

2020年5月

博士論文

Secondary neurulation における神経系自己増殖性
細胞の Sox2 による制御機構の解明

京都大学大学院 理学研究科

生物科学専攻 動物学教室

川地 輝明

目次

要旨 p. 2-3

はじめに p.4-7

本論

序章 p. 8-10

材料と方法 p. 11-14

結果 p. 15-25

考察 p. 26-30

図表 p. 31-53

引用文献 p. 54-60

おわりに p. 61

謝辞 p. 62

要旨

脊椎動物において主な神経系組織は、胚発生初期に出現する神経管と呼ばれる上皮管構造に由来する。神経管形成のプロセスは、からだの頭部側と尾部側で異なり、それぞれ **primary neurulation (PN)** と **secondary neurulation (SN)** と呼ばれる。PN はよく知られたプロセスであり、神経上皮組織である神経板が胚体内に折りたたまれることで管構造が獲得される。一方で SN は、すでに形成されている神経管の後端とそこに隣接する尾芽との境界部分で起こる現象であり、尾芽の間充織性前駆細胞が間充織-上皮転換を経ることで、神経管が後方へと伸長する。PN に比べて SN のメカニズムについての理解は大きく遅れていた。その理由として、SN を起こす間充織性の前駆細胞 (SN 前駆体) の特異的操作法が無かったことが挙げられる。そのため、神経管を含む体軸伸長に参与する細胞の実体については不明な点が多く、中胚葉-神経系の共通前駆細胞である **neuro-mesodermal progenitors (NMPs)** の関与のみがクローズアップされていた。しかし近年、所属研究室の下北らのニワトリ胚を用いた先行研究 (Shimokita et al, 2011) によって、SN に優先的に参画する前駆体の存在が示され、またそれらの細胞の予定運命領域 (**preSN 領域**) が同定されたことから、中胚葉には寄与しない神経系特異的な SN 前駆体の意義が認識され始めた。そこで本研究では、ニワトリ初期胚を用いて、SN 特異的な細胞標識および遺伝子操作技術と細胞移植法とを組合せ、SN 前駆体の細胞実体とその制御機構の解明を目的とした。

まず、下北らによってすでに同定されている SN 前駆体予定領域である菱形エピブラスト (**HH8; preSN 領域**) をさらに詳細に解析したところ、SN のみに参画する神経系の細胞群と、SN と中胚葉 (沿軸中胚葉など) の両方に参画する細胞群が、それぞれ別の領域に区別されて存在していることを明らかにした。次に、SN のみに参画する細胞集団 (**uni-fated SN**) を **EGFP** で標識し、それらを他の胚に移植するという方法を用いたところ、これらの細胞は、自己増殖と神経管上皮細胞への分化能を有する神経幹細胞様の形質を有することがわかった。幹細胞様の形質を持つ SN 前駆体は、尾芽領域の後方に位置していた。一方で、

前方の細胞は、神経管上皮へと分化しつつある集団であった。これら二種類の細胞集団の制御機構を知るために、これらの集団で異なる発現レベルを呈する転写調節因子 Sox2 に注目した。GOF や LOF アッセイの結果、高レベルの Sox2 が SN 前駆体の神経管分化に必要であること、また低レベルの Sox2 は SN 前駆体の維持に重要な働きを持つことが示された。

さらに、初期胚では uni-fated であった SN 前駆体をより後期ステージまで追跡したところ、HH17 (後期尾芽ステージの開始期)以降では、神経系に加えて中胚葉も産生することが観察された。このことから、初期胚では uni-fated であった SN 前駆体が、後期になると bi-fated へと運命を変化させることが示された。これらの結果から、議論が混沌としていた体軸伸長における NMPs 細胞の寄与に関して一定の解決を与えられ、また神経系の形成における SN 幹細胞様前駆体の重要性が示された。

はじめに

脊索動物の尾部とその役割

尾部、いわゆる尻尾と呼ばれる構造体は脊索動物の形態的特徴の一つであり、肛門から後方の体幹部が延長されたような器官である。尾部の構造は前方の体幹部と比べ単純で、外胚葉由来の表皮と神経管、そしてその神経管を包む中胚葉由来の脊椎骨と筋組織によって構成される。尾部は組織としては単純ではあるがその形態は脊椎動物内でも非常に多様性に富み、生育環境や行動様式に応じて様々である。例えば頭索動物や魚類、または尾索動物幼生および両生類幼生の尾部は、水を後方に掻き送り推進力を得るよう特化しており、水中でのスムーズな移動に寄与している (Drucker and Lauder, 2001; Frolich and Biewener, 1992; Fu et al., 2013; Liu et al., 1997; Wassersug, 2015)。爬虫類では、高所から滑空する際に空中での姿勢制御に利用される (Libby et al., 2012)。また、尾部に脂肪体を蓄積し栄養の貯蔵庫として利用したり、「トカゲのしっぽ切り」と呼ばれる尾部の自切によって外敵から身を守るために利用されたりする (Bustard and Hughes, 1966; Clark, 1971; Higham and Russell, 2010) など、個体の生存に有利に働く器官となっている。また、哺乳類でも尾部は走行時の balancer として寄与するほか、一部のサルでは皮膚の一部が指紋様に進化することで尾部をもう一つの手足のように利用することが可能となっており、樹上の移動能力を向上させている (Organ et al., 2011)。このように、尾部が正常に機能するためには、尾部の神経組織と筋組織とが正しく連携する必要がある。特に尾側神経組織が正常に形成されなかった場合、尾部の伸長不全を起こすだけでなく、二分脊椎症 (spina bifida) を発症し、尾部やそれと隣接する下腿部などの運動機能に大きな支障が生じる (Kawachi et al., 2017)。つまり、尾部の神経組織がどのような発生プロセスを経て正常な組織として形成されるかを明らかにすることは、尾部の形態形成を理解する上で非常に重要である。

脊椎動物における 2 つの神経管形成プロセス

尾部の機能は、中枢神経（脊髄）とそこから伸びる末梢神経によって制御される。司令塔である脊髄は、胚発生初期に形成される管状の構造（神経管）に起を發し、これが末梢神経も含めたほぼ全ての神経系組織のもととなる。脳を含め体の前方部分（頭部側）で起こる神経管形成のプロセスは **Primary neurulation**（以降は PN と表記）と呼ばれる。一方、後方で起こる神経管形成プロセスは **Secondary neurulation**（以降は SN と表記）と呼ばれ、PN とは区別される。脊椎動物の神経管形成は頭部側の PN から開始する。PN では、まずエピブラストと呼ばれる上皮性の細胞シートの一部から、神経板と呼ばれる組織が脊索の形成に伴って中軸付近に形成され（Acloque et al., 2011）、胚発生の進行とともに正中線で腹側に折れ曲がり胚体内に取り込まれたのちに、神経褶（neural fold: 神経管の背側部分）で癒合して表皮性外胚葉と分かれ、最終的に管状構造の神経管となる（Colas and Schoenwolf, 2001; Copp et al., 2003; Saitsu et al., 2004）。PN は脳を含めて、頭頂部から腰・仙椎部までの神経管形成に寄与し、特に頭部から胸椎レベルまでは完全に PN によって形成される（Dady et al., 2014）。

これに対し SN は、PN で形成された神経管上皮の後端部分で開始されるプロセスとして認識される。SN において神経管形成に関わる細胞は、尾芽に局在する間充織細胞である。つまり、PN では神経系の上皮組織の折りたたみによって管構造を形成するのに対し、SN では既に出来上がっている神経管の後端に隣接する間充織細胞が、間充織-上皮転換を経て神経管上皮細胞へと分化し、細胞が徐々に付加されることによって神経管の後方への伸長が起こる（Schoenwolf, 1979）。SN は約 80 年前にニワトリ胚において記載され（Holmdahl, 1938; Pasteels, 1937）、その後マウスやアフリカツメガエル、ゼブラフィッシュといったモデル生物においても確認されていた（Gont et al., 1993; Hughes and Freeman, 1974; Papan and Campos-Ortega, 1994; Schoenwolf, 1984）。SN の開始位置は動物種ごとに異なるが、ニワトリやヒトでは胸・腰椎の境界領域周辺の腹側から開始し、腰椎領域で PN から SN に徐々に切り替わり、仙椎の前方部分から尾椎領域にかけては完全に SN によって神経管が形成される

(Catala et al., 1996; Catala et al., 1995; Dady et al., 2014)。SN は脊椎動物間で保存されたプロセスであるにも関わらず、その細胞生物学及び分子生物学的なメカニズムについては PN のそれと比べ大きく遅れている。

Bi-fated NMP と uni-fated 前駆体

これまでに、SN 間充織細胞の前駆領域と予想されるエピブラストまたは尾芽内の細胞標識や個体間移植を用いた細胞系譜解析がマウスやニワトリを用いて行われ、それらの細胞が神経系組織（神経管や脊髄）と中胚葉系組織（中軸中胚葉や筋骨組織）へと参画することが報告された。つまり正常発生の過程において、SN に関わる間充織細胞は神経と中胚葉の両方に分化できる多分化能を持ち (bi-potential)、さらに bi-fated である neuro-mesodermal progenitors (NMPs) であるという説が強く支持されてきた (Cambray and Wilson, 2002, 2007; McGrew et al., 2008; Olivera-Martinez et al., 2012)。一方で、アフリカツメガエル初期胚の尾側エピブラストの交換移植法による細胞系譜追跡実験では、移植された尾側エピブラストに由来する細胞は、尾芽形成後に神経系あるいは中胚葉系のどちらかの細胞のみを生み出すことが示された。つまり、尾側エピブラストの前方領域は神経管上皮細胞を、後方領域は中胚葉組織のみを供給するなど、エピブラストの段階で、すでに予定運命が神経系か中胚葉系かのどちらかに決まっているという報告である (Beck, 2015; Beck and Slack, 1998)。これらを受けて、マウスにおいても中胚葉特異的な細胞運命を持つ uni-fated な前駆細胞の存在も示されるようになり (Garriock et al., 2015;)、uni-fated な神経系あるいは中胚葉系の前駆体と、bi-fated な NMP 細胞との間で長らく議論が続いていた。

本研究について

ニワトリ胚を用いた先行研究において、SN に参画するエピブラスト由来の細胞が同定され、ニワトリ胚尾芽において SN 特異的な解析が可能となった (Shimokita and Takahashi, 2011)。本研究ではまず、先行研究のエピブラスト

領域をさらに詳細に解析し、SN 予定領域 (preSN 領域)と中胚葉を生み出す境界領域を明確化することで、新たにエピブラスト領域の予定運命地図を作製した。次に、SN 特異的な細胞標識法や遺伝子操作法、そして遺伝子操作された SN 前駆細胞の移植法などを組み合わせることによって、uni-fated な SN 前駆体の中に幹細胞様の性質を持つ細胞が存在することを証明した。そして、幹細胞様前駆細胞群と、神経管上皮細胞に分化しつつある細胞群との違いが、転写調節因子 Sox2 の発現レベルに依存することを明らかにした。最後に、発生初期にみられた神経系のみを生み出す uni-fated な SN 前駆体が、体軸伸長の後期になると、神経系に加えて中胚葉組織をも生み出す bi-fated な細胞集団へと切り替わることを見出した。この結果は、体軸伸長における NMPs の知見と uni-fated 前駆体の知見の間に存在していた矛盾を解消しうるものといえる。

序章

羊膜類（爬虫類、鳥類そして哺乳類）の個体発生過程において、神経上皮細胞によって構成される神経管は、頭尾軸に沿って 2 つのプロセスを経て形成される。それらのプロセスは Primary neurulation (PN) と Secondary neurulation (SN) と呼ばれる。PN は将来の脳および胸部までの脊髄を含む頭部側で起こり、神経板と呼ばれる上皮細胞のシートが陥入することで管を形成する (Colas and Schoenwolf, 2001; Copp et al., 2003; Saitsu et al., 2004)。これに対し、腰部や仙部およびそれより後方の神経管は SN を介してつくられる。その際に、神経管は尾芽に存在する SN を起こす前駆細胞が間充織-上皮転換を経て付加されることで伸長する (Holmdahl, 1938; Hughes and Freeman, 1974; Pasteels, 1937; Schoenwolf, 1979)。尾芽は体軸伸長過程の胚体後端にみられる一過的な構造であり、継続的に SN を経て神経管細胞を供給する。Secondary neural tube に由来する神経は、結腸、膀胱、生殖器や尻尾などの運動機能を支配する (Copp et al., 2015; Le Douarin and Kalcheim, 1999; Snell, 1995; Stiefel et al., 2007)。加えて、SN プロセスが破綻した場合、ヒトの先天性奇形として知られる spina bifida などの二分脊椎症 (neural tube defects) にともなう神経障害を引き起こす (Copp et al., 2015; Copp et al., 2013; Dady et al., 2014; Detrait et al., 2005; Greenberg et al., 2011; Marks and Khoshnood, 1998)。従って、尾芽からの secondary neural tube 形成制御メカニズムの理解は重要な課題と位置づけられる。

尾芽は、中胚葉系の細胞も供給する（中軸および沿軸中胚葉）(Cambray and Wilson, 2002; Catala et al., 1995)。先行研究におけるニワトリ胚の Hamburger and Hamilton stage (HH)5~7 のエピブラストを用いた DiI 標識による細胞追跡実験や、ニワトリ-ウズラ間のエピブラスト交換移植実験から、非常に初期の発生段階のヘンゼン結節 (Hensen's node; HN) 近傍のエピブラストからは、神経系だけでなく中胚葉系の細胞も供給されることが報告されており (Cambray and Wilson, 2002; Catala et al., 1996; Selleck and Stern, 1991)、これらの実験結果から、神経系と中胚葉系の共通の前駆細胞 (neuro-mesodermal

progenitors, NMPs)の存在が予想されていた。NMPs は二つの予定運命を持つ bi-fated 細胞と位置づけられる。NMPs の存在は、Brachyury/T (Bra)-Cre/lox P システムを用いた遺伝学的な追跡実験などにより、マウス胚や(Garriock et al., 2015)、ある時期のニワトリ胚 (HH24 以後)においても報告された (Cambray and Wilson, 2002; McGrew et al., 2008; Olivera-Martinez et al., 2012)。これらの研究背景から、NMPs が体軸伸長の「すべて」の過程で主役的に働くものと見なされてきた。しかしながら、体軸伸長の過渡期である段階、たとえばニワトリ胚の HH8~20 を対象にした解析はほとんどされていなかった。

一方で、マウスの *Cited1* (中胚葉特異的に発現するエンハンサー)-Cre/lox を用いた遺伝学的解析から、自己増殖性の単一予定運命 (uni-fated)の中胚葉系細胞の存在が予想され (Garriock et al., 2015)、さらにはその中に中胚葉系幹細胞が含まれる可能性もニワトリ胚を用いて提起された (Imura and Pourquie, 2006)。これらの発見から、SN 神経系においても uni-fated な幹細胞が尾芽に存在し、それらが secondary neural tube の伸長に寄与する可能性が浮上した。もしこのような幹細胞様の前駆細胞が存在するのであれば、それらがどのようにして体軸伸長期の SN に参画するかを明らかにする研究が望まれるが、技術的な壁によってこのような研究は全く行われていなかった。その大きな理由は、尾芽に存在する細胞は全て間充織の形態を示すため、形態的解析では、SN 神経系細胞、中胚葉系細胞、NMPs を互いに区別することが極めて困難だったからである。

私の所属する研究室の先行研究において、secondary neural tube の形成にのみ参画する細胞群が報告された。これらの細胞は HH8 胚後方の、ヘンゼン結節と原条に挟まれた特徴的な「菱形領域エピブラスト」に由来する (Shimokita and Takahashi, 2011) (Fig. 1A)。この菱形エピブラストは上皮性シートであるにもかかわらず、裏打ち構造である基底膜をもたず、上皮-間充織転換を経て胚体内に浸潤するなど、原条に由来する中胚葉系細胞に酷似した挙動を示す。このような細胞生物学的視点から、この菱形エピブラストは SN を起こす前駆細胞 (SN 前駆体)を生み出す「特別な原条」と見なすこともでき、これらの現象

を深く理解することの重要性が高まった。SN 前駆体の「菱形領域エピブラスト」からの EMT-浸潤は、ニワトリ胚では HH11 で完了する。

本研究では、まず菱形エピブラストの予定運命地図をさらに精密化することで、神経系のみ細胞運命が特化した uni-fated SN 前駆体が、HH17 まで尾芽に存在し続けることを示した。次に、これらの uni-fated SN 前駆体には、自己増殖と神経分化の 2 つの状態が別々の区域に存在し、その異なる状態が転写調節因子 Sox2 の発現レベルの差異によって制御されていることを示した。低レベルであれば自己増殖、高レベルであれば神経分化を促進する。また一般的に NMPs のマーカーと見なされている Sox2 と Bra の共発現が、uni-fated SN 前駆体でも明瞭に検出できたことから、Sox2/Bra の共発現は必ずしも NMPs のマーカーではないことを提示したい。最後に、ニワトリ胚が HH19 以降になると、それまで uni-fated であった SN 前駆体が、中胚葉系の子孫をも産生することを見出した。体軸伸長に関わる前駆細胞の細胞運命が、これまで考えられてきたよりもはるかに柔軟であることが示されると同時に、uni-fated と NMPs に関する長年の議論に一定の解決を供することができた。

