はじめに

近年、再生医療の実用化に向けて、哺乳類の胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いての研究を中心に、*in vitro* での組織・臓器形成研究は飛躍的に進みつつある。しかしながらこれまでの基礎研究をヒトの ES 細胞や組織幹細胞を用いた臨床応用へと発展させるためには、より確実な臓器形成システムを確立せねばならない。倫理的問題を解決する上でも、このことは最重要な課題である。そのためには各種臓器の誘導系をさらに詳しく解析し、臓器形成における分子メカニズムを明らかにする、いわば正確な設計図作りが必要である。我々はこれまで、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) (以下ツメガエル) の未分化細胞群を用いて、他の脊椎動物胚に先駆けて様々な臓器を三次元レベルで構築し、またいくつかの臓器に関しては移植をすることにも成功してきた。そこで本稿ではツメガエル胚の未分化細胞を用いた臓器形成システムと、形成した臓器の移植に関して解説する。またそのシステムを用いて現在進めている、臓器特異的な遺伝子発現の網羅的な解析に関しても言及したい。

アフリカツメガエルへモデル生物としての特徴へ

ツメガエル胚は、①体外で発生するため初期発生を観察しやすい、②胚の直径が約 1mm あることから外科的な操作を加えやすい、③卵の色素分布の違いにより各臓器の予定運命を卵割期の時点で

予測できる、という実験手法上の利点がある上に、④臓器形成に関与する遺伝子群が哺乳類と共通の部分が多く (図1)、脊椎動物の形づくりの仕組みを理解する上で優れたモデル生物の一つである。過去にも、ツメガエル胚を用いて脊椎動物で最初のクローン個体を作り出されるなど¹⁾、ツメガエルは発生学における重要課題のブレイクスルーに関わってきた。またマイクロインジェクション法による DNA, mRNA 等の卵内への注入が簡便であることから、様々な生理活性物質のアッセイ系、スクリーニング系としても古くから用いられてきた。例えば近年、ES 細胞から心筋細胞への効率的な誘導に関与すると報告された *Noggin*²⁾ は、かつてツメガエルを用いたスクリーニング系により単離され³⁾、BMP に対する阻害能を解析された⁴⁾。

ツメガエルの受精卵は、受精後約 8 時間で約 4000 の細胞からできた胚嚢となる。その動物半球にはアニマルキャップとよばれる 2, 3 層の細胞からなる未分化な領域が存在する (図2A)。アニマルキャップは胚から切り取って培養すると、不規則な表皮細胞の塊 (不整形表皮) となる (図2B)。ところが、多分化能をもつため種々の誘導因子の存在下で培養されると、中胚葉組織にも内胚葉組織にも分化することができる (図2C)。一見して哺乳類の胚盤胞にある内部細胞塊に性質が似ているこのアニマルキャップを、我々は種々の臓器を誘導する際に用いている。

