

胎児・ES細胞データをモデルとした 遺伝子カスケードの描出研究

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

北嶋 聡



目 的

「胎児、ES細胞、概日変動等の自律的なカスケードの描出」

- ・自律的な遺伝子発現が認められる発生過程や概日リズムのシグナルカスケードを描出する
- ・マウス胚およびES・EB培養分化系に化学物質を暴露し、遺伝子発現データを得て、発生過程のシグナルカスケードに対する影響を検証する

平成21年度：

野生型胚およびES・EB分化系の局所カスケードの描出を行う。ES・EB分化系にレチノイン酸受容体(RAR)関連物質を暴露し、データを得て、ES分化系における局所カスケードを描出する。

平成22年度：

マウス肝の網羅的な概日カスケードを描出する。引き続きRARカスケードを描出し、発生の自律的なカスケードと比較・検証する。

平成23年度：

腎、肺等の多臓器の概日変動カスケードを描出する。野生型胚におけるRAR関連局所カスケードを描出し、先の結果と比較・検証する。

背景

先行研究において取得・構築済みの
遺伝子発現変動の経時データベース

I 無処置野生型マウス・全胚

[マウス野生型胚]

[マウス胎生6.25-9.75日] (TIME POINT : 12点)

II 無処置野生型ES細胞を用いた胚様体(EB) 「ES株 : TT2」

[マウスES・EB分化系]

[EB形成0-7日] (TIME POINT : 14点)

—より早期のマウス胚の代替のとしてのEB—

背景

高精度の発生毒性評価系の必要性

1) 種差の問題

例) サリドマイド

2) 検出感度の問題

例1) 対照群での奇形発生

例2) 同一母体内での胎児間の差

例3) 見過ごされやすい異常

[機能障害, 免疫障害, 腫瘍, 発生頻度の変化, 短命等]

実験動物にて催奇形性という所見が認められなくても
ヒトでの催奇形性を正確に予見しなければならない

背景

遺伝子発現からみた胎児の特徴

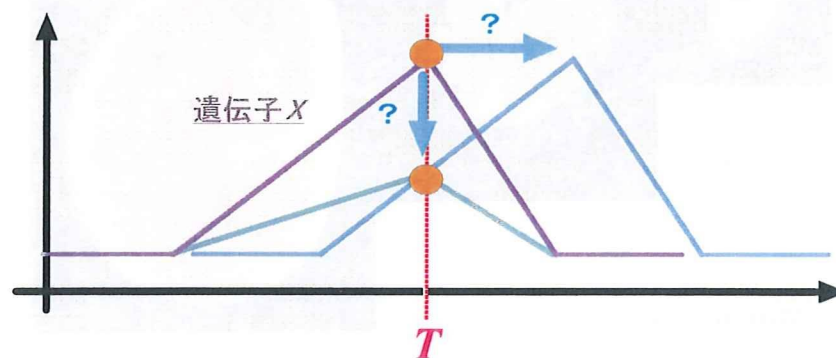
adultとは異なり胎児では
発生に関与する遺伝子群が
激しく経時的に変化する

化学物質を投与・適用しなくとも
特定のシグナルカスケードを描出できる可能性がある

背景

遺伝子発現比による遺伝子リストアップを 時間1点でおこなうことの問題点

遺伝子Xの発現に関し、ある影響下での比較を考える時、
時間T1点における観察だけでは、発現ピークの変化か、
位相のシフトなのか、あるいは両者複合なのか不明である



経時変化を検討する必要がある

背景

先行研究において取得・構築済みの
遺伝子発現変動の経時データベース

I 無処置野生型マウス・全胚

[マウス野生型胚]

[マウス胎生6.25-9.75日] (TIME POINT : 12点)

II 無処置野生型ES細胞を用いた胚様体(EB)「ES株: TT2」

[マウスES・EB分化系]

[EB形成0-7日] (TIME POINT : 14点)

—より早期のマウス胚の代替としてのEB—

背景

胎生7.5, 8.5, 9.5日のマウス胚

E7.5



E8.5



E9.5



0.3 mm

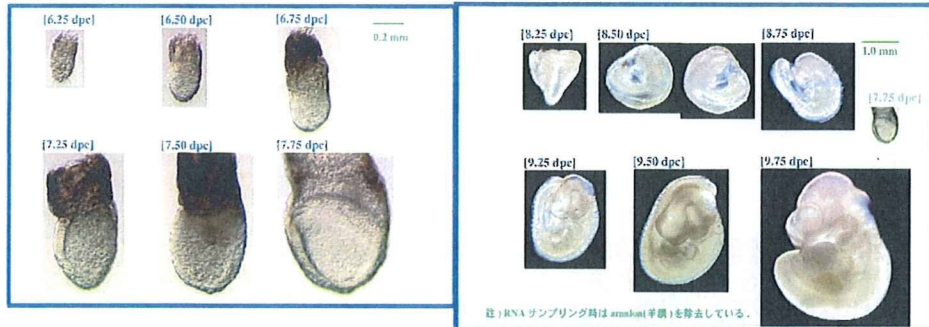
C57BL/6CrSlc

☆プラグ確認日を0.5日とした

背景

マウス胎生6.25-9.75日胚 [C57BL/6CrSlc]