材料と方法

ニワトリ胚

ニワトリ受精卵は城山鶏園（神奈川県）とヤマギシ養鶏場（和歌山）より入手した。ニワトリ胚は Hamburger and Hamilton (HH) stages (Hamburger and Hamilton, 1951)もしくは体節数に合わせてステージングした。すべての動物実験は京都大学の施行する倫理審査基準 (No. H2620)に合わせて実施した。

発現ベクター

pCAGGS-EGFPは過去に記載されたものを使用した (Momose et al., 1999)。Sox2およびSox3HMG-EnRのcDNAは福田公子博士 (東京都立大)と笹井芳樹博士 (理化学研究所BDR)からそれぞれ提供された。それぞれのcDNAは個別にpBI-EGFPまたはpBI-DsRedベクターのMlu I-Nhe Iサイトにサブクローニングした (Watanabe et al., 2007)。

In ovo エレクトロポレーション法

陽極と陰極には白金ワイヤー (0.5 mm 径)と研磨したタングステン針 (0.5 mm 径)をそれぞれ使用した。*In ovo* エレクトロポレーションは過去に報告された手法 (Shimokita and Takahashi, 2011)を最適化し HH8 (6 somite stage; 6ss)胚に実施した。陽極を胚と卵黄の間に挿入し、2%ファストグリーン FCF (069-00032; Wako)を含む DNA 溶液をエピブラスト上に乗せた後に、電圧 5V のパルスをも5回、25ミリ秒 (100ミリ秒間隔) (Electro Square Porator ECM830; BTX を使用)で陰極から加えた。作業は DNA 溶液が中胚葉領域である原条に流れ広がらないよう注意を払って実施した。Fig. 2、3、5、10、11 に用いた pCAGGS-EGFP の濃度は 5 µg/µl。

PKH 細胞標識法

PKH26 Red Fluorescent Cell Linker mini Kit (Sigma; MINI26-1KT)、PKH67 Green Fluorescent Cell Linker mini Kit (Sigma; MINI67-1KT)を用い

て細胞標識を行った。染色溶液は PKH26 または 67 と Dilute C を 1 対 5 の割合で調合したものを使用した。1mm 径のガラスキャピラリー (Narishige; GD-1)をキャピラリープーラー (Narishige; PC-10)を用いてヒートレベル 69 で引き伸ばしたものを使い、空気圧によって染色溶液を HH8 (6ss)ニワトリ胚の SN 予定領域または原条へ噴出し蛍光色素を細胞膜へと定着させた。染色後は、Hank's リン酸緩衝液で余剰の染色溶液を洗い流し、セロファンテープで機密し孵卵器内 (38.5°C設定)で HH14 (22~24ss)まで発生を進めた。

DIG 標識 RNA プローブ作成

sox2 の *in situ* ハイブリダイゼーション用の RNA プローブ作成のため、Sox2 全長配列を挿入した BlueScript II プラスミドを利用した。制限酵素 Kpn I および Sac I によって Sox2 配列の 5'側と 3'側を一か所切断し、直鎖プラスミドを作成した。作成した直鎖プラスミドを鋳型とし、以下の組成の反応液を作成した (RNase free H₂O 13 µl, 10x Transcription buffer 2 µl, DIG RNA labeling mixture (11277073910, Roche) 2 µl, 1 mg/ml 鋳型 DNA 1 µl, RNase inhibitor 1 µl, RNA polymerase 1 ml, 合計 20 µl)。反応液を 37°C で 2 時間反応させ、100 ng/µl の濃度に RNase free H₂O で調整し、*sox2* のアンチセンスプローブとセンスプローブをそれぞれ獲得した。

In situ ハイブリダイゼーション

Whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションは Henrique のプロトコルを基本とし、以下の手順で行った (Atsuta and Takahashi, 2015; Henrique et al., 1995)。胚を 3% PFA/PBS を用いて 4°C で一晩固定したのちに、PBS で洗浄した。0.25% Triton X-100/PBS (PBST)での洗浄を常温で 30 分、3 回繰り返した。PBST を、65°C でプレヒートした UltraHyb™ Ultrasensitive Hybridization buffer (以降は UltraHyb buffer と表記。AM8670, Invitrogen)と交換し、胚を 65°C で 1 時間緩やかに振盪し、プレハイブリダイゼーション処理を行った。プレハイブリダイゼーションに用いた UltraHyb buffer を丁寧に除き、90°C で 3

分間変性させた RNA プローブ溶液 3 μ l を加えた UltraHyb buffer 900 μ l を加えて、胚を 65°C で一晩振盪しハイブリダイゼーション処理した。翌日、RNA プローブ UltraHyb buffer を除去し、Solution 1 (ホルムアミド 500 μ l, 20x SSC buffer 250 μ l, 10% SDS 100 μ l, ddH₂O 150 μ l) 1ml で胚を洗浄した。続けて胚を、Solution 2 (ホルムアミド 500 μ l, 20x SSC buffer 100 μ l, ddH₂O 400 μ l) 1 ml で洗浄し、さらに Solution 2 と TBST の 1 : 1 混合液で洗浄した。その後、TBST による胚洗浄を 15 分、3 回繰り返した。洗浄を終えた胚に 2% Blocking reagent/TBST を加え、常温で 2 時間ブロッキングした。2% Blocking reagent/TBST を除去し、AP-anti DIG 抗体 (11093274910, Roche, 1:1000) 1% Blocking reagent/TBST を加え、4°C で一晩抗体反応させた。翌日、抗体溶液を除き、胚を TBST で 15 分、3 回洗浄した。発色反応の前処理として、NTMT buffer (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH9.5), 0.05 M MgCl₂, 0.1% Tween20) で胚を 15 分、3 回洗浄した。NTMT buffer 5 ml に対し、NBT 4.7 μ l、BCIP 3.5 μ l を加えた発色液を作成し、洗浄液と交換して室温で発色反応を進めた。十分に発色した時点で発色液を速やかに除き、PBST で 15 分胚を洗浄後、4% PFA/PBS を加え、4°C で 1 時間固定した。PFA 溶液を除き、PBS で 15 分洗浄を 3 回行い、胚を実体顕微鏡下で観察した。また、一部のサンプルを用いて凍結切片を作成し、ニワトリ胚尾芽の正中切片における *sox2* mRNA の検出に利用した。

組織免疫染色

胚は 3% PFA を含む PBS を用いて 4°C で 2 時間固定したのちに、10 μ m 厚の凍結切片を作製した。Sox2 および Brachyury (T) タンパク質の検出は、切片を 2% Blocking reagent (Roche)/ PBS によって室温で 1 時間ブロッキングしたのちに、抗体を含む 1% Blocking reagent/PBS を乗せて 4°C、一晩インキュベートして反応させた。各一次抗体は以下の希釈倍率で使用し、4°C で一晩抗体を反応させた；抗 Sox2 ポリクローナル抗体 (ウサギ由来、ab5603; Millipore、1:100) (Oginuma et al., 2017)、抗 Brachyury (T) ポリクローナル抗体 (ヤギ由来、AF2018; R&D Systems、1:100) (Nakanoh et al., 2017)、抗 Fibronectin

ポリクローナル抗体（ウサギ由来、F3648; Sigma、1:300）（Yoshino et al., 2014）、抗 GFP モノクローナル抗体（マウス由来、11814460001; Roche、1:300）、抗 cleaved-Caspase3 ポリクローナル抗体（ウサギ由来、G7481; Promega、1:125）、そして抗リン酸化ヒストン H3 ポリクローナル抗体（ウサギ由来、06-570; Millipore、1:200）。PBST で 3 回洗浄後、それぞれの免疫動物に適した二次抗体を含む 1% Blocking reagent/PBS をのせ室温で 1 時間反応させた。各二次抗体は以下のものを 1:400 の希釈濃度で使用した：抗ウサギ IgG-Alexa 568 抗体（ロバ由来、A10042; Invitrogen）、抗ヤギ IgG-Alexa 488 抗体（ロバ由来、A11055; Invitrogen）、抗ウサギ IgG-Alexa 647 抗体（ロバ由来、A31573; Invitrogen）、抗マウス IgG-Alexa 488 抗体（ロバ由来、R37114; Invitrogen）、抗ヤギ IgG-Alexa 647 抗体（ロバ由来、A21447; Invitrogen）。PBS で 3 回洗浄後、切片を VECTASIELD Mounting medium (H-1200, Funakoshi) で封入した。

ニワトリ胚への Doxycycline (Dox) 投与

500 μ l の Dox 溶液 (0.1 mg/ml in HANKS: 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.34 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ pH7.0) を過去の文献 (Watanabe et al., 2007) に従い、胚と卵黄の間に注入した。Fig. 10 の実験を行う際には、移植実験を行う 1 時間前に Dox 溶液をドナーとホスト胚に共に投与した。

結果

ニワトリ胚 HH8 の菱形エピブラストの予定運命地図作成

SN に優先的に参画する間充織細胞 (SN 前駆体)は、HH8 (6 somite stage; 6ss)ニワトリ胚のヘンゼン結節後方に位置する菱形エピブラストに由来する (Shimokita and Takahashi, 2011)。この菱形エピブラストは、予定 SN (presumptive SN region; preSN)領域と名付けられた。しかし、preSN 領域の後方、つまり原条の頭側端との境界については、詳しい解析はなされていなかった。そこで本研究では、この菱形エピブラストと原条との境界部分の予定運命を解析するために、蛍光標識色素 PKH を用いた細胞追跡実験を行った。菱形エピブラストの頭側端 (ヘンゼン結節の位置)の相対的な位置を 0%、一方で尾側端を 100%と定義し、HH8 (6ss)胚の菱形エピブラスト内を頭尾軸に沿って、75 箇所を選びそれぞれ PKH 標識した。標識した胚を HH14 (23-24ss)まで発生させ、PKH 陽性細胞を観察し、菱形エピブラスト内の予定運命を評価した。Fig. 1A にあるように、菱形エピブラストの前方 70%までの領域を標識した場合、子孫細胞は神経管と後方の尾芽の中央部分に検出され、中胚葉系組織では検出されなかった。続く後方の 20%領域を標識した結果、神経組織共に沿軸中胚葉においても標識細胞が検出された。菱形エピブラスト尾側端の 10%以後を標識すると、標識細胞は沿軸中胚葉のみで検出され、神経系組織には認められなかった。以上の結果から、HH8 (6ss)ニワトリ胚の菱形エピブラストの、より詳細な予定運命図が作成された (Fig. 1B)。これ以降、“preSN 領域”は、特に SN 前駆体を生み出す菱形エピブラスト、つまり「前方 70%」の領域を指すことと定義する。これらの観察結果では、preSN 領域の標識では、SN のみならず PN を経て作られる神経管も標識された。これは、preSN 領域には PN の前駆体も含まれるという先行研究の結果と一致している (Shimokita and Takahashi, 2011)。

SN 前駆体と中胚葉系細胞の尾芽内での局在パターンを調べるため、同一胚内における多重蛍光染色による細胞追跡を行った。preSN 領域と原条前方領域の一部を、それぞれ異なる蛍光色素 PKH26 (赤色)と PKH67 (緑色)により標識した (Fig. 1C, F)。標識胚を HH14 (23ss)まで発生を進め、背側から観察した結

果、preSN 由来 (赤色)細胞集団と原条由来 (緑色)細胞集団のシグナルはほとんど重なり合わなかった (Fig. 1D, G)。このことは、これらの胚の正中切片の観察においても同様であった。以降、赤色で標識された神経系間充織細胞の局在する区画を SN 前駆体区画と呼ぶ (Fig. 1E, H)。染色されていない領域が赤色標識と緑色標識集団の間に見られることがあるが、これらはおそらく、菱形エピブラストの後方 30%領域に由来すると考えられる (Fig. 1A)。

SN 前駆体特異的な遺伝子操作

今回新たに作成した予定運命地図に基づき、SN 前駆体に特異的な遺伝子導入を、*in ovo* エレクトロポレーション法を用いて行った。EGFP 発現プラスミド溶液を preSN 領域上に充填し、エレクトロポレーションを行った場合 (Fig. 2A)、preSN 領域に由来する細胞のみが EGFP によって標識されると予想した。しかし、実際に 389 個の胚に対しエレクトロポレーションを行った結果、1) PN のみが標識された胚 (case 1, 154/389, data not shown)、2) PN と SN が標識された胚 (case 2, 184/389, Fig. 2C)、3) PN と SN、そして中胚葉が標識された胚 (case 3, 51/389, Fig. 2E)の 3 つのパターンの胚が認められた (Fig. 2B)。この結果は、電極の位置関係による放電位置のずれや、充填したプラスミド溶液の菱形エピブラスト後方 30%領域への拡散が原因と考えられる。3 つのパターンの胚をそれぞれ観察し続けた結果、case2 (PN+SN)の胚は HH17 (30ss)まで発生を進めても、EGFP 陽性細胞は神経系の細胞のみで検出された (Fig. 2D)。そこで、case 2 と評価された胚のみを選別してこれ以降の解析に用いた。それ以外の胚 (case 1 と 3)は廃棄した Fig. 2E)

SN 前駆体には自己増殖性細胞が存在する

preSN 領域を PKH または EGFP によって標識した個体では、体軸伸長とともに形成された secondary neural tube 内に標識細胞が含まれていた。加えて、その後方の尾芽領域に存在する間充織細胞内にも SN 前駆細胞が認められた (Fig. 1, 2C, D)。このことから、尾芽内の SN 前駆細胞から神経管上皮細胞が供

給されると同時に、SN 前駆細胞が増殖によって自身の集団を維持していると予測された。このことをより詳細に解析するために、SN 前駆体集団の同所性移植実験を行った。preSN 領域に EGFP プラスミドを遺伝子導入した HH17 (30ss) 胚を準備し (Fig. 3A, B)、EGFP で標識された SN 前駆体区画を尾芽から摘出した。摘出した SN 前駆体を、HH14 (23ss) ホスト胚の SN 前駆体区画 (将来的な 30~32 番目の体節レベルに相当) に移植し (Fig. 3A-D, n=8)、移植された SN 前駆体に由来する EGFP 陽性細胞を HH17 で観察した。なお、移植片を摘出する際には、SN 前駆体区画の腹側に位置する chord-neural hinge (CNH) 及び中軸中胚葉の運命をもつ細胞が混入しないように細心の注意を払った (Catala et al., 1995) (Fig. 1E, H)。観察の結果、移植された EGFP 陽性細胞は、ホスト胚尾部において、31~33 体節レベル以降の secondary neural tube と SN 前駆体区画でのみ検出された (Fig. 3E)。この移植胚からさらに EGFP 陽性細胞を含む SN 前駆体区画を摘出し、前述と同様に別の HH14 ホスト胚の SN 前駆体区画へと移植した (Fig. 3C, E-G)。移植された EGFP 陽性細胞は、やはり secondary neural tube と SN 前駆体区画で検出され、その他の組織では検出されなかった (Fig. 3H)。これらの結果は、SN 前駆体の集団が、神経管上皮細胞へと分化しつつ、同時に自己増殖能をもつ細胞群であることを示す。本研究ではこれらの新規細胞群を、uni-fated な神経系幹細胞様の集団と呼ぶことにした。

次に、尾芽内の SN 前駆体のうち、どの細胞群が幹細胞性を持つかを調べるために、移植片を細分化して上述と同様の同所性移植実験を行った。HH14 胚の SN 前駆体区画を前後の領域に分け、それぞれを同じステージである HH14 ホスト胚尾芽内へと移植した (Fig. 3I)。前方領域に由来する細胞群を移植した場合には、EGFP 陽性細胞は HH16 の時点で、将来 31~33 体節レベル以降の分化した神経管でのみ検出され、尾芽の SN 前駆体区画には検出されなかった (Fig. 3I-L, n=6)。これに対し、SN 前駆体区画の後方半分から移植された EGFP 陽性細胞は、ホスト胚内で神経管だけでなく SN 前駆体区画でも検出された (Fig. 3I, M-O, n=5)。これらの結果から、尾芽内の uni-fated SN 前駆体集団は、性質の異なる 2 種類の細胞群に大別することができる。一つは、SN 前駆体区画

の前方に局在し SN を起こす分化中の集団であり、もう一つは後方で自己増殖しながら前方へと分化細胞を供給する幹細胞様の集団である。後方集団（幹細胞様）を移植した際に、それらが secondary neural tube 内において、31~33 体節レベルではなく、35 体節レベルより後方の領域で検出されることに気がついた。このことから、後方の自己増殖性細胞が上皮分化を経て神経管形成に参画するまでに、3~6 時間を要することがうかがえた（ニワトリ胚では、体節分節は 90 分ごとに進行する (Palmeirim et al., 1997)）。