ツメガエルアニマルキャップを用いた *in vitro* での臓器形成

我々の研究室では、アクチビン⁵⁾ やレチノイン酸等を様々な濃度でアニマルキャップに作用させることにより、試験管内で心臓や腎臓、膵臓など十

*科学技術振興機構・ICORP・器官再生プロジェクト

**東京大学大学院・総合文化研究科・広域科学専攻・生命環境科学系

***産業技術総合研究所・器官発生工学研究ラボ

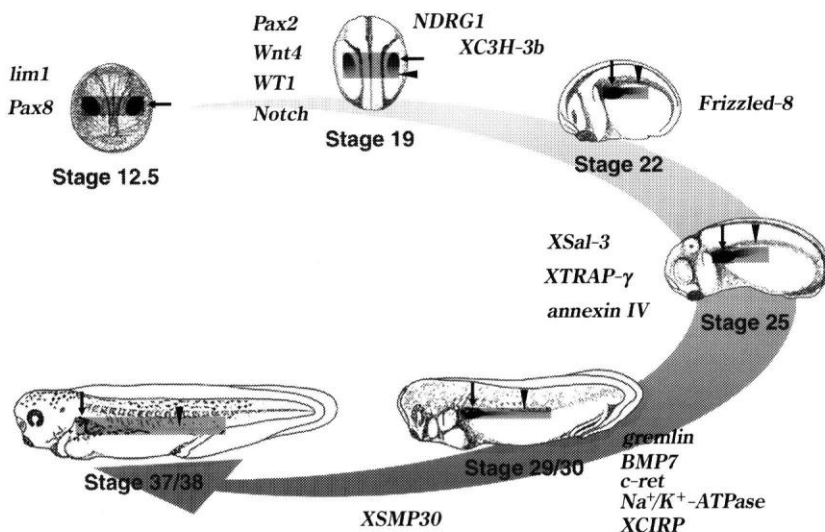


図1 ツメガエルとマウスに共通な腎臓形成に関与する遺伝子群

ツメガエルとマウスの腎臓形成機構は似ており、多くの共通の遺伝子を用いる。ツメガエルの前腎は、胚の左右両側にみられ、耳のすぐ後ろにある糸球体と前腎細管(矢印)から前腎輸管(矢印)が総排出腔へと伸びた形状をしている。

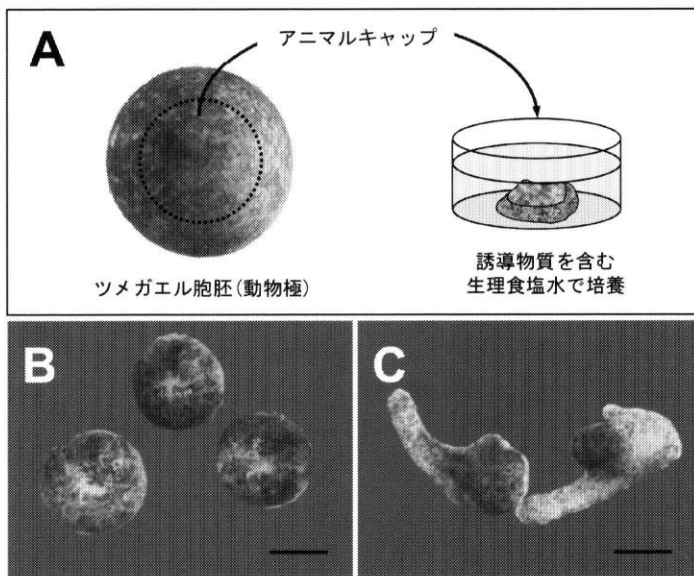


図2 アニマルキャップアッセイ

(A) アニマルキャップアッセイのスキーム。点線の内側(アニマルキャップ)を切り出し、生理食塩水中で培養する。(B) アニマルキャップを生理食塩水の中で1日培養すると球状の形態をとる。培養し続けると不整形な表皮に分化する。(C) アニマルキャップを10ng/mlのアクチビン溶液中で1日培養したもの。中胚葉誘導の結果、細胞の運動性が高まって伸長運動が観察される。このように生理食塩水に溶かした液性因子の生理活性を検定することができる。図中のスケールバーは0.2mm。

数種の組織や臓器を誘導することに成功してきた⁶⁾。これらの器官は形態的に正常な器官と同等であるだけでなく、生体に移植した場合に実際に機能することも確認している。本章ではそれらの中から

心臓、血管そして腎臓を特異的に誘導する実験について解説する。

A. 心臓形成とその移植

心臓は脊椎動物胚において最初に機能する臓器

の一つである。マウスだと胎齢8日で、ヒトだと妊娠3週で拍動を開始する。ツメガエルは受精後3日目には拍動が観察される。他の脊椎動物と同様、ツメガエルの心臓原基は原腸胚の原口の両側に誘導される⁷⁾。その後、原基は胚の内部を前方へ移動したあと、神経胚の時期に腹方に降りてきて融合し、一つの心臓をつくる。つまり、心臓形成時には組織間の誘導作用だけでなく細胞の移動を伴うため、複雑な心臓形成を *in vitro* で再現することはこれまで困難とされてきた。実際、アニマルキャップから筋肉や脊索などの中胚葉組織を誘導できるアクチビンの濃度や処理の時間を変えてみても、心臓は誘導されなかった。

