

を目指した。

ただ、昨年度報告書にも示したとおり、この分化誘導系を用いたスクリーニングによって得られた遺伝子は、未知遺伝子の分を考慮すると半数以上が膵臓以外の消化器官で発現するものであった（図1）。このことは、膵臓形成関連遺伝子を効率よく単離するという点において必ずしも最良とは言えない。網羅的な膵臓形成関連遺伝子の同定を効率よく進めるためには、膵臓誘導系の改良、つまり誘導組織の高純度化がどうしても必要であった。以上の理由から、本年度はより膵臓形成率が向上するような誘導系の開発を目指し、膵臓関連遺伝子の効率的な単離の基盤技術確立を目指した。

## B. 研究方法

### 1. 初期胚へのマイクロインジェクション

インジェクションすべき mRNA は、対応するプラスミドを鋳型に用いて *in vitro* 転写により合成した。これらを、ツメガエル胚の4細胞期にマイクロインジェクターを用いて注入し、必要な時期まで培養した。

### 2. リチウム処理、レチノイン酸処理

リチウム処理に関しては、胚を32細胞期に0.3M 塩化リチウム/100%スタインバーグ氏液で8分間処理することでこれを行なった。RA 処理に関しては胚を  $10^{-5}$  M/スタインバーグ氏液で原腸

陥入期に1時間処理することによりこれを行なった。

## 3. *in situ* ハイブリダイゼーション

誘導条件の検討のため、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって Pdx1 遺伝子の発現を観察した。非 RI プローブはデオキシジエニンラベル化 NTP を用い、SP6, T3, T7 RNA ポリメラーゼにより *in vitro* 合成した。これを用い、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

なお、全ての実験において、倫理面への配慮は指針にのっとりながら行った。

## C. 研究結果

Xnr(Xenopus nodal-related)5、Xnr6 は TGF-beta スーパーファミリーに属し、アクチビン様の構造を持つタンパク質である。Xnr5,6 は中胚葉・内胚葉誘導活性を持つ。実際、Xnr5,6 を過剰発現すると、中胚葉および内胚葉の組織が濃度依存的に形成される。そこで、これらの因子を注入した胚を用い、さらに、いくつかの因子を初期胚に作用させることにより、膵臓組織を肥大化させることを試みた。

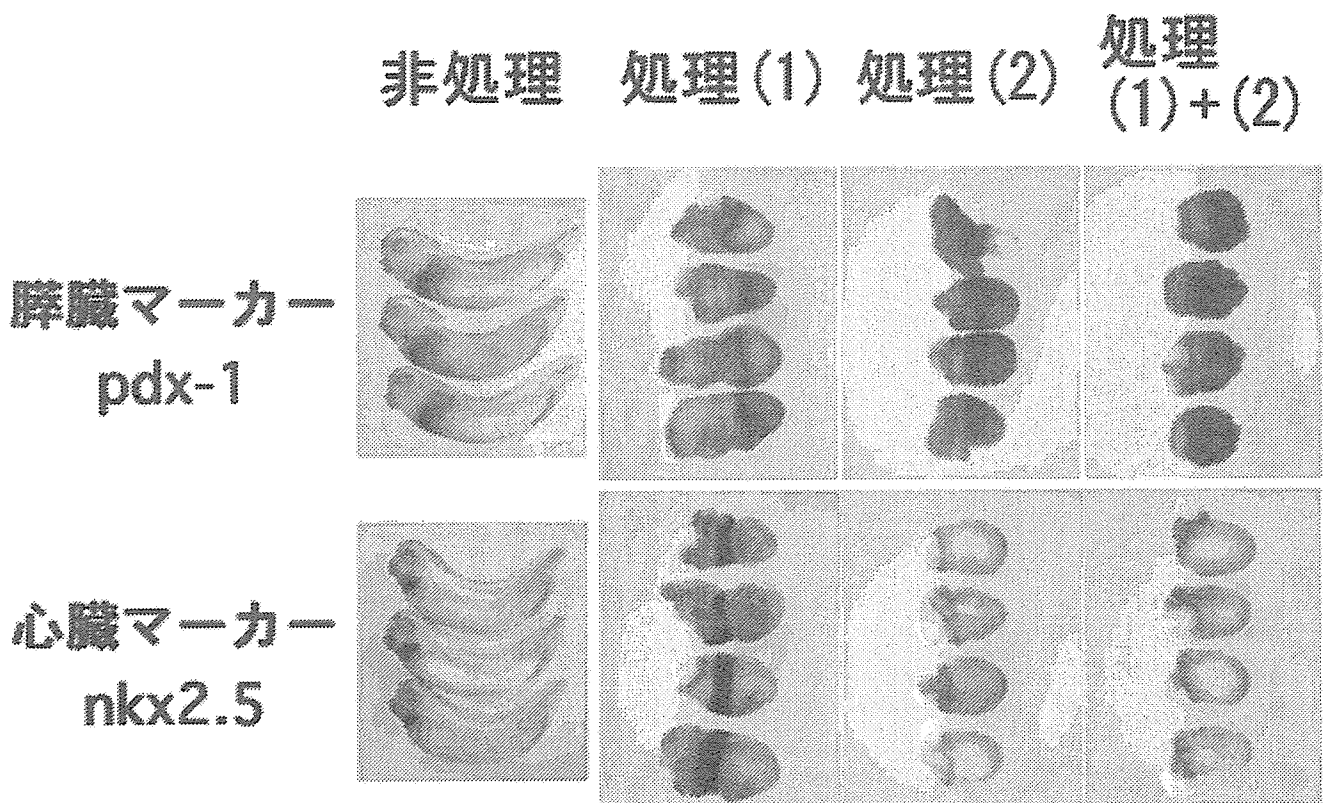
(1)塩化リチウムはツメガエル初期胚において超背側化することが以前から知られている。実際、塩化リチウムは背側化抑制因子 glycogen synthase kinase (GSK)-3beta の作用を阻害する。この塩化リチウムでツメガエル胚を作用させた結果、