後方の幹細胞様集団と、前方の神経上皮へと分化しつつある集団で、細胞増殖頻度が異なるかについて、HH14 (23ss)胚の尾芽を対象にして、細胞増殖マーカーであるリン酸化ヒストン H3 の免疫染色を行ったところ、これら両者間で有意な差は認められなかった (Fig. 4)。前方の分化過程集団は、自身の増殖頻度より高い割合で SN へと参画することが予想される。

SN 前駆体における Sox2 の発現レベルの差異

SN 前駆体区画において、「前方の」神経分化集団と、「後方の」自己増殖集団という特性の違いが、どのような分子メカニズムによって制御されているのかを理解するため、さまざまな候補因子を探索し、転写調節因子 Sox2 に注目することにした。Sox2 は未分化な神経管上皮細胞において発現し、尾芽中胚葉で強制発現されると異所的な神経管形成を誘導することが報告されており (Takemoto and Kondoh, 2011)、また SN のプロセスにおいても神経上皮化と同時に発現が上昇することが知られている (Shimokita and Takahashi, 2011)。そこで尾芽における *sox2* の発現を詳細に観察するために、HH14 (23ss) での *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*sox2* mRNA のシグナルは、SN 前駆体の前方集団で強く検出されたが、後方集団ではほとんど検知されなかった (Fig. 5A, B; n=6)。次に、Sox2 の分布をより高感度で検出するため、抗 Sox2 抗体を用いた蛍光免疫組織染色による解析を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察の結果、Sox2 タンパク質のシグナルは、secondary neural tube および SN 前駆体の前方集団だけでなく、後方集団においても低レベルで検出

された (Fig. 5C, E, J, L, N)。これらの差異をより定量的に解析するため、蛍光免疫組織染色で得られた蛍光強度を測定しグラフ化した。その結果、Sox2 は神経管領域および SN 前駆体前方において高い蛍光強度が検出されたが、後方に行くに従ってその強度は減衰した (Fig. 5F, G)。Sox2 陽性の領域は、HH8 の preSN 領域に由来する EGFP 標識 SN 前駆体区画とも一致したことから、Sox2 陽性細胞が SN 前駆体であることがより強く裏付けられた (Fig. 5H-J, L, N)。尾芽のより後方に位置する中胚葉区画では、Sox2 のシグナルは検出されなかった (Fig. 5C, E-G, J, L, N, Fig. 6B, D, E, H, J, L; n=15)。

つぎに尾芽における NMPs について検証を行った。NMPs は神経系と中胚葉系の両方の分化細胞を生み出す共通前駆細胞であり、これまでは、神経系マーカーの Sox2 と共に、中胚葉系のマーカーである Brachyury (転写調節因子。以降は Bra と表記)を発現する細胞であるという主張が優性になっていた (Garriock et al., 2015; Henrique et al., 2015)。尾芽において、Sox2・Brachyury を共発現する細胞が存在するかを調べるため、これらそれぞれの抗体を用いて、二重免疫組織染色を行った。その結果、従来予想に反して、Bra のシグナルは尾芽の間充細胞全体、つまり SN 前駆体を含む集団、で検出された (Fig. 5D, E, G, K, M, N, Fig. 6C, D, G, H, K, L)。興味深いことに、尾芽前方の SN 前駆体区画においても、Sox2・Bra ダブルポジティブ細胞が頻繁に認められた。これらの細胞が本当に SN のみに参画する uni-fated 細胞であるかを知るために、これまで繰り返し述べてきた SN 前駆体特異的 EGFP 標識と免疫組織染色とを組み合わせた。Fig. 5H に示すように、正中切片を作成し、神経管上皮細胞 (白枠 1)、前方 SN 前駆体 (白枠 2)、後方 SN 前駆体 (白枠 3) の 3 か所の細胞において、その核内での Sox2 と Bra のシグナルを観察した。その結果、神経管上皮細胞では Sox2 シグナルのみが検出され、Bra は検出されなかった。一方で、前方の SN 前駆体では同一細胞の核内で Sox2 と Bra が共局在していた。また、後方の SN 前駆体においても微弱ながら Sox2 のシグナルが検出され、Bra と核内で共局在する様子が検察された (Fig. 5N)。白枠以外の EGFP 標識 SN 前駆体においても、細胞核内で Sox2 と Bra が共局在していることを確認した (data

not shown)。マウスの菱形エピブラストのノードと原条の境界領域やそれに由来する NMPs が Sox2⁺/Bra⁺であることから、Sox2⁺/Bra⁺は NMP マーカーであるとの報告がなされる一方で (Garriock et al., 2015; Henrique et al., 2015)、近年ではマウス尾部の神経系前駆細胞においても Sox⁺/Bra⁺細胞が存在するという報告もあり (Gouti et al., 2017; Koch et al., 2017; Wymeersch et al., 2016)、今回の結果は Sox⁺/Bra⁺は NMPs のマーカーとはいえないという主張を裏付けるものと考えられる。

Sox2 の発現上昇により SN 前駆体から神経管分化が促進される

尾芽内における前方と後方の SN 前駆体での *sox2* の発現レベルの違いが、これらの形質の差異にどのように関わるかを調べるため、Sox2 の過剰発現解析を行った。Sox2 の過剰発現には Tet-off システムを利用した。エレクトロポレーション法を用いて、HH8 胚の preSN 領域に pBI-Sox2/EGFP と pCAGGS-Tet-off の 2 種類のプラスミドを共導入した。pBI-Sox2/EGFP プラスミドは、テトラサイクリン応答因子 (Tetracyclin Responced Element (TRE)とも呼ばれる)の双方向型プロモーターを持ち、テトラサイクリン調節性トランスアクチベーター (tTA)またはリバーステトラサイクリン調節性トランスアクチベーター (rtTA)が結合することで、Sox2 と EGFP 両遺伝子を同時に発現させることができる。また pCAGGS-Tet-off は、ドキシサイクリン (Dox)非存在下で TRE に結合し遺伝子発現を誘導する tTA を発現する (Dox 存在下では TRE への結合が抑制され転写が抑制される)。これら 2 種類のプラスミドを共導入することで、preSN 領域細胞に対し Sox2 を恒常的に発現させると同時に、EGFP による標識が可能となる (Fig. 7A)。HH8 胚の preSN 領域にエレクトロポレーションを行い、HH14 (23ss)で観察を行った結果、EGFP のみを発現させたコントロール細胞は、神経管および SN 前駆体で検出された。これに対して Sox2 過剰発現細胞は、神経管内で検出される一方で、尾芽ではほとんど検出されなかった (Fig. 7B, C)。SN 前駆体区画に存在する EGFP 発現細胞数を計測した結果、コントロール EGFP 胚では 38~64 細胞が検出されたのに対し、Sox2/EGFP 過剰発現胚では 0~9 細

胞が検出された (Fig. 7D)。このように、Sox2 の発現を実験的に上昇させた結果、SN 前駆体の数が著しく減少した。しかしこの結果が、早期に神経管分化が促進されたのか、あるいは Sox2 の過剰発現によって細胞死を引き起こした結果なのかは判断ができない。Sox2 が属する SoxB1 ファミリーの他のメンバーである Sox3 は、初期胚のエピブラストに発現させると神経板の性質を獲得し EMT を抑制することが報告されている (Acloque et al., 2011)。つまり、preSN 領域での Sox2 過剰発現によって、preSN 領域細胞の EMT が抑制され直接的に神経管形成を起こした可能性も排除しきれない。そこで、導入した遺伝子発現の時空間的制御ができる Tet-on システムを利用して、これらの可能性が排除できるかを検討した。Tet-on システムでは Dox 存在下でのみ遺伝子発現が誘導されるため、遺伝子導入 preSN 領域細胞が正常発生と同じように EMT を起こして尾芽を形成したのちに、Dox を投与することで尾芽内 SN 前駆体に対して遺伝子発現を開始させることが可能である。先述の pBI-Sox2/EGFP と共に、pCAGGS-Tet-on 3G (Dox 存在下でのみ pBI ベクターの TRE に結合する rtTA を発現する)、そして遺伝子導入効率をモニターするための pCAGGS-mCherry の 3 種類のプラスミドを組み合わせて、preSN 領域に遺伝子導入した (Fig. 7E)。尾芽が形成される HH14 (22ss) に達した時点で、遺伝子導入胚に Dox を投与した。投与時点では (0 時間)、Dox による pBI プラスミドの発現誘導が起これないため、Control 胚と Sox2 強制発現胚のどちらにおいても EGFP のシグナルは検出されず、また mCherry 発現細胞の局在にも差は見られなかった。(Fig. 7E, F, K; n=7)。

Dox 投与から 3 時間を経た HH14 (24ss) で、予想どおり EGFP 発現細胞が確認された (Sox2 過剰発現胚では同時に Sox2 を発現していることを意味する)。これは、Dox 投与後 3 時間で TRE による発現が確認できるという過去の知見とも一致する (Watanabe et al., 2007)。ニワトリ胚を用いた *in ovo* エレクトロポレーション法では、細胞集団に対してモザイク状に遺伝子導入されるため、EGFP と mCherry のように 2 種類の異なる蛍光タンパク質を発現するプラスミドが導入された場合、3 タイプの遺伝子導入細胞が出現することになる (① mCherry (赤

色)、②EGFP (緑色)、③mCherry・EGFP共発現細胞 (黄色))。実際に、Dox投与後3時間後の神経管およびSN前駆体において、これらの3タイプの細胞が観察された (Fig. 7E, G, H, L, M; n=7)。

その後、Dox投与後9時間 (EGFPのシグナルが確認されてから6時間後)のコントロールEGFP導入胚とSox過剰発現胚の尾芽において、EGFP標識SN前駆体の分布パターンに顕著な差が見られた。コントロール胚尾芽においては、3タイプの細胞がそれぞれmCherry単独型 (赤色, 7.2%)、EGFP単独型 (緑色, 8.9%)、mCherry・EGFP共発現型 (黄色, 83.9%)の割合で観察された (Fig. 7I, J, P; n=7)。一方で、Sox2/EGFP過剰発現胚の尾芽内では、mCherry単独型細胞 (赤色)が検出されたが、EGFP発現細胞 (黄色もしくは緑色)はほとんど検出されなかった (Fig. 7N, O, P; n=11)。またコントロール胚とSox2過剰発現胚の神経管においても差が見られた。コントロール胚神経管では、mCherry単独細胞、EGFP単独細胞、mCherry・EGFP共発現細胞の3タイプの細胞種がすべて含まれていたが、Sox2過剰発現胚の神経管では、より前方領域には3タイプの細胞種が検出されたが、尾芽に隣接する前方1体節長の新生上皮化細胞の領域はmCherry単独細胞で占められていた (Fig. 7N, Oの白矢印のやや前方付近)。Sox2過剰発現胚の尾芽におけるSN前駆体の消失が、細胞死によるものかを判別するため、Dox投与後4時間の尾芽内EGFP発現細胞におけるアポトーシスマーカーCaspase3の切断活性を、蛍光免疫組織染色によって確認した (Fig. 8A-D)。観察の結果、Sox2過剰発現細胞において切断型Caspase3シグナルの有意な上昇は観察されなかった (Fig. 8E)。これらの結果から、Sox2の発現上昇によって、SN前駆体の神経管上皮細胞への分化が促進されたと結論づけられた。

Sox2 は SN 幹細胞様集団の維持にも必要である

Sox2 の過剰発現によって、SN 前駆体の神経上皮分化が促進されたことから、内在性 Sox2 のシグナルを抑制した場合、SN 前駆体の分化が阻害され未分化状態が維持されると予想した。そこで Sox2 の機能阻害を行うために、SoxB1 ファミリー遺伝子 (Sox1~Sox3)のドミナントネガティブ型として知られる

Sox3-HMG-EnR (Bylund et al., 2003; Sasai, 2001)の強制発現実験を行った。ニワトリ胚尾芽内の SN 前駆体においては、Sox2 が発現する一方で Sox1 および Sox3 は発現しないことから (Uchikawa et al., 2011)、導入された Sox3-HMG-EnR は、SN 前駆体内の Sox2 の機能を抑制すると考えられる。

まず Sox3-HMG-EnR のドミナントネガティブ活性を確認するために、pBI-Sox2/EGFP と pBI-Sox3-HMG-EnR/DsRed の共導入を行った。その結果、Sox2 過剰発現胚に見られた SN 前駆体の神経上皮分化の早期化 (Fig. 9A, C)が、Sox3-HMG-EnR との共発現によって中和され、顕著な数の共発現細胞が初期尾芽内で検出された (Fig. 9B, C)。このことから、Sox3-HMG-EnR はニワトリ尾芽内においても、期待通りドミナントネガティブ型として働くことが確認された。

次に、Sox2 強制発現の際に用いた Tet-on システムによって、Dox 依存的に「尾芽形成後」の SN 前駆体で Sox3-HMG-EnR を発現させた。この実験においては、3 種類のプラスミド：①pBI-Sox3-HMG-EnR/DsRed (TRE によって双方向に Sox3-HMG-EnR と DsRed を発現 (コントロールの pBI-DsRed は DsRed のみを発現)、②pCAGGS-EGFP、③pCAGGS-Tet-on 3G を組み合わせて利用した。さらに、尾芽内の SN 前駆体細胞のみを特異的に解析するために、エレクトロポレーションされた SN 前駆体を HH14 (22ss)遺伝子導入胚から摘出し、同じステージの宿主胚への同所性移植を行った (移植操作 1 時間前にドナー胚、宿主胚に Dox を投与した) (Fig. 10A, B, I; n=5)。

Dox 投与後 12 時間の時点 (HH16 に到達)において、DsRed (同時に Sox3-HMG-EnR を発現)のシグナルが検出された (タンパク質の構造の違いにより、mCherry と比べて Dox 処理後の DsRed の検出に遅れが生じることはすでに知られている) (Fig. 10 A-D, I-K; n=5)。コントロール胚では、Fig. 3 の SN 前駆体移植実験と同様に、移植された EGFP・DsRed 共発現細胞、EGFP 単独発現細胞、および DsRed 単独発現細胞が、神経管内と尾芽内の SN 前駆体で確認された (Fig. 10B-D; n=5)。これに対し Sox2 阻害胚では、DsRed 陽性 (Sox2 阻害)細胞は尾芽でほとんど検出されなかった。Sox3-HMG-EnR の発現によ

て細胞死が促進された可能性が考えられる。また、新生 secondary neural tube 領域では、DsRed 陽性細胞は神経管上皮様の形態をとらず、凝集体を形成していた (Fig. 10I-K; n=5)。Sox2 阻害胚における移植細胞の形態をより詳細に観察するため、尾部の横断切片を作成した。コントロール胚では、DsRed 陽性細胞が神経管内で上皮様の形態で検出され (Fig. 10E, F)、さらに尾芽の SN 前駆体区画内にも DsRed 陽性細胞が局在した (Fig. 10G, H)。一方で Sox2 阻害胚では、Sox2 阻害細胞が神経管近傍に検出されたものの、それらは決して神経管に取り込まれることなく凝集体として存在していた (Fig. 10L, M)。尾芽内の SN 前駆体区画においては、Sox2 阻害細胞は全く検出されなかった (Fig. 10N, O)。Sox2 阻害細胞は中胚葉組織内にも検出されなかったことから、中胚葉への分化転換が起こった可能性は低いと思われる (Fig. 10L, M)。SN 前駆体区画からの Sox2 阻害細胞の消失については、DsRed のタンパク質構造による発色時間の遅れにより、切断 Caspase3 を指標にした蛍光免疫染色解析が困難であったため断定はできないが、Fig. 5 及び Fig. 6 の Sox2 タンパク質の局在パターンから、SN 前駆体は通常は Sox2 を発現する細胞であり、その Sox2 が抑制されたことによって異常細胞として細胞死を起こして、その結果として SN 前駆体区画から排除された可能性が考えられる (Fig. 10 N, O)。Sox3-HMG-EnR を発現していない EGFP 単独発現細胞は、コントロール細胞と同様の分布を示した (Fig. 10E-H, L-O)。これらの観察結果をまとめると、前方の SN 前駆体における高レベルの Sox2 は神経上皮細胞への分化にとって必要であり、一方で後方の自己増殖性 SN 前駆体における低レベルの Sox2 活性は、それらの細胞の生存と維持に重要な役割をもつことが示された。

Sox3-HMG-EnR 強制発現は、Dox 投与時点ですでに上皮化していた前方の secondary neural tube の細胞には有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 10P; n=7)。このことから、Sox3-HMG-EnR 発現細胞の消失は、尾芽における間充織性の SN 前駆体に特異的な効果であると考えられる。