ところがアニマルキャップの細胞を一時的に解離してからアクチビンで処理すると、心臓を誘導できることが明らかになった⁸⁾。アニマルキャップをカルシウムが含まれない培養液の中に入れると、細胞どうしの接着が弱くなる。次にこの培養液を100ng/mlのアクチビン溶液と取り替えて、軽く攪拌して個々の細胞にまで解離する。このアクチビン溶液にはカルシウムを加えているため、しばらくすると細胞が集まって細胞塊(再集合体)をつくる(図3A)。こうして得られた再集合体を培養すると、3日後にはほぼ100%の確率で拍動が観察された(図3B)。拍動を開始する時期は、正常な胚の心臓が拍動し始める時期とほぼ一致していた。また再集合体が心臓に分化する際には、種々の心臓分化マーカー遺伝子が正常な心臓と同じ時期に発現していた。両生類は変温動物なので、心臓の拍動も周囲の温度に左右される。試験管の中で作り出した心臓も同様に、心拍数が培養液の温度に依存して変化する様子が認められた。

以上のように、アニマルキャップから心臓を誘導できることがわかったが、実際に血液を循環させる能力をもつことが証明されてはじめて「臓器としての」心臓が誘導できたといえる。そこで我々は、心臓へと分化誘導した再集合体を神経胚に異所的に移植した(図3A)。移植を受けた胚は正常に発生を続けて(図3C)カエルへと変態した(図3D)。移植してから1年以上経った後解剖してみると、このカエルの下腹部には規則正しく拍動する第二の心臓が見られ、宿主の血管系と連絡して血液を循環させている様子が観察された(図3E)。また第二の

心臓には正常な心臓には劣るものの心房と心室の区別も認められた(図3F)。

B. 血管形成

他の脊椎動物と同様に、ツメガエルの血球細胞と血管内皮細胞は共通の前駆細胞群(血島)に由来すると考えられている。血島の中で外側の細胞は血管内皮細胞に分化し管腔形成した後、互いに融合し原始血管叢を形成する。こうして生みだされた原始血管叢はその後、周囲からの刺激に反応して融合、発芽、嵌入を繰り返し原始血管が再構築される。この過程を血管新生と呼んでいる。形成された原始血管は当初内皮細胞のみで構成されるがやがて壁細胞によって囲まれ、成熟血管となる。近年、分子生物学の進歩によって血管形成の分子機構がわかり始めてきており、脈管形成にはbFGF、血管内皮増殖因子(VEGF)、Angiopoietin-1等の、血管新生にはAngiopoietin-2等の関与が報告されている⁹⁾。

アフリカツメガエルのアニマルキャップを0.1~0.5ng/mlのアクチビン溶液で処理しても、由来を同じくする血球細胞は分化してくるが、血管内皮細胞は殆ど分化してこない¹⁰⁾。ところが前項で述べた心臓誘導の系と同様に、後期胚のアニマルキャップを一時的に解離した上で0.4ng/mlアクチビンと100ng/ml Angiopoietin-2とで共処理し、再集合体を形成して培養すると、*X-msr*など血管内皮分化の指標となる遺伝子の発現が上昇し、血管内皮細胞が高頻度に誘導されることが明らかになった(図4)¹¹⁾。現在、このアニマルキャップからつくられた血管内皮細胞が生体内で機能することを移植実験により確認しつつある。

C. 腎臓形成とその移植

脊椎動物の腎臓は構造の複雑さや機能する時期の違いから、前腎、中腎、後腎の3種類に分けることができる。ツメガエルは、オタマジャクシの間は前腎が排出器官として働き、変態してカエルになるとその機能は新たに形成される中腎へと引き継がれる。哺乳類では後腎がいわゆる「腎臓」として機能する。後腎は前腎と較べるとはるかに複雑な構造と機能をもっているが、構成単位であるネフロン構造は前腎とほぼ同じである。したがって前腎を未分化細胞から誘導することは、中腎から後腎へとつながる腎発生の仕組みを理解する