本来胚の中の一部に過ぎない膵臓組織が体軸のまわりに沿ってリング状に誘導された(図2、処理(1))。次に、ツメガエル胚をレチノイン酸で処理し、膵臓組織の広がりを観察した。その結果、レチノイン酸処理でも、膵臓組織の広がりが観察された(図2、処理(2))。更にこれら二つの処理を組み合わせたところ、膵臓組織の胚における比率の向上が観察された(図2、処理(1)+(2))。同時に心臓マーカーの発現を調べると、処理を多重にするに従って発現の消失が観察された。このことは、今回改善した膵臓誘導系が高純度化に成功していることを支持している。

ただ、これでもまだ膵臓組織の配膳対に占める割合は十分に大きいとは言えな

図2 新たな膵臓組織の誘導系の確認。そこで、あらかじめ初期胚に Xnr5 を 10pg マイクロインジェクションしておいて胚を内胚葉しておき、その上で(1)及び(2)の処理を行った。すると、膵臓マーカーpdx1 の発現領域はほぼ胚全体に広がった(図3)。この結果は、アクチビン・レチノイン酸処理に比べて劇的に膵臓領域の存在比率が上昇したことを示している。

ただ、いくつかの問題点も存在した。第一に、この(Xnr5/Li/RA)処理胚はほとんどが内胚葉になっているため非常に弱く、二日~三日胚期において自重でつぶれて死んでしまうことが多い。これを回避するためにビテリン膜を除去するステップを入れた。その結果、こ



の不都合はおおむね回避することが出来た。

#### D. 考察

今回、新たな膵臓誘導条件を確立することに成功した。この結果、誘導する膵臓組織の高純度化を図ることができた。今後は、この系を用いて膵臓関連遺伝子の単離に発展させていく。まず、どのステージの RNA を用いるかが問題となる。Pdx1 とインスリンのステージ PCR および Ptf1a のホールマウント in situ ハイブリダイゼーションの結果から、遺伝子の単離は初期尾芽胚期が適当であると現在は考えている。スクリーニング法としては、得た RNA からライブラリーを作成し、活性スクリーニングを行う方法、RNA プローブを合成してマイクロアレイ解析