SN 前駆体は体軸伸長後期において神経系と中胚葉系細胞を生み出す

最後に、「初期」尾芽では uni-fated SN 前駆体として認識された細胞群が、「後期」にどのような挙動を示すのかを解析するために、SN 前駆体 EGFP 標識個体を 4 日目胚 (HH19) まで発生させた。これまでに繰り返し述べてきたように、2 日目胚 HH14 (23ss) で神経管と SN 前駆体のみが EGFP 標識された個体 (Fig. 11A, B) は、Fig. 2C, D と同様に 3 日目胚 HH16 においても神経管と SN 前駆体区画でのみ EGFP 標識細胞を認めることができた (Fig. 11C, D)。ところが驚くべきことに、4 日目胚 (HH19) の伸長した尾部内において、EGFP 標識細胞が神経管や SN 前駆体区画のみならず、神経管側方の沿軸中胚葉内にも認められた (Fig. 11E-G; n=8)。これらの中胚葉細胞は、成長した尾部の後方部にのみ分布していた。このような中胚葉性の細胞は、過去に報告されていた NMPs の細胞挙動と酷似している (McGrew et al., 2008; Olivera-Martinez et al., 2012)。これがすべての SN 前駆細胞の運命転換によるものか、一部の SN 前駆体から中胚葉が生じたのかは、現段階では不明である。 β -catenin の蛍光免疫染色の結果から、尾芽の間充織組織の中でも、後方 SN 前駆体及び中胚葉区画において、中胚葉化因子として知られるカノニカル Wnt シグナルが受容されていることが観察された (Fig. 12)。このことから、HH17 より後期の尾芽では、カノニカル Wnt シグナルのバランスが大きく変動した結果として SN 前駆体の細胞運命がスイッチした可能性が予測されるが、現時点では断定することはできない。しかしながら、初期段階では神経系のみの特化していた uni-fated SN 前駆体の運命が、最終的に神経系と中胚葉の両方を産生する bi-fated に切り替わるという、全く新しい発見の意義は高いと考える。

考察

本研究によって、ニワトリ胚 HH8 の菱形エピブラストの詳細な予定運命地図が作成された。発生 2 日目の初期段階の尾芽においては、神経系に運命が限定された SN 前駆体 (uni-fated SN) が、尾芽間充織細胞の前側半分を占めていた。また 3 日目胚 HH17 以後になると、これらの uni-fated SN 前駆体が、神経系と中胚葉系の両方を生み出す bi-fated なものへと変化するという示された (Fig.13A)。

ニワトリ胚「初期」尾芽の前方領域は uni-fated SN 前駆細胞で占められる

本研究の細胞系譜追跡実験から、ニワトリ胚発生 2 日目の「初期」尾芽内前方には、神経系に予定運命づけられた SN 前駆体 (uni-fated SN) が位置し、その後方には中胚葉の運命をもつ前駆細胞が位置することが示された。尾芽前方の神経系の予定運命細胞の集団は、さらに前方と後方で性質の異なる 2 つの集団に分けられる。前方には分化段階の進んだ神経系の細胞集団が、後方にはより未分化で自己増殖能をもつ SN 前駆体集団が位置する。つまり、尾芽全体を眺めると、前方から、神経分化の進んだ SN 前駆体、分化度の低い SN 前駆体、そして中胚葉前駆細胞の順に細胞が分布する。導入で述べたように、これまでは尾芽の中央には神経系と中胚葉系の共通の幹細胞である NMPs が存在し、この NMPs から前方に神経細胞が、後方に中胚葉細胞が供給されるという説が提唱されてきた (この場合、前方から SN 前駆体、NMPs、中胚葉の並びとなる)。つまり、尾芽内の分化度の進んだ細胞が、尾芽中央に位置する共通の幹細胞から生み出されるのか、それとも神経系及び中胚葉系に運命づけられた前駆細胞が独自にそれぞれの系譜の細胞を生み出すのかが、この研究分野の大きな未解決課題であった。本論文では、ニワトリ胚の利点を活かした同所性継代移植実験を行うことで、これらの課題に一定の解決をもたらすことができた (Fig. 3A-H)。EGFP によって標識された SN 前駆体を他の胚 (ホスト胚) に移植したところ、移植細胞は、尾芽内に間充織の状態で留まりつつ、神経管に細胞を供給したのである。重要なことは、これらの細胞は自己増殖しつつ神経管の細胞

を供給するが、中胚葉細胞は生み出さないということである。つまり、少なくともニワトリ 2~3 日目胚において、尾芽の中央に位置する細胞集団は NMPs ではなく、自己増殖性の uni-fated SN 前駆細胞であることを実証することに成功した。

SN 前駆体の神経分化は Sox2 の発現レベルによって制御される

本研究では、自己増殖能を有する SN 前駆体と、神経上皮細胞への分化が運命づけられた 2 種類の SN 前駆体が存在することを明らかにした。そしてこれら 2 種類の細胞集団の形質が、Sox2 の発現レベルによって制御されていることがわかった。SN 前駆体領域内の、分化度の低い自己増殖性の SN 前駆体（後方）とより分化した SN 前駆体（前方）は、それぞれ低レベル（後方）と高レベル（前方）の Sox2 を発現する。時空間的に遺伝子発現をコントロールできる Tet オン・オフシステムを用いることによって、高レベルの Sox2 は神経分化を促す一方で、低レベルの Sox2 は自己増殖性 SN 前駆体の維持と生存に重要であることを実証することができた (Fig. 13B)。これまでに神経発生における Sox2 の役割は、PN において良く解析されており、関連する通常の神経発生、幹細胞の多能性、そして神経前駆細胞の生存にも関連することが報告されている (Feng et al., 2013; Hagey and Muhr, 2014; Hutton and Pevny, 2011; Kondoh, 2016)。また低レベルの Sox2 が、成体脳における神経幹細胞のニッチ制御に重要であることも興味深い (Hagey and Muhr, 2014)。本研究で見出した、Sox2 が SN 神経分化を正に制御するという事実は、理にかなっているといえる。

SN 前駆体領域における Sox2 の発現レベルは、どのような分子により制御されるのだろうか。これまでに、BMP4 阻害機能をもつ Noggin の投与により、SN 前駆細胞内（特に菱形エピブラスト）の Sox2 の発現が上昇することが報告されている (Takemoto et al., 2006)。このことから、尾芽における Sox2 の発現の制御は、周辺組織における BMPs が関与する可能性が考えられる (Takemoto et al., 2006)。一方、SN 前駆細胞の後方には、幹細胞性シグナル因子 (FGFs や Wnts など)も発現している。これまでに、初期尾芽 (HH14)において、SN 前

駆体の近傍に、自己増殖性の uni-fated 中胚葉細胞が存在するという報告もあり (Garriock et al., 2015; Iimura and Pourquie, 2006) (Fig. 1)、これらの幹細胞性シグナル因子が uni-fated 中胚葉細胞を制御することが示唆されている。本研究において、カノニカル Wnt シグナルの活性化を、 β -catenin の核局在を指標にして観察した結果、自己増殖性の SN 前駆体において Wnt シグナルの活性化が観察された (Fig. 12)。これらのことから、Wnt や BMP4 などのシグナル因子が、SN 前駆体における Sox2 発現の制御に関わる可能性が考えられ、今後の解析に期待がかかる。

Uni-fated SN 前駆体から bi-fated 細胞への転換

発生が進むにつれて、uni-fated であった SN 前駆体が、神経系と中胚葉系の両方を産生する bi-fated 細胞へと切り替わるという、全く予期していない観察結果を得た。この発見は、過去の HH17 以降の bi-fated な NMPs の知見と、本研究による HH17 までの uni-fated SN 前駆体の間の矛盾を解消しうるものである (McGrew et al., 2008; Olivera-Martinez et al., 2012)。これまでの NMPs に関する多くの報告では、解析対象とする胚が HH19 以降に限られていた。そのため、尾芽には神経系の前駆細胞はほとんど存在せず、NMPs がこそが体軸伸長を支える細胞の供給源であるという主張がなされていた。しかしながら、本研究の解析結果を踏まえると、HH19 以降は SN 前駆体の細胞運命が uni-fated から NMP 様の bi-fated に切り替わった後のステージであり、実際には体軸伸長の前半では、uni-fated な SN 前駆体と uni-fated な中胚葉前駆細胞が独立してはたらくというシナリオがみえてきた。現段階では、SN 前駆体の細胞運命スイッチの引き金のしくみは不明である。しかしこの運命スイッチが、尾部の構造が劇的に変化する HH17 付近で起こることを考えると、尾部の構造変化によって、すでに SN 前駆体で活性化されている中胚葉化因子カノニカル Wnt シグナル (β -catenin の核局在によって検出)の増強が引き起こされた可能性が考えられる (Fig. 12)。というのも、カノニカル Wnt シグナルは、先述した未分化能の維持という働きに加えて、中胚葉への分化促進活性があるという報告があるか

らである (Garriock et al., 2015; Gouti et al., 2017; Gouti et al., 2014; Henrique et al., 2015; Koch et al., 2017; Martin and Kimelman, 2012; Row et al., 2016)。

Sox2 と Bra の共発現は一般的な NMPs マーカーにはならない

本研究では、初期尾芽の uni-fated SN 前駆体のほとんどが Sox2 と Bra を共発現することを示したが (Fig. 5)、これは Sox2/Bra が NMPs のマーカーであるというこれまでの通説とは矛盾する。注目すべきことに、Sox2 と Bra を共発現する「非 NMP」の存在が、近年報告され始めてきた (Gouti et al., 2017; Koch et al., 2017; Wymeersch et al., 2016)。従って、実際の胚体内においては、Sox2 と Bra の共発現が必ずしも NMP マーカーとなるとは限らない。また本研究で得られた解析結果は、Sox2 と Bra の共発現細胞が周辺からの外因性シグナルによって、容易に運命変化を起こすポテンシャルをもつ細胞である可能性を否定するものではなく、この点については現在解析中である。本研究では、NMPs という用語を、実際の胚体内において「神経系と中胚葉系を共に生み出す前駆細胞」と定義しており、培養環境などに移した際に「多分化能」を示す細胞という意味では使用していない。もし細胞がもつ分化能についてアプローチするのであれば、これらの細胞を本来の局在位置とは別の環境に移植したときの分化の様子を解析するなどの実験が必要である。

体軸伸長の多様性

マウス初期胚を利用した解析から、初期胚の NMP 産生領域は非常に限定的であり、ノード (トリ胚のヘンゼン結節に相当) の後方に隣接する原条のごく一部分に限られることが示されている (Cambray and Wilson, 2002, 2007; Wymeersch et al., 2016)。マウス胚の原条は、体軸伸長のかなり後期まで残存して NMPs を産生し続けることで、長い尾の形成が可能となる。しかしながら、このような形質はマウスに特有のものであり、ニワトリ胚にはみられない。ニワトリ胚では比較的初期に原条の退縮が終了するため、原条からの細胞の浸潤

も早い時期に終了する。このためニワトリ胚では、初期に原条から生まれた自己増殖性細胞を尾芽に保持しておくことで、原条からの細胞供給が途絶えた後も体軸伸長に必要な分化細胞を供給することが可能になると考えられる。

本研究では、マウスとニワトリにおけるこれらの違いを、細胞エビデンスとして示したという点でも意義深い。ニワトリ胚では SN 前駆体が **uni-fated** として存在する期間が、マウスのそれに比べて長期間に渡る。ニワトリ胚 SN 前駆体の細胞集団は、HH8 菱形エピブラスト内で特殊化した **preSN** 領域に由来するが (Fig. 1)、マウス胚ではこのような領域は存在しないとされてきた。しかしながら、最近の報告で **NMP** 産生性原条の前方部分は中胚葉系細胞より神経系細胞を生み出しやすい傾向にあることが示唆されている (Wymeersch et al., 2016)。従って、マウス胚においても **preSN** 様のエピブラストが存在するものの、その存在はニワトリ胚と比べて時空間的に非常に限定的なのかもしれない。興味深いことに、ヒト胚における体軸伸長の様式は、マウス胚よりもニワトリ胚に類似しており、菱形エピブラストの早期の消失や尾芽の形状にニワトリ胚との共通点が見られることが示されている (Dady et al., 2014; O'Rahilly and Muller, 1989; Saitsu et al., 2004)。そのため、本研究によって示された自己増殖性 SN 前駆体についての知見は、ニワトリ特異的な現象ではなく、脊椎動物の尾芽と体軸伸長様式の多様性を紐解く上で大きな足掛かりとなると考えられる。SN 不全は、下半身の神経ネットワークの形成異常だけでなく、尾側二分脊椎症 *spina bifida* を含めたさまざまな疾患の原因ともなる。本研究の知見が、新たな医療処置の足掛かりとなることが期待される。

図 表

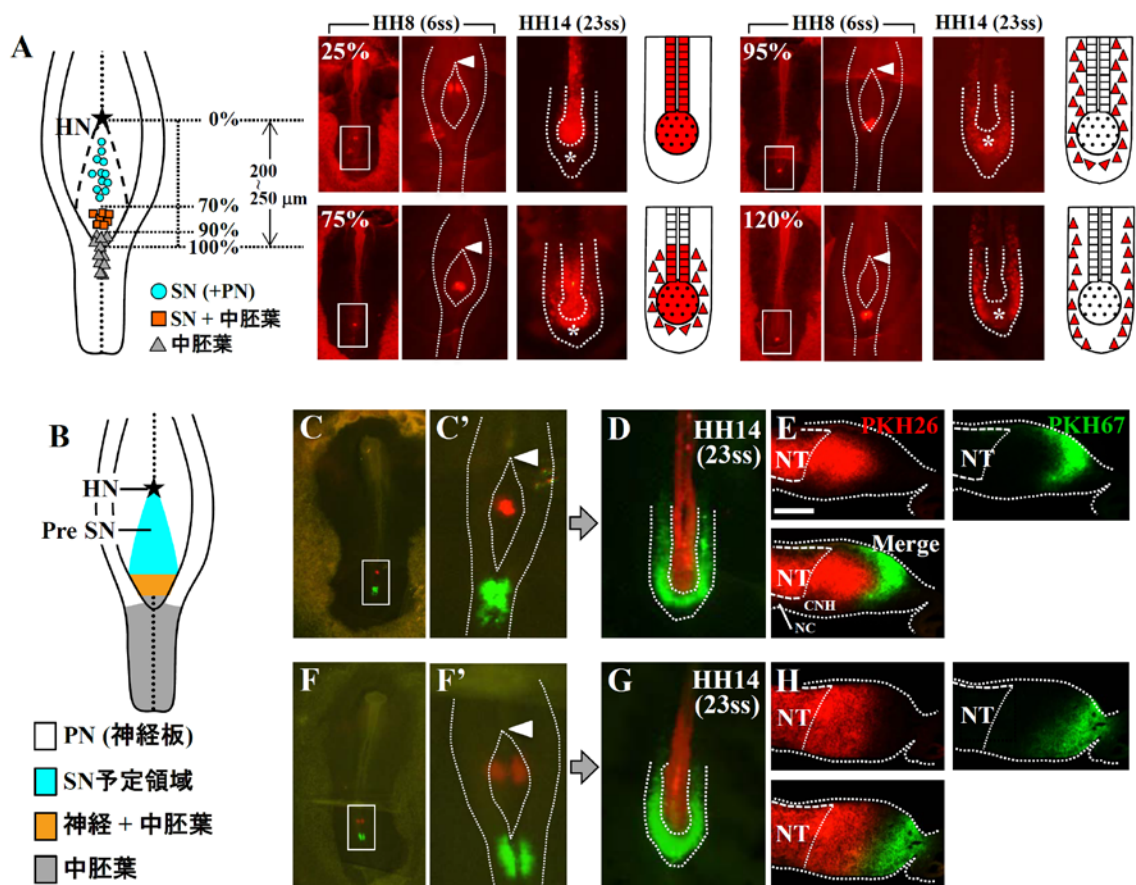


Fig. 1 ニワトリ胚 HH8 (6ss)の菱形エピブラストの予定運命地図

(A) HH8 (6ss)における菱形エピブラストと原条の前方端のPKH標識と細胞追跡実験。模式図のヘンゼン結節と原条の前方端をそれぞれ0%と100%と定義し、PKH標識の相対的な位置を表示する。PKHによる標識は模式図上の異なる75箇所（一部省略）を頭尾軸に沿って標識し、それらの子孫細胞の位置をHH14 (23ss)にて評価する。写真はPKH標識直後とHH14 (23ss)の胚の背側からの観察結果を表示。右写真はそのうちの4つの代表的な子孫細胞の分布パターン。

(B)新たに作成されたHH8 (6ss)の菱形エピブラストの予定運命地図。

(C, F) 同一個体における PKH 多重標識個体の実例 2 個体の背側写真、(C', F') C および F 画像内の四角枠の拡大写真。白矢じりはヘンゼン結節の位置を表示。

(D, G) HH14 (23ss) における、PKH26 (赤色: preSN 由来)と PKH67 (緑色: 原

条頭部端由来)標識細胞の背面からの観察写真と (E, H)正中切片。正中切片は (E)が胚体の正中軸上、(H)が胚体の正中軸や側方の切片を表示。上皮化した神経管(NT)は破線で辺縁部を表示。

HN: ヘンゼン結節、Pre SN: SN 予定領域、NT: 神経管、CNH: Chord-neural hinge、NC: 脊索、*: 尾芽内の中胚葉領域、スケールバー: 100 μm 。