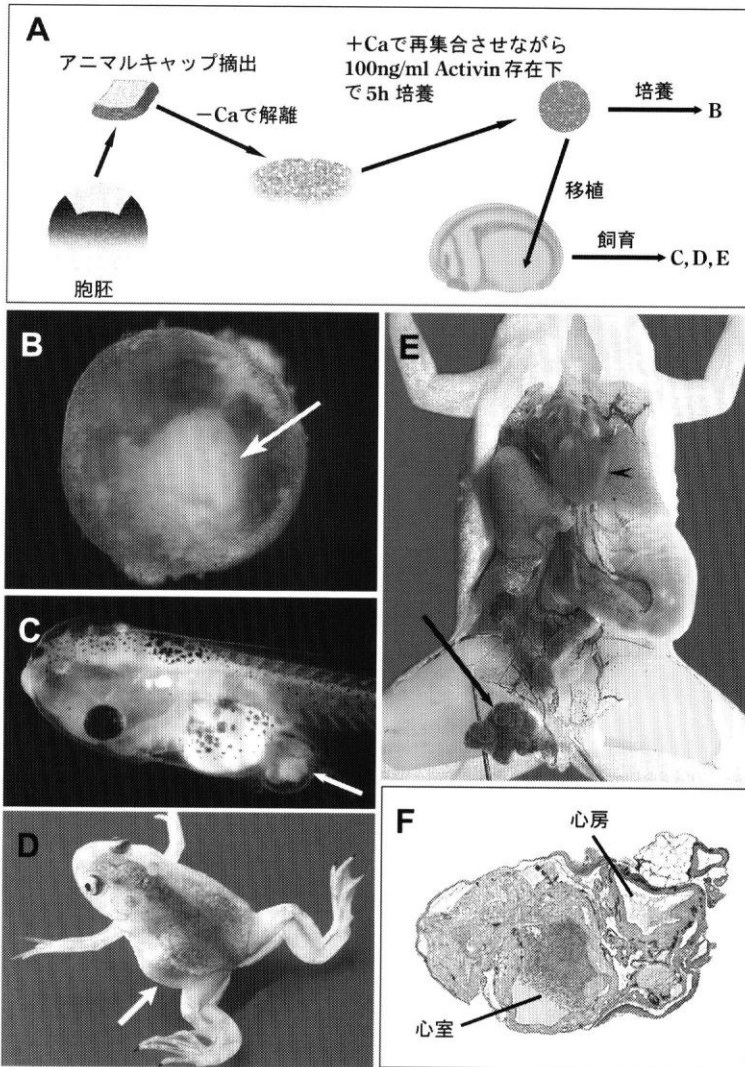


図3 アニマルキャップから誘導した心臓⁸⁾

- (A) *in vitro* での心臓誘導および生体への移植のスキーム。
- (B) アニマルキャップを解離・再集合するとともに 100ng/ml のアクチビンで処理して得られた心臓様構造。内部の細胞塊(矢印)が拍動した。
- (C) 異所的移植後、初期幼生にまで育った胚。矢印の部分に第2の心臓が形成された。
- (D) Cの幼生が変態した直後のカエル。変態した後も第2の心臓(矢印)は拍動を続けた。
- (E) Dのカエルを1年以上飼育した後に解剖した様子。第2の心臓(矢印)は宿主のカエルの血管系と連絡していた。矢じりは宿主の心臓を示す。
- (F) Eのカエルに生着した第2の心臓の組織切片像。心筋層の厚さが異なる心房と心室が観察された。

うえで非常に有効な手段となる。

ツメガエルのアニマルキャップを 10ng/ml のアクチビンで処理すると、ほぼ 100%の確率で筋肉が誘導される。前腎も筋肉と同じ中胚葉性の器官であるが、どのような濃度のアクチビンで処理しても分化することはほとんどない。ところが、10ng/ml のアクチビンとともに 100 μ M のレチノイ

ン酸で処理した場合には、すべてのアニマルキャップが糸球体、前腎細管、前腎輸管からなる前腎を形成した(図5A~C)¹²⁾。これはアクチビンによって中胚葉化されたアニマルキャップに対してさらにレチノイン酸が作用したため、分化の方向性が筋肉から前腎へとそらされたと解釈できる。これらのアニマルキャップが前腎の形成過程を忠実