内胚葉化



内胚葉化  
側方化  
前方化

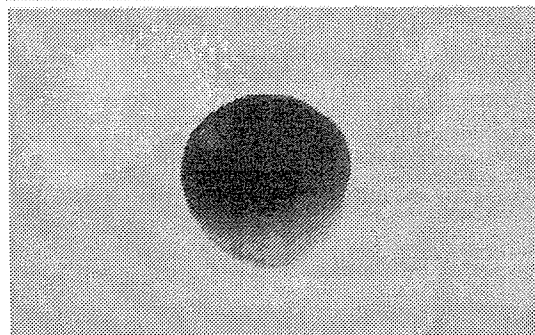


図 3 Xnr5 注入による膵臓組織の拡大 (pdx1 染色)

を行うことなどがある。このような方法を活用しながら、今後は効率よく膵臓形成関連因子を単離していくことを行っていきたい。

#### E. 結論

今年度の研究によって、新たな膵臓誘導条件が確立された。この系は、昨年度報告した膵臓誘導条件に比べて誘導組織の全体に占める割合が飛躍的に上昇し、遺伝子単離のために好都合な結果を得ることができた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yuge L, Kajiume T, Tahara H, Kawahara Y, Umeda C, Yoshimoto R, Wu SL, Yamaoka K, Asashima M, Kataoka K, Ide T. (2006). Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev.* 15:921-9.
2. Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. (2006). Isolation of Murine Hair-Inducing Cells Using the Cell Surface Marker Prominin-1/CD133. *J Invest Dermatol.* in press.

3. Homma M, Inui M, Fukui A, Michiue T, Okabayashi K, Asashima M. A novel gene, BENI is required for the convergent extension during *Xenopus laevis* gastrulation. *Dev Biol.* 303:270-80.
4. Satow R, Kurisaki A, Chan TC, Hamazaki TS, Asashima M. (2006). Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction. *Dev Cell.* 11:763-74.
5. Sugimoto K, Okabayashi K, Sedohara A, Hayata T, Asashima M. (2006). The Role of XBTg2 in *Xenopus* Neural Development. *Dev Neurosci.* in press.
6. Honda M, Kurisaki A, Ohnuma K, Okochi H, Hamazaki TS, Asashima M. (2006). N-cadherin is a useful marker for the progenitor of cardiomyocytes differentiated from mouse ES cells in serum-free condition. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:877-82.
7. Nitta KR, Takahashi S, Haramoto Y, Fukuda M, Onuma Y, Asashima M.(2006). Expression of Sox1 during *Xenopus* early embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:287-93.
8. Tashiro S, Sedohara A, Asashima M, Izutsu Y, Maeno M. (2006). Characterization of myeloid cells derived from the anterior ventral mesoderm in the *Xenopus laevis* embryo. *Dev Growth Differ.* 48:499-512.
9. Chan T, Satow R, Kitagawa H, Kato S, Asashima M. Ledgerline, a novel *Xenopus laevis* gene, regulates differentiation of presomitic mesoderm during somitogenesis. *Zool Sci.* 23:689-97.
10. Inui M, Fukui A, Ito Y, Asashima M. (2006). Xapelin and Xmsr are required for cardiovascular development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 298:188-200.
11. Onuma Y, Asashima M, Whitman M. (2006). A Serpin family gene, protease nexin-1 has an activity distinct from protease inhibition in early *Xenopus* embryos. *Mech Dev.* 123:463-71.
12. Takahashi S, Onuma Y, Yokota C, Westmoreland JJ, Asashima M, Wright CV. Nodal-related gene Xnr5 is amplified in the *Xenopus* genome. *Genesis.* 44:309-21.
13. Sakaki-Yumoto M, Kobayashi C, Sato A, Fujimura S, Matsumoto Y, Takasato M, Kodama T, Aburatani H, Asashima M, Yoshida N, Nishinakamura R. (2006). The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development.* 133:3005-13.
14. Ohnuma K, Yomo T, Asashima M, Kaneko K.(2006). Sorting of cells of the same size, shape, and cell cycle stage for a single cell level assay without staining. *BMC Cell Biol.* 2006 Jun 22;7:25.
15. Haramoto Y, Takahashi S, Asashima M.

(2006). Two distinct domains in pro-region of Nodal-related 3 are essential for BMP inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 346:470-8.