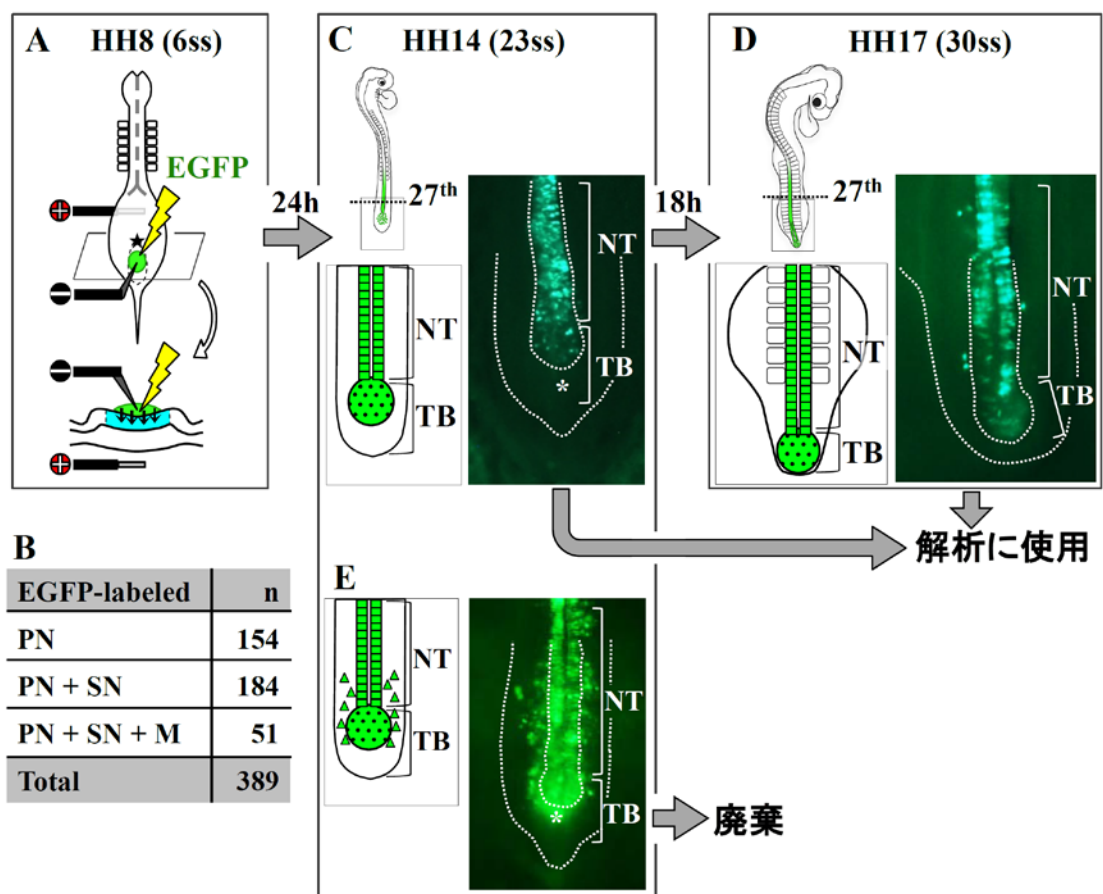


Fig. 2 Uni-fated SN 前駆体特異的な遺伝子導入

(A) 菱形エピブラストへの *in ovo* エレクトロポレーション法。

(B) 菱形エピブラスト内の preSN を標的として合計 389 胚の EGFP 陽性細胞の追跡を行った結果、得られた標識パターンの実数。

(C) HH14 (23ss) の時点で神経系細胞 (PN+SN) にのみ EGFP 陽性細胞が検出された場合、(D) HH17 (30ss) においてもそのシグナルは神経系組織にのみ限局する。のちの解析には、この標識パターンを利用する。

(E) 上記に対して、いくつかのエレクトロポレーション胚では神経系だけでなく中胚葉系にも EGFP のシグナルが見られる。それらは廃棄する。

NT: 神経管、TB: 尾芽、*: 尾芽内の中胚葉領域(これらは HH14 では背側から観察できるが、HH17 では腹側に位置するため観察できない)

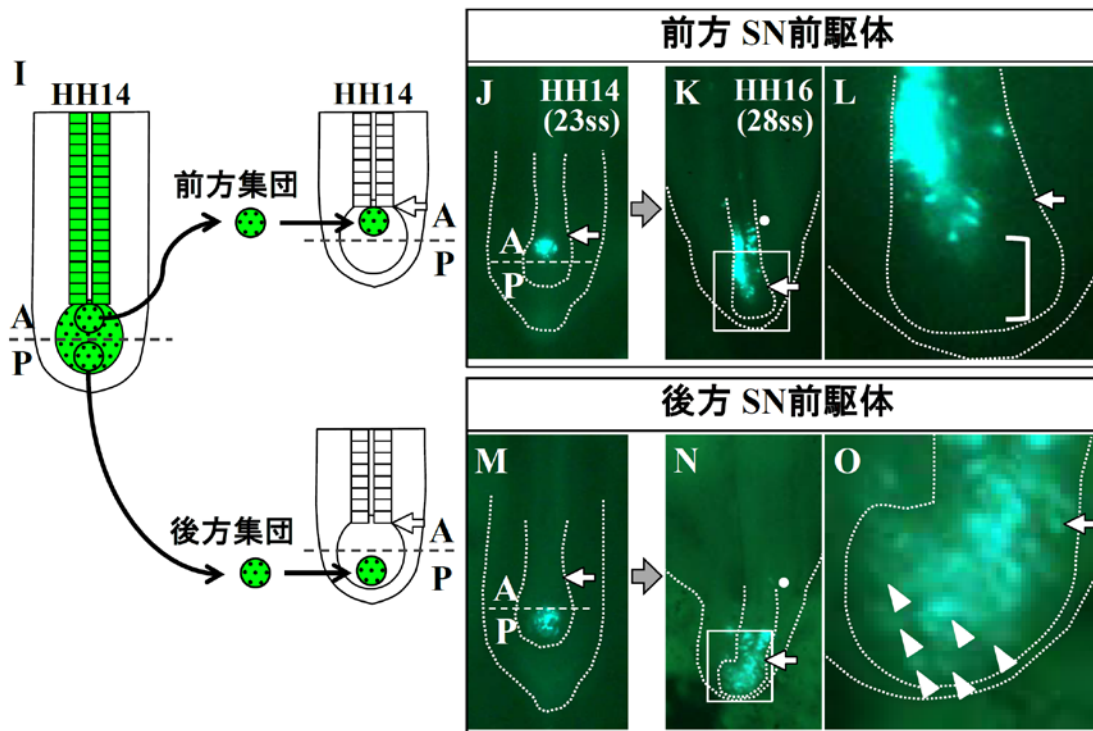
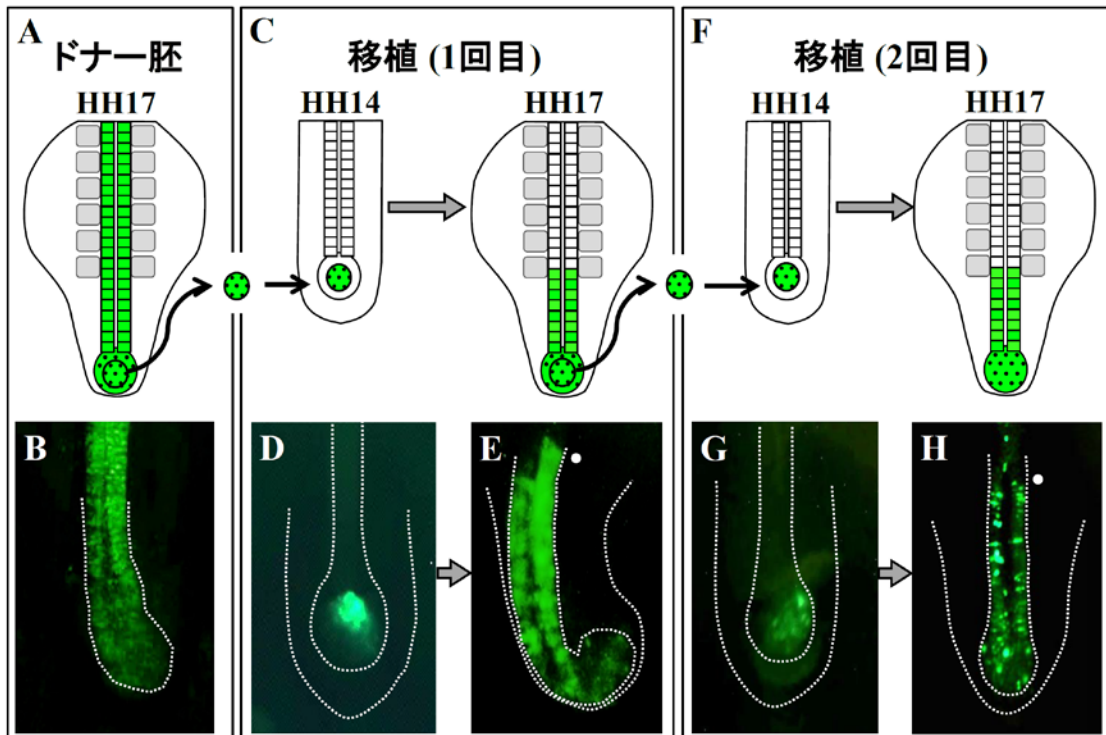


Fig. 3 Uni-fated SN 前駆体集団は幹細胞様前駆細胞集団である

(A-D) EGFP 陽性 uni-fated SN 前駆体を HH17 胚の尾芽から摘出し、HH14 胚の尾芽内の同じ SN 前駆体領域に移植する。

(E-H) ホスト胚が HH17 まで発生した時点で、同様の移植を繰り返す。

(I) EGFP 陽性 SN 前駆体領域を前後に二分し、それぞれの細胞塊を HH14 ホスト胚に同所性移植を行う。A: anterior, P: posterior.

(J-L)前方の SN 前駆体は神経管へ分化するが尾芽（白かご）には残らない。

(M-O)後方の SN 前駆体は神経管分化を起こすだけでなく、間充織細胞として尾芽に残る（白矢じり）。

白点は第 31~33 番体節の位置を表示。白矢印は上皮化した神経管と尾芽の間充織性 SN 前駆体の境界部分を表示。

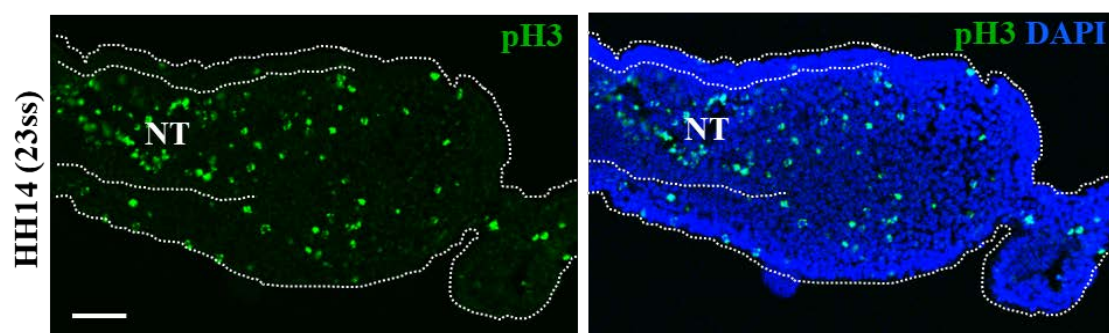


Fig. 4 SN 前駆体は一様に増殖活性を示す

SN 前駆体の細胞増殖頻度において神経管分化集団と自己増殖性集団の間で顕著な差は見られない。

NT: 神経管、スケールバー: 50 μm 。

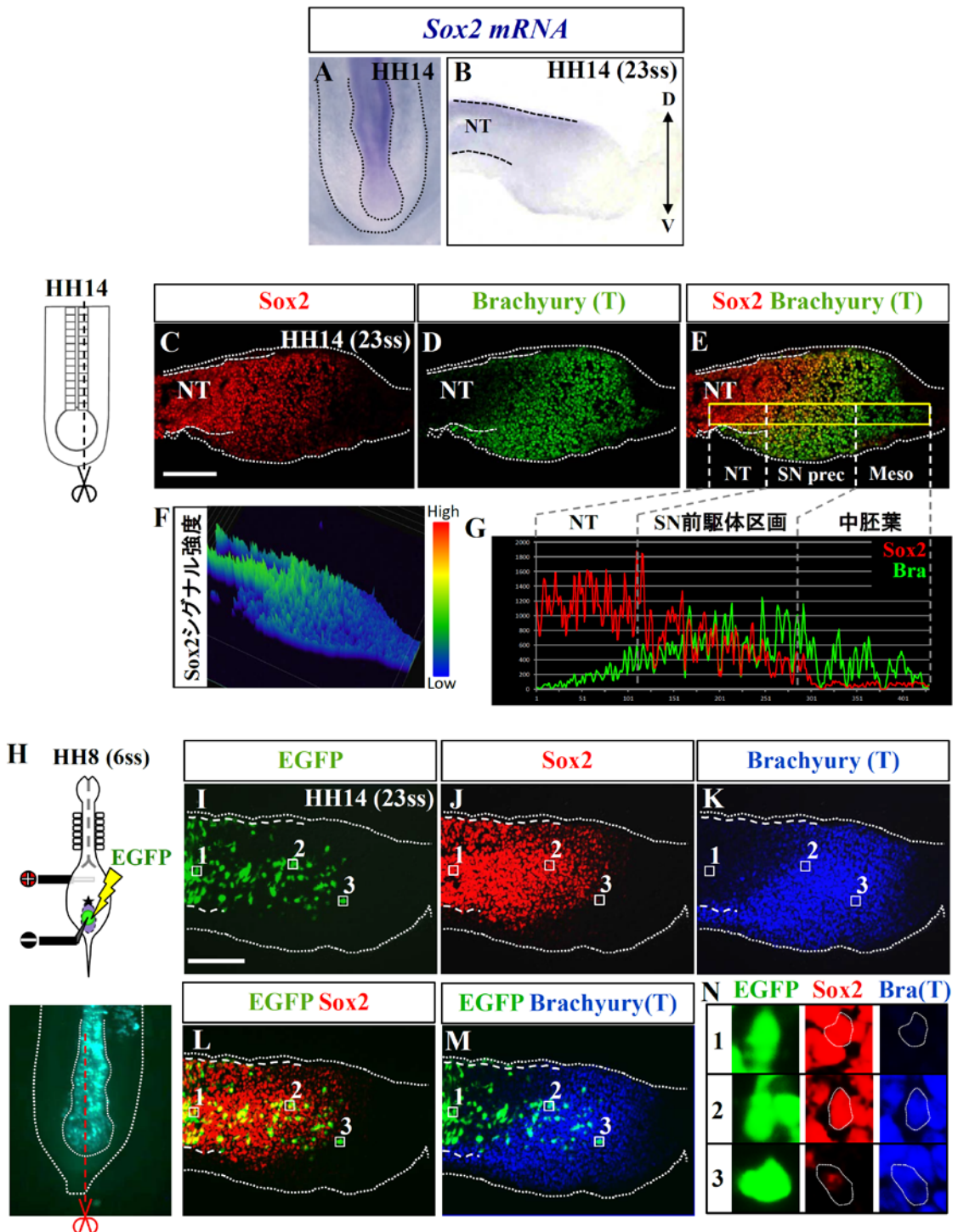


Fig. 5 HH14 SN 前駆体における Sox2 と Bra のシグナル強度の解析
 (A) *sox2* mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーションの背側および (B) 正中切片に