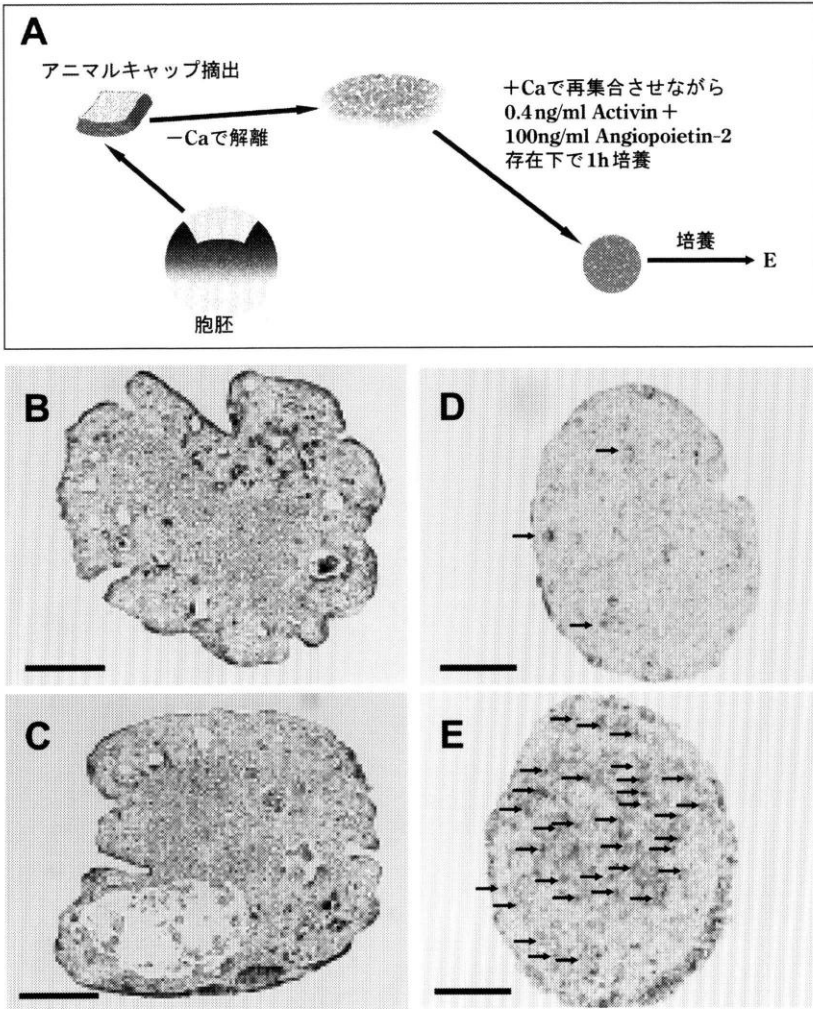


図4 アニマルキャップより誘導した血管¹¹⁾

(A) *in vitro* で血管を誘導するスキーム.

(B~E) アフリカツメガエルのアニマルキャップを解離し、種々の処理をした後形成した再集合体の組織切片像. 血管内皮細胞分化マーカー *X-msr* の発現を検出した(矢印). 無処理(B), 100ng/ml angiopoietin-2 単独処理(C), 0.4ng/ml アクチビン単独処理(D), 100ng/ml angiopoietin-2+0.4ng/ml アクチビン共処理(E). 図中のスケールバーは0.1mm.

に再現していることは、前腎分化の指標となる *Xlim-1* や *Xlcaax-1* などの遺伝子が正常発生と同じタイミングで発現することからも明らかである.

この試験管内で分化させた前腎が実際に排出器官として機能することは、初期胚に移植して確かめることができる¹³⁾(図5A). 神経胚で左右の前腎原基を除去してしまうと、しばらくの間は発生を続けるが、やがて体腔の中に水分が充満して10日前後で死亡した(図5D). ところが前腎原基を切除した部分に上述のアクチビンとレチノイン酸で処

理したアニマルキャップを移植した場合には、移植胚は体が膨らむことなく正常に発生を続けた(図5E). これは移植されたアニマルキャップが前腎に分化し、水分を正常に排出したためと考えられる. これまで移植胚の中には1ヵ月ほど生存するものも見られたが、カエルにまで成長した個体は得られていない. 変態の時期に前腎から中腎へと機能が引き継がれなかったことが原因の1つと考えられる.