16. Yasuhiko Y, Shiokawa K, Mochizuki T, Asashima M, Yokoyama T. (2006). Isolation and characterization of *Xenopus laevis* homologs of the mouse *inv* gene and functional analysis of the conserved calmodulin binding sites. *Cell Res.* 16:337-46.

17. Funato Y, Michiue T, Asashima M, Miki H. (2006). The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt-beta-catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol.* 8:501-8.

18. Kondow A, Hitachi K, Ikegame T, Asashima M. (2006). Bowline, a novel protein localized to the presomitic mesoderm, interacts with Groucho/TLE in *Xenopus*. *Int J Dev Biol.* 50:473-9.

19. Sedohara A, Suzawa K, Asashima M. (2006). Comparison of induction during development between *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol.* 50:385-92.

20. Inui M, Asashima M. (2006). A novel gene, *Ami* is expressed in vascular tissue in *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns.* 6:613-9.

21. Nishimura Y, Hamazaki TS, Komazaki S, Kamimura S, Okochi H, Asashima M. (2006). Ciliated cells differentiated from mouse

embryonic stem cells. *Stem Cells.* 24:1381-8.

22. Ito Y, Oinuma T, Takano K, Komazaki S, Obata S, Asashima M. (2006). *CyNodal*, the Japanese newt nodal-related gene, is expressed in the left side of the lateral plate mesoderm and diencephalon. *Gene Expr Patterns.* 6:294-8.

23. Osafune K, Takasato M, Kispert A, Asashima M, Nishinakamura R. (2006). Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development.* 133:151-61.

24. Ohnuma K, Hayashi Y, Furue M, Kaneko K, Asashima M. (2006). Serum-free culture conditions for serial subculture of undifferentiated PC12 cells. *J Neurosci Methods.* 151:250-61.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakanishi M, Hamazaki TS, Komazaki S, Okochi H, Asashima M.	Pancreatic tissue formation from murine embryonic stem cells in vitro.	Differentiation	75	001-11	2007
Tsuchiya M, Yoshida T, Taniguchi S, Yasuda K, Maeda A, Hayashi A, Tanaka J, Shigemoto M, Nitta K, Tsuchiya K.	In vivo suppression of mafA mRNA with siRNA and analysis of the resulting alteration of the gene expression profile in mouse pancreas by the microarray method.	Biochem Biophys Res Commun.	356 (1)	129-135	2007
Takahashi S, Onuma Y, Yokota C, Westmoreland JJ, Asashima M, Wright CVE	Nodal-related gene Xnr5 is amplified in the Xenopus genome.	Genesis	44	309-321	2006
Nishimura Y, Hamazaki TS, Komazaki S, Kaminura S, Okochi H, Asashima M.	Ciliated cells differentiated from mouse embryonic stem cells.	Stem Cells	24	1381-8	2006
Honda M, Kurisaki A, Ohnuma K, Okochi H, Hamazaki TS, Asashima M.	N-cadherin is a useful marker for the progenitor of cardiomyocytes differentiated from mouse ES cells in serum-free condition.	Biochem Biophys Res Commun	351	877-882	2006
Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, Kamisaka Y, Kagechika H, Yasuda K, Yuo A.	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in the human leukemia NB4 cells.	Dev Growth Differ	48	177-188	2006
Doshi M, Koyanagi M, Nakahara M, Saeki K, Saeki K, Yuo A.	Identification of human neutrophils during experimentally induced inflammation in mice transplanted with human umbilical cord blood CD34-positive cells.	Int J Hematol	84	231-237	2006
Ohara-Imaizumi M, Fujiwara T, Nakamichi Y, Okamura T, Akimoto Y, Kawai J, Matsushima S, Kawakami H, Watanabe T, Akagawa K, Nagamatsu S.	Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis.	J Biol Chem		in press	
Kaburagi Y, Okochi H, Satoh S, Yamashita R, Hamada K, Ikari K, Yamamoto-Honda R, Terauchi Y, Yasuda K, Noda M.	Role of IRS and PHIP on insulin-induced tyrosine phosphorylation and distribution of IRS proteins.	Cell Structure and Function		in press	

Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H.	Isolation of murine hair-inducing cells using the cell surface marker prominin- 1/CD133.	J Invest Dermatol		in press	
---	--	----------------------	--	----------	--