よる観察結果。

(C-E) 正中線付近の正中切片における Sox2 および Brachyury (T)の蛍光免疫組織染色。

(F, G) SN 前駆体領域後方での Sox2 のシグナルの強度を定量的に提示する。

(H-N) Sox2⁺/Bra⁺細胞は EGFP 標識 Uni-fated SN 細胞と重なる。

(N) 異なる 3 か所(NT、尾芽内 Uni-fated SN 領域の前方および後方)の単一細胞での EGFP、Sox2、および Bra のシグナル評価。

NT: 神経管、SN prec: SN 前駆体区画、Meso: 中胚葉、スケールバー: 100 μ m

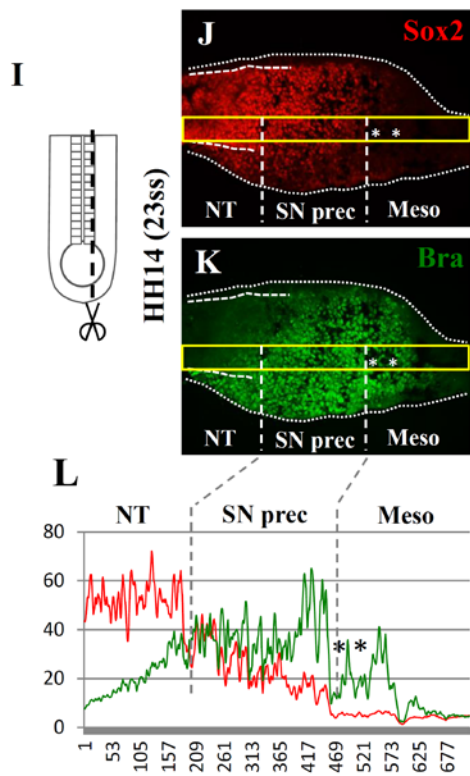
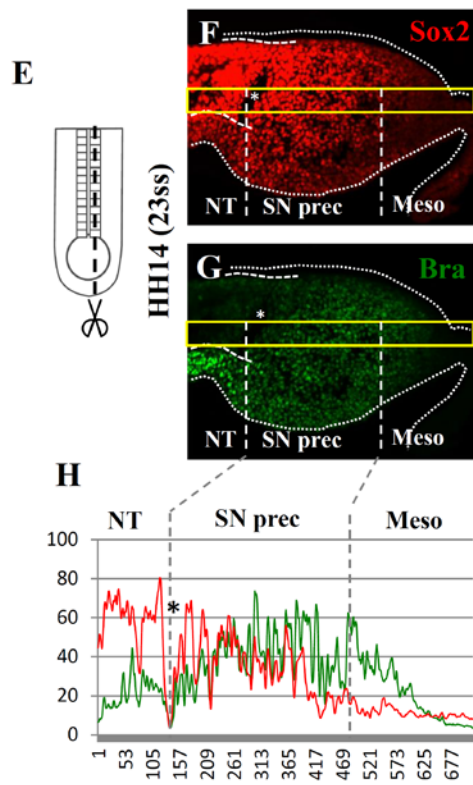
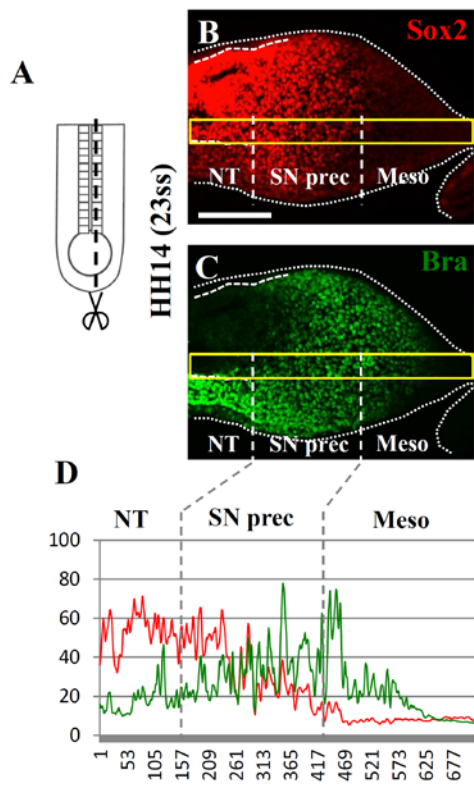


Fig. 6 追加 3 個体の Fig. 3 と同様の蛍光免疫組織解析

(A, E, I)HH14 ニワトリ胚の正中切片作成位置の模式図。

(B, F, J)Sox2 の蛍光免疫組織染色。

(C, G, K)Bra の蛍光免疫組織染色。

(D, H, L)蛍光免疫組織染色写真内の黄色四角枠領域における Sox2 及び Bra のシグナル強度の定量化グラフ。

NT: 神経管、SN prec: SN 前駆体区画、Meso: 中胚葉、*: 切片作成時の割れ目、
スケールバー: 100 μm

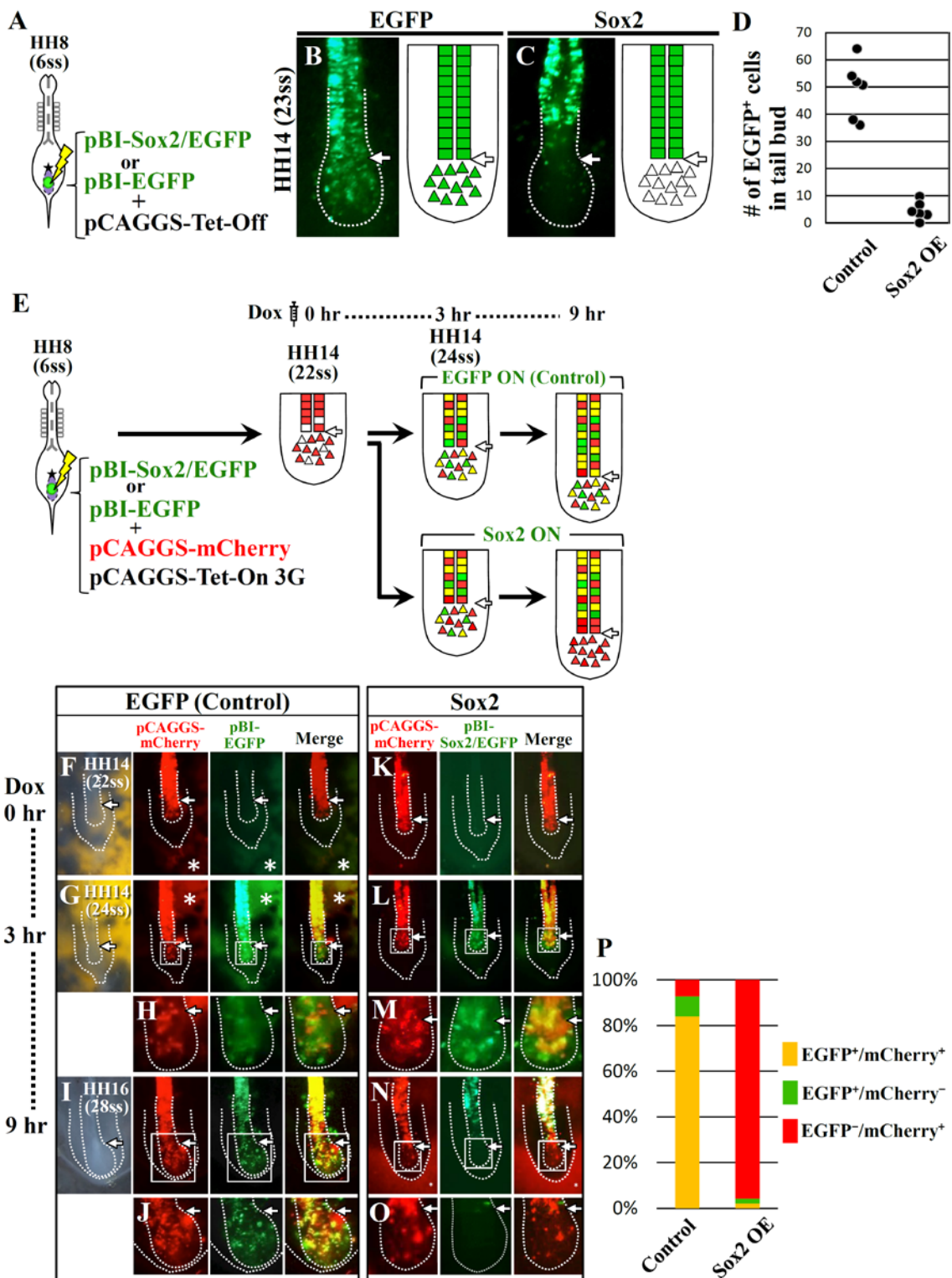


Fig. 7 Sox2 の上昇は SN 前駆体の早期の神経分化を促す

(A) Sox2 遺伝子を HH8 の preSN 領域にエレクトロポレーションし、EGFP 陽性細胞が Fig. 2C のように (本 Figure においては非表示) uni-fated SN 前駆体のみ検出された胚を選択的に追跡する。表示されたプラスミドの組み合わせは、恒常的に遺伝子を発現させるものであり、Dox を投与するまでは発現は抑制されない。

(B-D) Sox2 過剰発現細胞は早期に神経管へ参入し、尾芽へは残らない。

(E) Tet-on システムを用いたエレクトロポレーションされた Sox2 の Dox 依存的な時間的発現上昇の制御。エレクトロポレーションされた胚が HH14 になり、形成された初期の尾芽に遺伝子導入細胞が現れた時点で、Dox 溶液を投与する (0 時間) (F, K)。

(G, H, L, M) Dox 投与後 3 時間でコントロール胚、Sox2 過剰発現胚ともに 3 タイプ(緑色 (EGFP)、赤色 (mCherry)、黄色 (EGFP と mCherry))の細胞が尾芽内で観察される。詳細は本文を参照。

(I, J, N, O) Dox投与後9時間の段階で、Sox2過剰発現細胞は神経管のみに検出され、尾芽では見られない。尾芽に認められる赤色 (mCherry)細胞はmCherry遺伝子のみがエレクトロポレーションされており Sox2/EGFPは含まれていない。

(P)Dox投与後9時間の段階の尾芽に含まれる遺伝子導入された細胞の内の3タイプの細胞の割合。

プラスミド濃度: (A) pCAGGS-Tet-Off 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、pBI-EGFPまたは pBI-Sox2/EGFP 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; (E) pCAGGS-Tet-On3G 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、pBI-EGFPまたは pBI-Sox2/EGFP 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、pCAGGS-mCherry 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。白矢印についてはFig. 3 の説明文を参照。*; 卵黄のバックグラウンド。

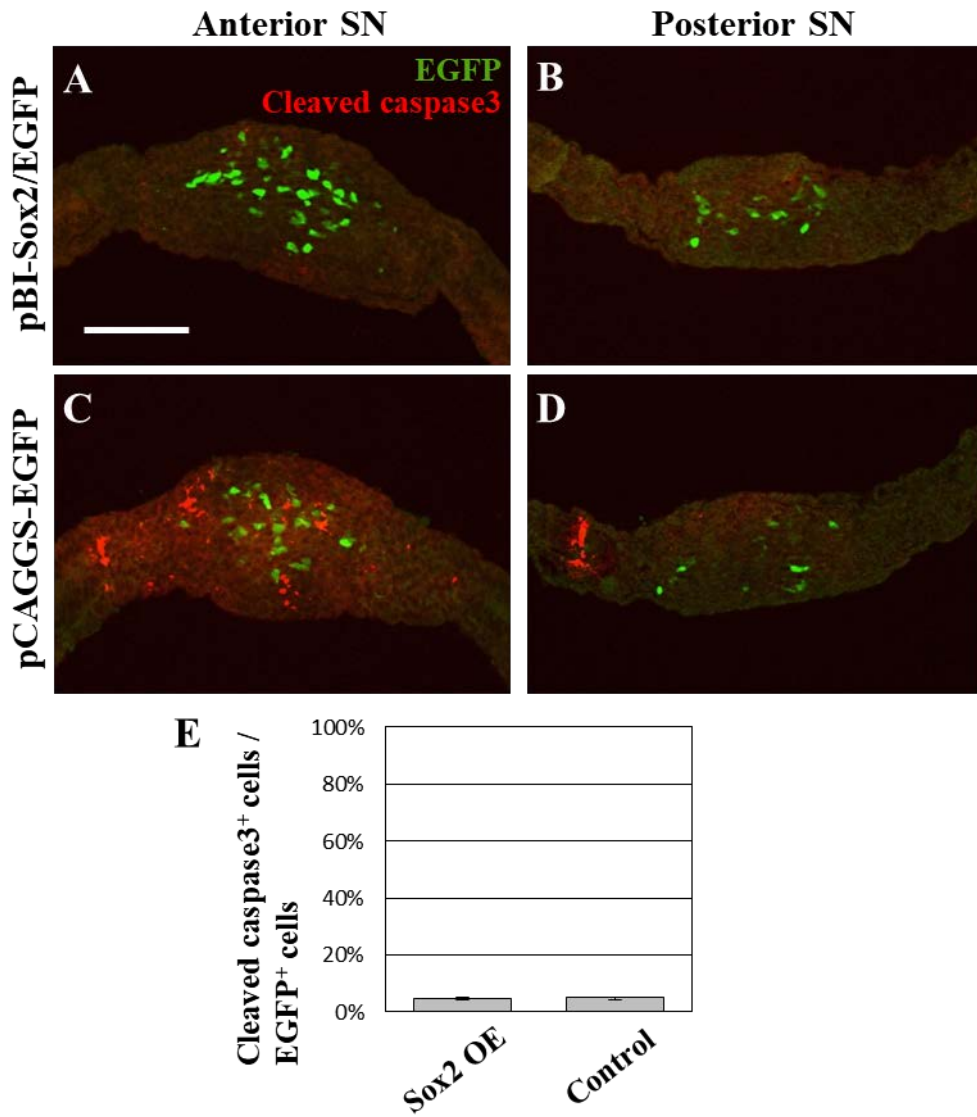


Fig. 8 Sox2 過剰発現胚の尾芽における切断 Caspase-3 の免疫組織観察

Fig. 7E から pCAGGS-mCherry を除いた実験。

(A-D) SN が起こる領域の前側と後側横断切片の抗 cleaved Caspase3 抗体染色。

(E) コントロール細胞と Sox2 過剰発現細胞間での細胞死数の比較

スケールバー: 100 μ m。

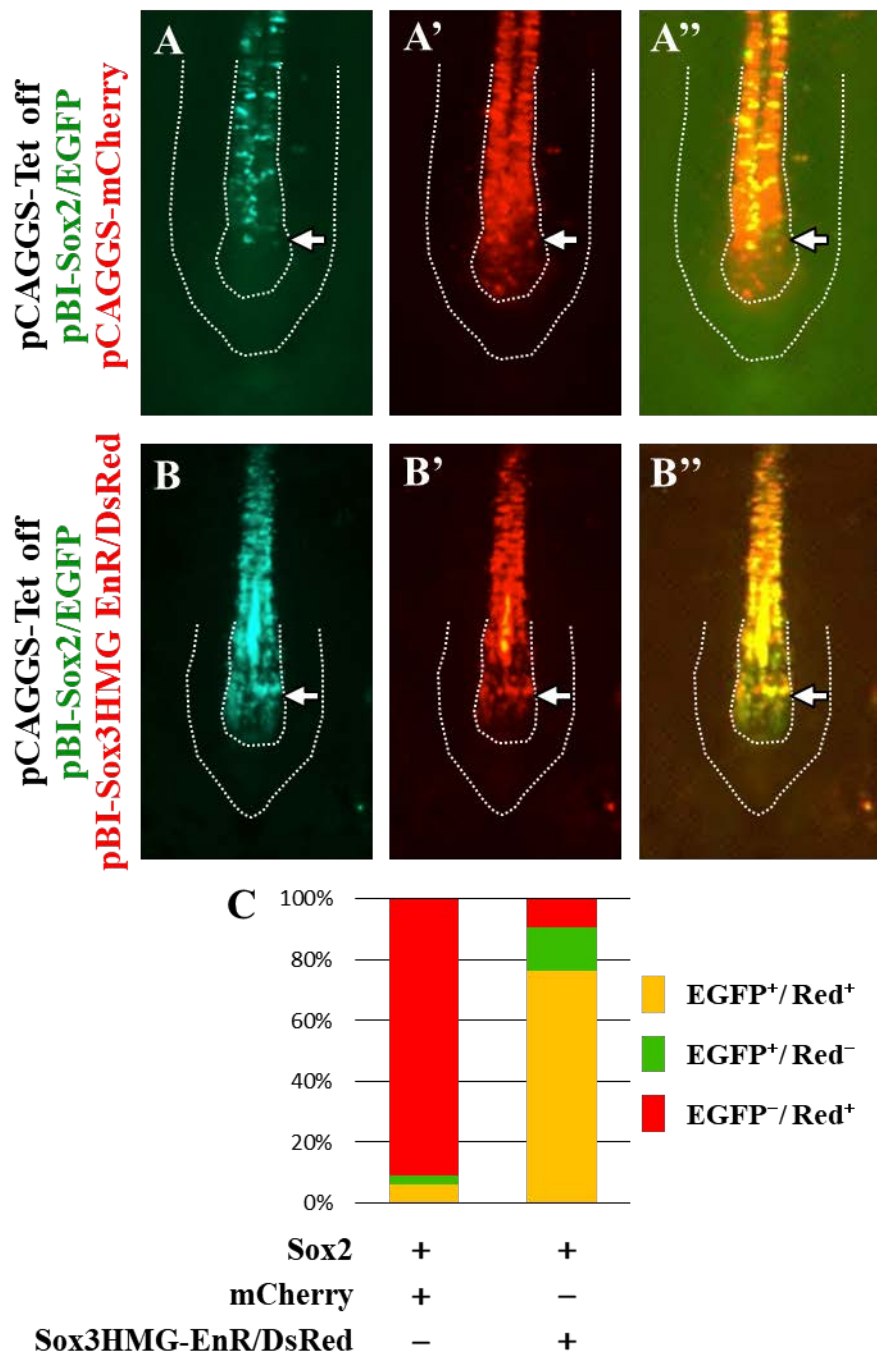


Fig. 9 Sox2 と Sox3-HMG-EnR の共発現は Sox2 によって誘引された影響を中和する

(A) Fig. 7E と同様の実験。

(B) Sox2 過剰発現細胞における神経管への早期の参入が Sox3HMG-EnR の共発現によって打ち消される。

(C) それぞれの遺伝子導入細胞の尾芽における局在数の定量化。

エレクトロポレーションされたプラスミド濃度: pCAGGS-Tet-Off; 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,
pBI-Sox3HMG-EnR/DeRed または pCAGGS-mCherry; 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,
pBI-Sox2/EGFP; 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。白矢印は Fig. 3 の説明を参照。