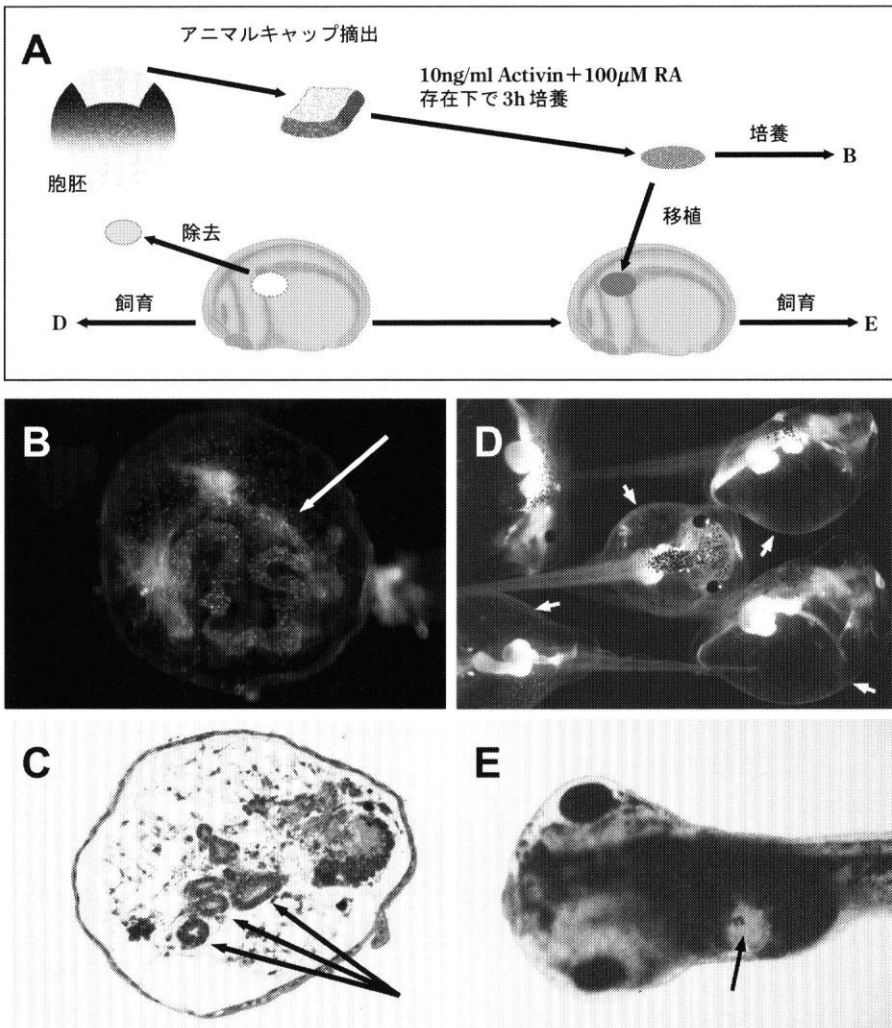


図5 アニマルキャップより誘導した腎臓¹³⁾

- (A) *in vitro*での腎臓誘導および生体への移植のスキーム。初期尾芽胚から左右の前腎原基を除去し、アクチビンとレチノイン酸で処理したアニマルキャップを代わりに移植する。
- (B) 10ng/mlのアクチビンと100µMのレチノイン酸でアニマルキャップを処理して得られた前腎様構造(矢印)。
- (C) Bの組織切片。内部に管状の前腎が観察された(矢印)。
- (D) 前腎原基を取り除いたままの胚は、幼生期には水分を排出できずに体が大きく膨張する。
- (E) 前腎原基を除去した部分にアクチビンとレチノイン酸で処理したアニマルキャップを移植すると、胚は体が膨張することなく正常に発生する。矢印は蛍光色素でラベルした移植部分を示す。

アニマルキャップを用いた新規心臓形成遺伝子の探索

心臓原基の誘導には隣接する前方内胚葉と頭部オーガナイザーから伝えられる2種類のシグナルが必要とされている^{14~16)}。また心臓原基が誘導されたあとも、拍動する心臓が形成されるまでにはさらに様々な別の因子が必要とされている¹⁷⁾。

しかしながら、誘導に関わる因子の全体像はまだ明らかになっていない。心臓の形成機構を解析するには心臓原基のみを胚から単離し、特異的に発現している遺伝子を解析することが望ましい。しかしながら心臓とその周辺領域の境界をはっきりと決まっているわけではなく、解析に必要な量の原基を直径1mmほどの胚から集めるのは困難な作業である。我々はこうした問題を克服するために、

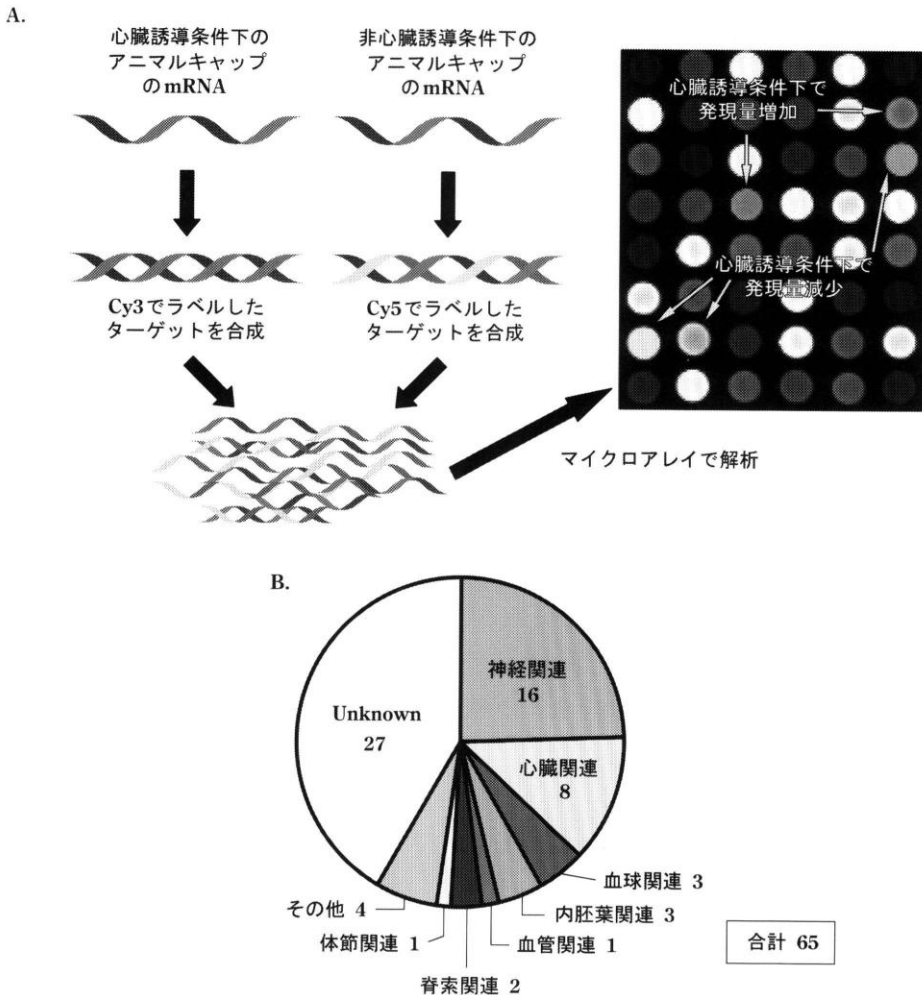


図6 ツメガエルマイクロアレイを用いての網羅的な遺伝子解析

(A)マイクロアレイ解析のスキーム。約8000の遺伝子が搭載されたアレイを用いてスクリーニングを行った。
 (B)マイクロアレイによって単離された遺伝子の内訳。心臓形成に関与する遺伝子が濃縮されていることが示された。機能未知の遺伝子群(27clones)の中にも、心臓関連の遺伝子が含まれることが期待される。

アニマルキャップから誘導した心臓を用いて網羅的な遺伝子発現解析を試みた(図6A)。心臓原基に較べればアニマルキャップを胚から切除することは簡単であり、遺伝子の単離など分子生物学的な解析に必要な数を集めることも可能である。

図3Aで示したように、解離してアクチビン処理をしたアニマルキャップから抽出したmRNAを「心臓誘導条件下の鋳型」とした。それに対して比較対照群は、解離せずにアクチビン処理をしたアニマルキャップから抽出したmRNAを用いた。それぞれのmRNAをラベルし、当研究室で設計したマイクロアレイを用いて解析したところ、心臓誘導条件下で2倍以上発現量が上昇する遺伝子を65

個得た。その内訳を調べたところ、既知の心臓形成関連遺伝子が多数含まれており、このアッセイ系が正しく動いていることが確かめられた(図6B)。現在はこの方法によって得られた新規の心臓形成関連遺伝子の発現解析、機能解析を進めている。同様の方法で、血管特異的な遺伝子、腎臓特異的な遺伝子等も複数単離されている¹⁸⁾。