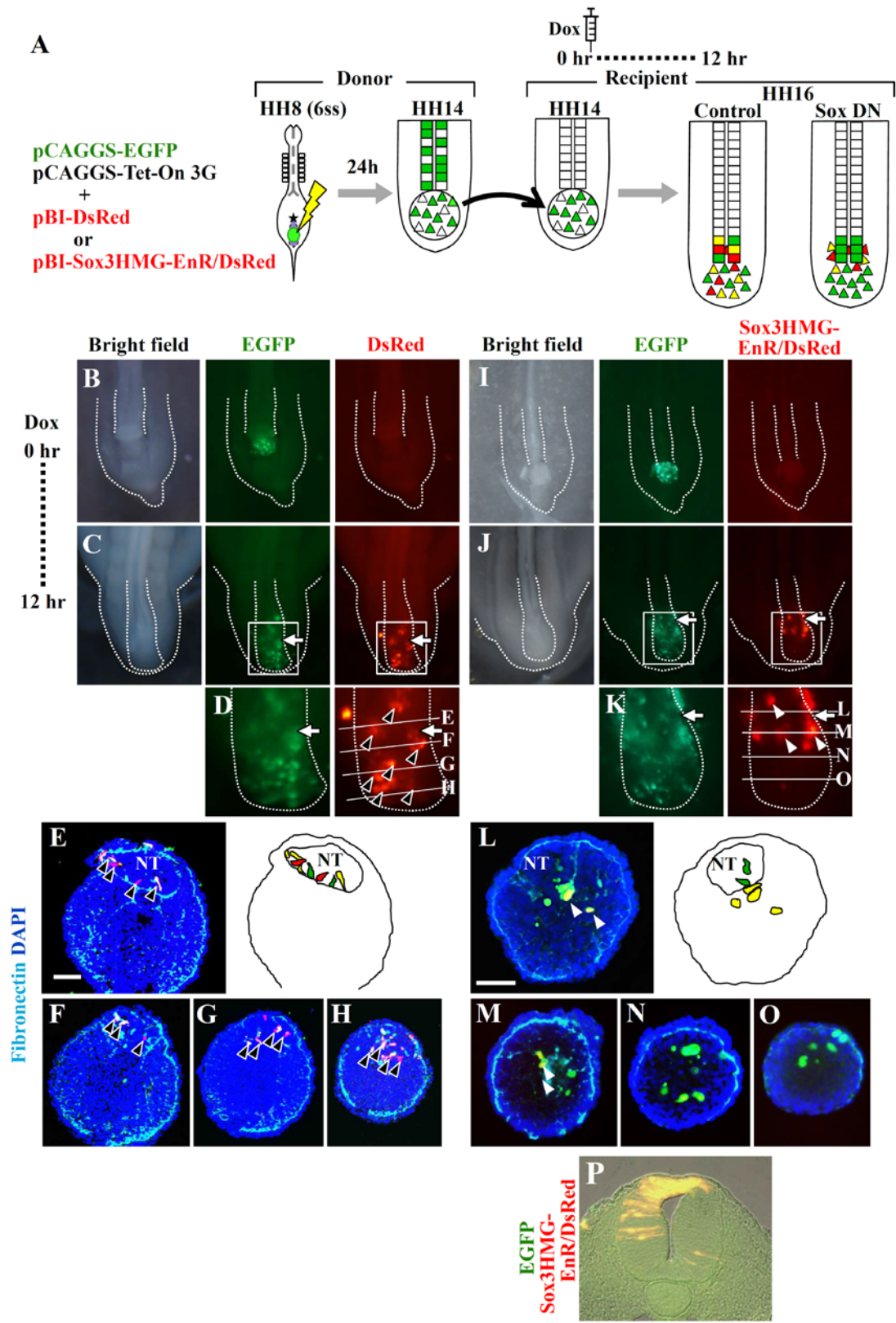


Fig. 10 Sox2 シグナル欠失 SN 前駆体は secondary neurulation への参入不全を起こす

(A) Fig. 7E と同様の方法で Sox3HMG-EnR を *in ovo* エレクトロポレーションし tet-on によって発現を誘導する。加えて、本解析では SN 前駆体の同所性移植を行い、移植された遺伝子導入 SN 前駆体を宿主胚尾芽内で追跡する。

(B, D) 移植直後 (0 時間)において、Sox3HMG-EnR 発現のシグナル (同時に DsRed を発現)はまだ検出されない。

(C, D) Dox 投与から 12 時間経過時において、コントロール胚では EGFP と Dox 依存的な DsRed 陽性 SN 前駆体(黒矢じり)が Secondary neural tube と尾芽に共局在する。

(J,K) Sox2 シグナル阻害胚において、Sox3HMG-EnR/DsRed 発現 SN 前駆体 (赤色; 白矢じり)数は EGFP 単独発現細胞と比べ少なく、Secondary neural tube への取り込みも失敗する。

(E-H, L-O) 横断切片においてもまた Sox2 シグナル阻害細胞が Secondary neural tube と尾芽の SN 前駆体領域後方領域に存在しないことが認められる。

(P) すでに上皮化した神経管では Sox3HMG-EnR エレクトロポレーションによる影響は認められない。

エレクトロポレーションされたプラスミド濃度: pCAGGS-Tet-On 3G; 1.5 µg/µl、pBI-DsRedまたはpBI-Sox3HMG-EnR/DsRed; 8 µg/µl, and pCAGGS-EGFP; 2.5 µg/µl。白矢印についてはFig. 3の説明文を参照。スケールバー: 50 µm。

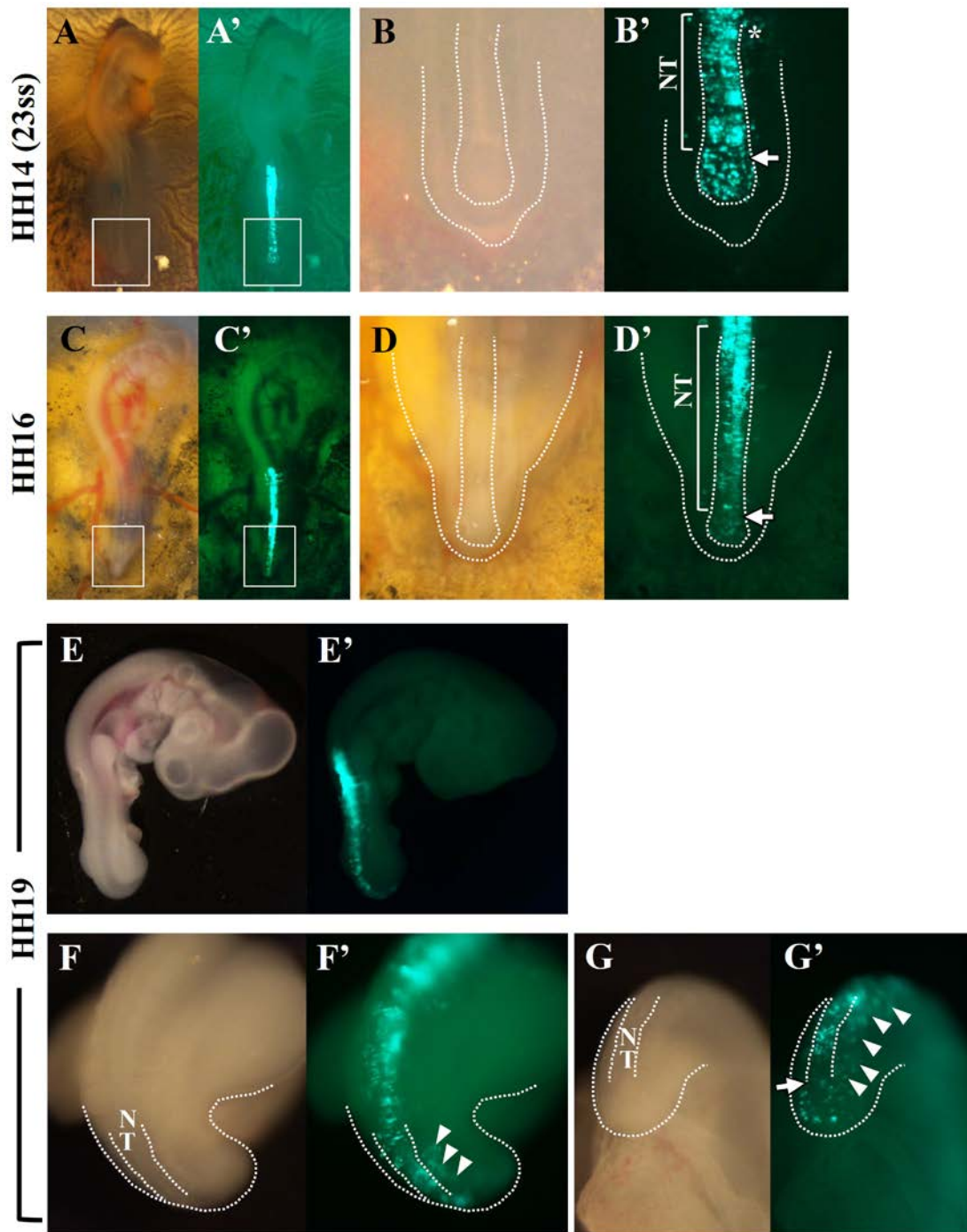


Fig. 11 Uni-fated SN 前駆体は後期ステージにおいて神経系と共に中胚葉系も生み出す

単一ニワトリ胚におけるEGFP標識SN前駆体のHH19までの追跡。

(A-D) EGFP陽性細胞はHH14およびHH16においてSecondary neural tubeとSN前駆体に限局する。

(E-G) EGFP陽性細胞がSN系細胞に加えて中胚葉細胞 (矢じり)を産生し始める。

(F, G) 尾部の背側および腹側からの観察結果の拡大写真。

NT: 神経管、白矢印についてはFig. 3の説明文を参照。*; エレクトロポレーションの際に漏れだしたpCAGGS-EGFPによって標識された表皮細胞。

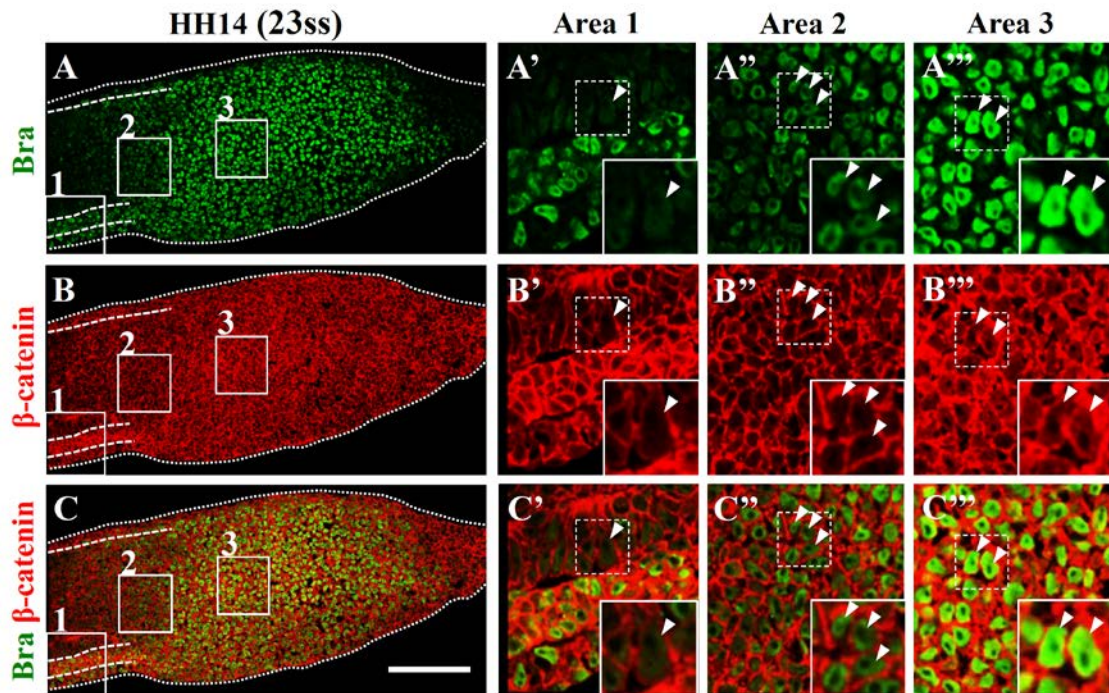


Fig. 12 Wnt シグナルの活性化と自己増殖性 SN 前駆体の一致

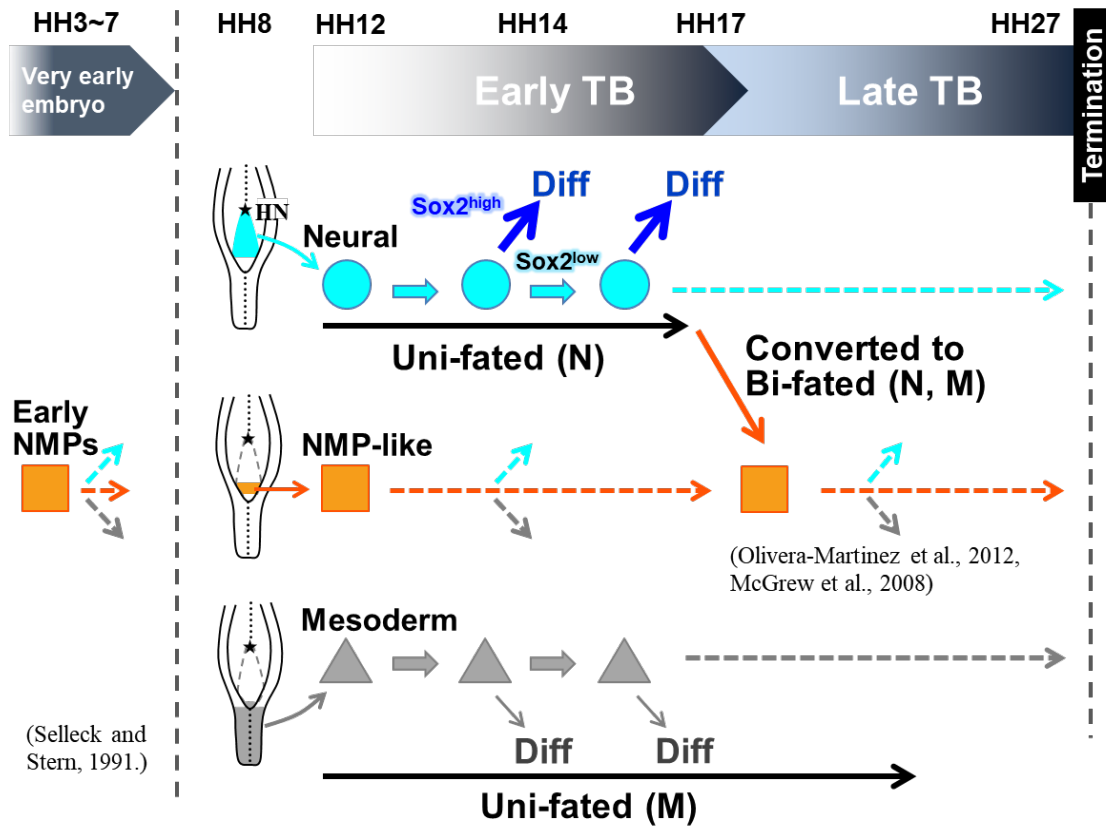
(A)HH14 尾芽の正中切片における抗 Bra 抗体染色

(B)HH14 尾芽の正中切片における抗β-catenin 抗体染色

(C) (A)と (B)の重ね合わせ写真。神経管 (Area 1)と前方 SN 前駆体領域 (Area 2)ではβ-catenin は細胞膜上に局在する (非活性)が、より後方の領域 (Area 3)ではβ-catenin の核局在(活性)が認められる。