おわりに

両生類の胞胚に相当する哺乳類の胚は胚盤胞とよばれる。胚盤胞には内部細胞塊と外部細胞塊の区別がみられ、胚体は内部細胞塊から生じる。ES細胞は内部細胞塊より得られた細胞株であり、1981

年に最初の ES 細胞株がマウス胚から樹立された¹⁹⁾。そして 1998 年、ヒトから ES 細胞株が樹立されると²⁰⁾、ES 細胞は基礎研究の域を越えて、再生医療への応用も考えられるようになった。特にここ数年は、ES 細胞を使って試験管の中で様々な器官を構築する試みが精力的に行われている²¹⁾。両生類胚のアニマルキャップと哺乳類胚の ES 細胞とは、そもそも由来が異なっており厳密には同じ細胞とはいえない。しかしいずれも多分化能を備えているため、適切な処理を加えれば体を構成する様々な組織や臓器に分化させることができる。我々の研究室でも、ツメガエルのアニマルキャップを使った先行研究の成果を反映しつつ、ES 細胞からの心筋細胞や膵島細胞などの誘導を試みている。

今後は両生類における先行研究の成果を如何にして哺乳類の幹細胞からの器官構築に反映するか、そしてそれら基礎研究から如何にして再生医療へとスムーズな移行を図るかが重要な問題となるのではないだろうか。その問題を解決する為にも、臓器形成における分子メカニズムをさらに詳細に解明せねばならないだろう。

文 献

- 1) Gurdon JB, Laskey RA, Reeves OR: The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol* 1975; 34: 93-112.
- 2) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 607-11.
- 3) Smith WC, Harland RM: Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 1992; 70: 829-40.
- 4) Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM: The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996; 86: 599-606.
- 5) Asashima M, Nakano H, Shimada K, et al: Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A (erythroid differentiation factor). *Roux's Arch Dev Biol* 1990; 198: 330-5.
- 6) 伊藤弓弦, 有泉高史, 浅島 誠: 両生類多分化能細胞を用いた試験管内での器官構築. 蛋白質核酸酵素増刊『発生システムのダイナミクス』. 共立出版, 2005. p.699-705.
- 7) Brand T: Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 2003; 258: 1-19.
- 8) Ariizumi T, Kinoshita M, Yokota C, et al: Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development. *Int J Dev Biol* 2003; 47: 405-10.
- 9) 山田賢裕, 尾池雄一, 須田年生: 血管新生. 編集 横田 崇, 再生医学がわかる. 羊土社; 2002. p.104-9.
- 10) Miyana Y, Shiurba R, Asashima M: Blood cell induction in *Xenopus* animal cap explants: effects of fibroblast growth factor, bone morphogenetic proteins and activin. *Dev Genes Evol* 1999; 209: 69-76.
- 11) Nagamine K, Furue M, Fukui A, et al: Induction of cells expressing vascular endothelium markers from undifferentiated *Xenopus* presumptive ectoderm by co-treatment with activin and angiopoietin-2. *Zoolog Sci* 2005; 22: 755-61.
- 12) Osafune K, Nishinakamura R, Komazaki S, et al: *In vitro* induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants. *Dev Growth Differ* 2002; 44: 161-7.
- 13) Chan TC, Ariizumi T, Asashima M: A model system for organ engineering: transplantation of in vitro induced embryonic kidney. *Naturwissenschaften* 1999; 86: 224-7.
- 14) Nascone N, Mercola M: An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Development* 1995; 121: 515-23.
- 15) Shi Y, Katsev S, Cai C, et al: BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol* 2000; 224: 226-37.
- 16) Schneider VA, Mercola M: Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 2001; 15: 304-15.
- 17) Mohun T, Orford R, Shang C: The origins of cardiac tissue in the amphibian, *Xenopus laevis*. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 244-8.
- 18) Inui M, Asashima M: A novel gene, *Ami* is expressed in vascular tissue in *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns* 2006; 6: 613-9.
- 19) Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
- 20) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
- 21) Lanza, R. Blau H, Melton D, et al: HANDBOOK OF STEM CELLS. London: Elsevier Academic Press; 2004.