矢じり: 細胞核、スケールバー: 100 μm。

A



B

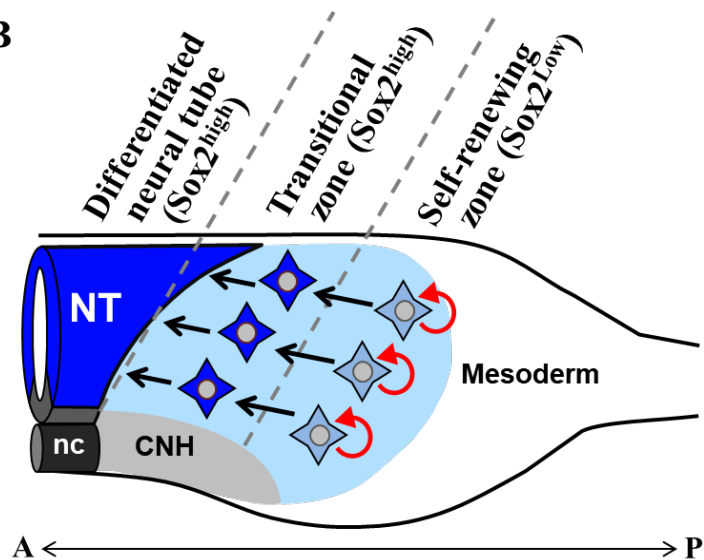


Fig. 13 Secondary neural tube 形成に関わる uni-fated SN 前駆体の起源と Sox2 による制御の要約図

(A) HH8においてヘンゼン結節後方に出現する菱形エピブラスト。菱形エピブラストの前方70%はuni-fatedなSN前駆体を生み出す神経系特異的な領域である (preSN; 青色)。その後方の30%から産生される細胞には中胚葉が含まれる (オレンジ色または灰色)。preSN 領域に由来するuni-fated SN前駆体は自己増殖性の集団であり、それには低レベルのSox2が重要である。また、Sox2の発現レベルの上昇は、SN前駆体を神経分化に向かわせる。過去の知見において、uni-fated な中胚葉前駆細胞の存在が報告されており (Garriock et al., 2015; Iimura and Pourquie, 2006)、神経系にも同様のuni-fated前駆細胞が存在することが示された。また、SN前駆体はHH17 まではuni-fatedであるのに対し、より後期ステージでは神経系に加え中胚葉系細胞も産出するbi-fatedな細胞集団になる。この運命転換の発見は、初期尾芽におけるuni-fated SN前駆体 (本研究成果)と過去の報告にある後期ステージのbi-fated細胞 (McGrew et al., 2008; Olivera-Martinez et al., 2012)との矛盾を解消しうるものである。より初期胚 (HH3-7)においては、NMPsがヘンゼン結節の近隣で発生することが報告されている (Selleck and Stern, 1991)が、NMPs出現領域がHH8の菱形エピブラストに存在するかどうかは不明である。

(B) HH14尾芽におけるuni-fated SN前駆体の空間的な制御。SNと中胚葉のuni-fated前駆体は前方と後方で空間的に分かれている。SN前駆体区画 (水色) はさらにSox2低レベルの自己増殖性細胞集団 (後方)と神経管分化に特化した過渡期のSox2高レベルの細胞集団 (前方)の2つに分かれる。

NT: 神経管、CNH: Chord-neural hinge、NC: 脊索

引用文献

Acloque, H., Ocana, O.H., Matheu, A., Rizzoti, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Nieto, M.A., 2011. Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. *Dev Cell* 21, 546-558.

Atsuta, Y., Takahashi, Y., 2015. FGF8 coordinates tissue elongation and cell epithelialization during early kidney tubulogenesis. *Development* 142, 2329-2337.

Beck, C.W., 2015. Development of the vertebrate tailbud. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 33-44.

Beck, C.W., Slack, J.M., 1998. Analysis of the developing *Xenopus* tail bud reveals separate phases of gene expression during determination and outgrowth. *Mech Dev* 72, 41-52.

Bustard, H.R., Hughes, R.D., 1966. Gekkonid lizards: average ages derived from tail-loss data. *Science* 153, 1670-1671.

Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B.G., Muhr, J., 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 6, 1162-1168.

Cambray, N., Wilson, V., 2002. Axial progenitors with extensive potency are localised to the mouse chordoneural hinge. *Development* 129, 4855-4866.

Cambray, N., Wilson, V., 2007. Two distinct sources for a population of maturing axial progenitors. *Development* 134, 2829-2840.

Catala, M., Teillet, M.A., De Robertis, E.M., Le Douarin, M.L., 1996. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 122, 2599-2610.

Catala, M., Teillet, M.A., Le Douarin, N.M., 1995. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mech Dev* 51, 51-65.

- Clark, D.R., Jr., 1971. The strategy of tail-autotomy in the ground skink, *Lygosoma laterale*. *J Exp Zool* 176, 295-302.
- Colas, J.F., Schoenwolf, G.C., 2001. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* 221, 117-145.
- Copp, A.J., Adzick, N.S., Chitty, L.S., Fletcher, J.M., Holmbeck, G.N., Shaw, G.M., 2015. Spina bifida. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15007.
- Copp, A.J., Greene, N.D., Murdoch, J.N., 2003. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4, 784-793.
- Copp, A.J., Stanier, P., Greene, N.D., 2013. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol* 12, 799-810.
- Dady, A., Havis, E., Escriou, V., Catala, M., Duband, J.L., 2014. Junctional neurulation: a unique developmental program shaping a discrete region of the spinal cord highly susceptible to neural tube defects. *J Neurosci* 34, 13208-13221.
- Detrait, E.R., George, T.M., Etchevers, H.C., Gilbert, J.R., Vekemans, M., Speer, M.C., 2005. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol* 27, 515-524.
- Drucker, E.G., Lauder, G.V., 2001. Locomotor function of the dorsal fin in teleost fishes: experimental analysis of wake forces in sunfish. *J Exp Biol* 204, 2943-2958.
- Feng, R., Zhou, S., Liu, Y., Song, D., Luan, Z., Dai, X., Li, Y., Tang, N., Wen, J., Li, L., 2013. Sox2 protects neural stem cells from apoptosis via up-regulating survivin expression. *Biochem J* 450, 459-468.
- Frolich, L.M., Biewener, A.A., 1992. Kinematic and Electromyographic Analysis of the functional role of the body axis during Terrestrial and Aquatic Locomotion in the Salamander *Ambystoma Tigrinum*. *Journal of Experimental Biology* 162, 107-130.
- Fu, C., Cao, Z.D., Fu, S.J., 2013. The effects of caudal fin loss and

regeneration on the swimming performance of three cyprinid fish species with different swimming capacities. *J Exp Biol* 216, 3164-3174.

Garriock, R.J., Chalamalasetty, R.B., Kennedy, M.W., Canizales, L.C., Lewandoski, M., Yamaguchi, T.P., 2015. Lineage tracing of neuromesodermal progenitors reveals novel Wnt-dependent roles in trunk progenitor cell maintenance and differentiation. *Development* 142, 1628-1638.

Gont, L.K., Steinbeisser, H., Blumberg, B., de Robertis, E.M., 1993. Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119, 991-1004.

Gouti, M., Delile, J., Stamatakis, D., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., Briscoe, J., 2017. A Gene Regulatory Network Balances Neural and Mesoderm Specification during Vertebrate Trunk Development. *Dev Cell* 41, 243-261.e247.

Gouti, M., Tsakiridis, A., Wymeersch, F.J., Huang, Y., Kleinjung, J., Wilson, V., Briscoe, J., 2014. In vitro generation of neuromesodermal progenitors reveals distinct roles for wnt signalling in the specification of spinal cord and paraxial mesoderm identity. *PLoS Biol* 12, e1001937.

Greenberg, J.A., Bell, S.J., Guan, Y., Yu, Y.H., 2011. Folic Acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Rev Obstet Gynecol* 4, 52-59.

Hagey, D.W., Muhr, J., 2014. Sox2 acts in a dose-dependent fashion to regulate proliferation of cortical progenitors. *Cell Rep* 9, 1908-1920.

Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88, 49-92.

Henrique, D., Abranches, E., Verrier, L., Storey, K.G., 2015. Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord. *Development* 142, 2864-2875.

- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.
- Higham, T.E., Russell, A.P., 2010. Flip, flop and fly: modulated motor control and highly variable movement patterns of autotomized gecko tails. *Biol Lett* 6, 70-73.
- Holmdahl, D.E., 1938. Die Morphogenese des Vertebratororganismus vom formalin und experimentellen Gesichtspunkt. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 139, 191-226.
- Hughes, A.F., Freeman, R.B., 1974. Comparative remarks on the development of the tail cord among higher vertebrates. *J Embryol Exp Morphol* 32, 355-363.
- Hutton, S.R., Pevny, L.H., 2011. SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Dev Biol* 352, 40-47.
- Imura, T., Pourquie, O., 2006. Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression. *Nature* 442, 568-571.
- Kawachi, T., Shimokita, E., Takahashi, Y., 2017. 二分脊椎症の理解に向けた Secondary neurulation の研究. *小児の脳神経* 42, 4, 325-336.
- Koch, F., Scholze, M., Wittler, L., Schifferl, D., Sudheer, S., Grote, P., Timmermann, B., Macura, K., Herrmann, B.G., 2017. Antagonistic Activities of Sox2 and Brachyury Control the Fate Choice of Neuro-Mesodermal Progenitors. *Dev Cell* 42, 514-526.e517.
- Kondoh, H., Lovell-Badge, R., 2016. Sox2. ACADEMIC PRESS.
- Le Douarin, N.M., Kalcheim, C., 1999. *The Neural Crest* 2nd ed. Cambridge University Press.
- Libby, T., Moore, T.Y., Chang-Siu, E., Li, D., Cohen, D.J., Jusufi, A., Full, R.J., 2012. Tail-assisted pitch control in lizards, robots and dinosaurs. *Nature* 481,

181-184.

Liu, H., Wassersug, R., Kawachi, K., 1997. The three-dimensional hydrodynamics of tadpole locomotion. *J Exp Biol* 200, 2807-2819.

Marks, J.D., Khoshnood, B., 1998. Epidemiology of common neurosurgical diseases in the neonate. *Neurosurg Clin N Am* 9, 63-72.

Martin, B.L., Kimelman, D., 2012. Canonical Wnt signaling dynamically controls multiple stem cell fate decisions during vertebrate body formation. *Dev Cell* 22, 223-232.

McGrew, M.J., Sherman, A., Lillico, S.G., Ellard, F.M., Radcliffe, P.A., Gilhooley, H.J., Mitrophanous, K.A., Cambray, N., Wilson, V., Sang, H., 2008. Localised axial progenitor cell populations in the avian tail bud are not committed to a posterior Hox identity. *Development* 135, 2289-2299.

Momose, T., Tonegawa, A., Takeuchi, J., Ogawa, H., Umesono, K., Yasuda, K., 1999. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* 41, 335-344.

Nakanoh, S., Fuse, N., Tadokoro, R., Takahashi, Y., Agata, K., 2017. Jak1/Stat3 signaling acts as a positive regulator of pluripotency in chicken pre-gastrula embryos. *Dev Biol* 421, 43-51.

O'Rahilly, R., Muller, F., 1989. Bidirectional closure of the rostral neuropore in the human embryo. *Am J Anat* 184, 259-268.

Oginuma, M., Moncuquet, P., Xiong, F., Karoly, E., Chal, J., Guevorkian, K., Pourquie, O., 2017. A Gradient of Glycolytic Activity Coordinates FGF and Wnt Signaling during Elongation of the Body Axis in Amniote Embryos. *Dev Cell* 40, 342-353.e310.

Olivera-Martinez, I., Harada, H., Halley, P.A., Storey, K.G., 2012. Loss of FGF-dependent mesoderm identity and rise of endogenous retinoid signalling determine cessation of body axis elongation. *PLoS Biol* 10, e1001415.

- Organ, J.M., Muchlinski, M.N., Deane, A.S., 2011. Mechanoreceptivity of prehensile tail skin varies between ateline and cebine primates. *Anat Rec (Hoboken)* 294, 2064-2072.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Pourquie, O., 1997. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639-648.
- Papan, C., Campos-Ortega, J.A., 1994. On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. *Roux Arch Dev Biol* 203, 178-186.
- Pasteels, J., 1937. Etudes sur la gastrulation des vertébrés méroblastiques. III. Oiseaux. IV. Conclusions générales. *Arch. Biol.* 48, 381-488.
- Row, R.H., Tsotras, S.R., Goto, H., Martin, B.L., 2016. The zebrafish tailbud contains two independent populations of midline progenitor cells that maintain long-term germ layer plasticity and differentiate in response to local signaling cues. *Development* 143, 244-254.
- Saitsu, H., Yamada, S., Uwabe, C., Ishibashi, M., Shiota, K., 2004. Development of the posterior neural tube in human embryos. *Anat Embryol (Berl)* 209, 107-117.
- Sasai, Y., 2001. Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution? *Int J Dev Biol* 45, 321-326.
- Schoenwolf, G.C., 1979. Histological and ultrastructural observations of tail bud formation in the chick embryo. *Anat Rec* 193, 131-147.
- Schoenwolf, G.C., 1984. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am J Anat* 169, 361-376.
- Selleck, M.A., Stern, C.D., 1991. Fate mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. *Development* 112, 615-626.
- Shimokita, E., Takahashi, Y., 2011. Secondary neurulation: Fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Dev Growth Differ* 53,

401-410.

Snell, R.S., 1995. *Clinical Anatomy for Medical Students*, 5th Ed. Little Brown & Co, Boston, Massachusetts., 507 - 630.

Stiefel, D., Copp, A.J., Meuli, M., 2007. Fetal spina bifida in a mouse model: loss of neural function in utero. *J Neurosurg* 106, 213-221.

Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H., 2006. Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development* 133, 297-306.

Uchikawa, M., Yoshida, M., Iwafuchi-Doi, M., Matsuda, K., Ishida, Y., Takemoto, T., Kondoh, H., 2011. B1 and B2 Sox gene expression during neural plate development in chicken and mouse embryos: universal versus species-dependent features. *Dev Growth Differ* 53, 761-771.

Wassersug, R.J., 2015. Locomotion in Amphibian Larvae (or “Why Aren't Tadpoles Built Like Fishes?”)1. *American Zoologist* 29, 65-84.

Watanabe, T., Saito, D., Tanabe, K., Suetsugu, R., Nakaya, Y., Nakagawa, S., Takahashi, Y., 2007. Tet-on inducible system combined with in ovo electroporation dissects multiple roles of genes in somitogenesis of chicken embryos. *Dev Biol* 305, 625-636.

Wymeersch, F.J., Huang, Y., Blin, G., Cambray, N., Wilkie, R., Wong, F.C., Wilson, V., 2016. Position-dependent plasticity of distinct progenitor types in the primitive streak. *Elife* 5, e10042.

Yoshino, T., Saito, D., Atsuta, Y., Uchiyama, C., Ueda, S., Sekiguchi, K., Takahashi, Y., 2014. Interepithelial signaling with nephric duct is required for the formation of overlying coelomic epithelial cell sheet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 6660-6665.

おわりに

本研究では、ニワトリ胚の HH 8 の菱形エピブラストに由来する神経系の前駆細胞に注目し、尾芽形成初期の HH14 から後期に差し掛かる HH17 までのステージを中心に解析を進めた。これまでの secondary neurulation を含めた体軸伸長に関する知見の多くは、神経系と中胚葉系の共通の前駆細胞である NMPs が主な細胞の供給源となり、胚発生初期から体軸伸長が完了するまでの期間、神経管上皮細胞と中胚葉細胞を生み出し続けると考えられてきた。しかし、本研究の結果から、初期尾芽においては神経系の細胞運命を持つ自己増殖性の前駆細胞、uni-fated SN 前駆体が主要な細胞供給源となり神経管が形成されることが示唆された。また、後期尾芽に至るとそれまで uni-fated であった SN 前駆体が bi-fated な NMP 様の細胞集団として、それまでの神経系のみならず中胚葉系組織の産出にも寄与することが示された。この発見は、幹細胞様前駆細胞の細胞運命が、これまで考えられてきたように発生の進行に伴い制限されてゆくだけではなく、発生ステージや周辺環境等に依存してより多様な細胞を生み出す運命に変化しうることを示唆している。

本研究では、細胞の集団としての挙動に主眼を置き解析してきたが、SN 前駆体の分化ポテンシャルなどをさらに知るためには、より詳細な解析として single-cell レベルの解析が今後に求められるであろう。

謝辞

奈良先端科学技術大学院大学での2年間、そして京都大学大学院後の8年間の研究を支えていただき、ご指導いただいた高橋淑子理学研究科教授に心より深い感謝を述べさせていただきます。高橋先生に、研究における論理的思考の重要性、さらに研究成果を他者に伝える難しさとその意義について何度も何度も根気よくご指導いただけたことは、今後の研究生活で大きな力となるものです。

そして、これまでの研究を支えてくださった所属研究室の皆様、そして特に私の研究の初期から実験手法や研究生活面で様々なアドバイスをいただいた田所竜介岡山理科大准教授（当時、京都大学理学研究科助教）には、研究の基礎から教えていただいたことにも深く感謝しております。

また、本研究の基盤を築いた現在徳島大学に所属している下北英輔助教には、学外所属ながら本研究のデータの解釈などでディスカッションに応じていただき、様々な意見をいただきましたことにも厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、日本学術振興会には特別研究員（DC1）として採用していただき、研究を進める大きな足掛かりを提供していただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

最後に、二度の大学生活と大学院生活の過程で出会えた苦楽を共にする友人たち、そして研究の道に進むことを応援してくれた家族に心より感謝いたします。