Time point 12点



- ・ 経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚（全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した）を1腹分ブールしたRNAサンプル使用
- ・ マウス胚は、直接、1% の2-メルカプトエタノール含有RLT バッファー（QIAGEN社）に変性・溶解
- ・ マイクロアレイは、[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を使用。

プラグが確認された日の15時を胎生0.5日とした

背景

[ステージおよびサンプリング選択理由]

- ・ マウス胚は胎生6.25-9.75日の全胚を使用する

- 器官形成初期であり、初期中胚葉誘導が活発な時期
- 毒性標的性が不明であるため、**全胚**を検討したい
- 現行の胚の変性・溶解プロトコル上、胎生9.5日付近が上限
- 遺伝子発現の確認のためのwhole mount ISHにおいても胎生9.5日付近が限界
- 胎生6.25-9.75 で各種分子マーカをwhole mount ISHで検討した経験がある

先ずはこの3日間で経時データを収集する

背景

先行研究において取得・構築済みの
遺伝子発現変動の経時データベース

I 無処置野生型マウス・全胚
[マウス野生型胚]
[マウス胎生6.25-9.75日] (TIME POINT : 12点)

II 無処置野生型ES細胞を用いた胚様体(EB) 「ES株 : TT2」
[マウスES・EB分化系]
[EB形成0-7日] (TIME POINT : 14点)
ーより早期のマウス胚の代替としてのEBー

背景

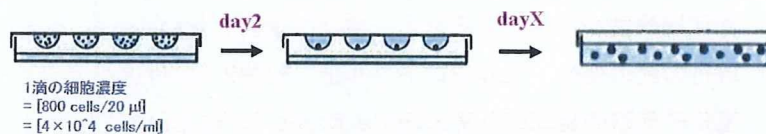
胚様体(EB)の形成によるマウスES細胞の三胚葉分化

・ESは生殖細胞伝達頻度の高い「TT2株」を使用した
TT2: (C57BL/6 × CBA)F1 [B6CBF1]由来: ♂

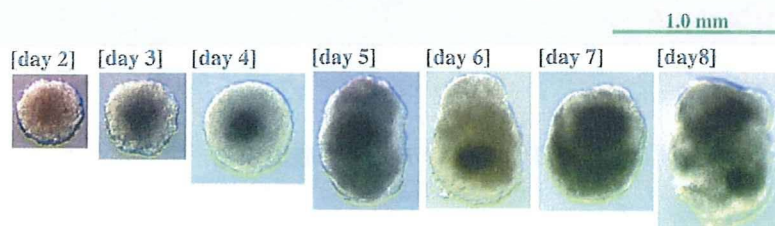
ES細胞の天井培養
[LIF(-) medium]

胚様体(EB)の形成
[LIF(-) medium]

浮遊培養
[LIF(-) medium]



[EB形成の経時変化]



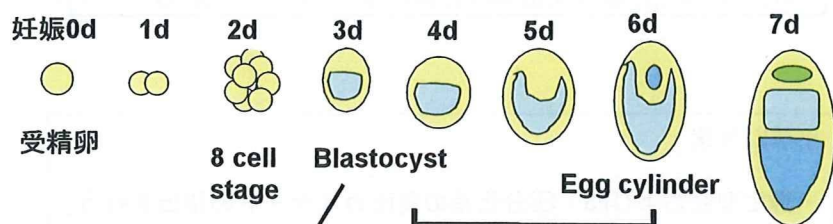
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部における
ES細胞 [TT2株] を利用したKO/KI マウス作製の際のキメラ生産実績例

キメラ出産集計(10)								date
transgene	clone No.	total foster no.	total no. of embryo (blastocyst)	total pups no. (alive)	total chimera no.			period of transfer
					1-50%	50-80%	80-100%	
Dll3 in Dll1	#101	5	81(63)	17	♂ ♀ ♀	♂ ♂	♂*♂♂	030729-030801
"	#144	4	92(51)	18	♂ ♂ ♀	♂	♂*♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂	030729-030801
T-Dtx2	#1132	5	102(95) 5*側10x入っている!!	26	♀ ♀		♂*♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂	030819-030822
"	#1177	6	107(99) 5*側10x入っている!!	19	♂ ♀ ♀		♂*♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂	030819-030822
P1Cre-FrtNeo	#9	5	101(91)	32		♂ ♂ ♂ ♂ ♀	♂*♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂	030826-030829
"	#99	6	119(101)	26		♂ ♂ ♂ ♀ ♀ ♀ ♀	♂*♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂	030826-030829
T-Dtx3	#23	5	100(99)	30	♀ ♀ ♀	♂	♂*♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂♂ ♂♂♂♂♂♂♂ ♀	030909-030912
"			107(101)		♂♂♂♂♂♂♂♂		♂*♂♂♂♂♂♂	030909-030912

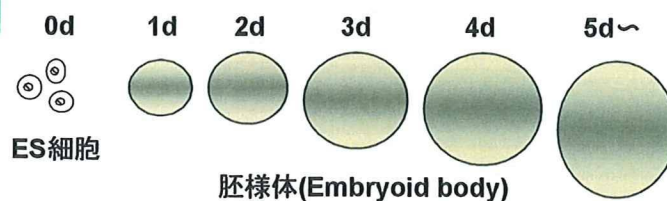
マウス胚とES細胞/胚様体 (EB) の比較

—より早期の胚の代替となり得る—

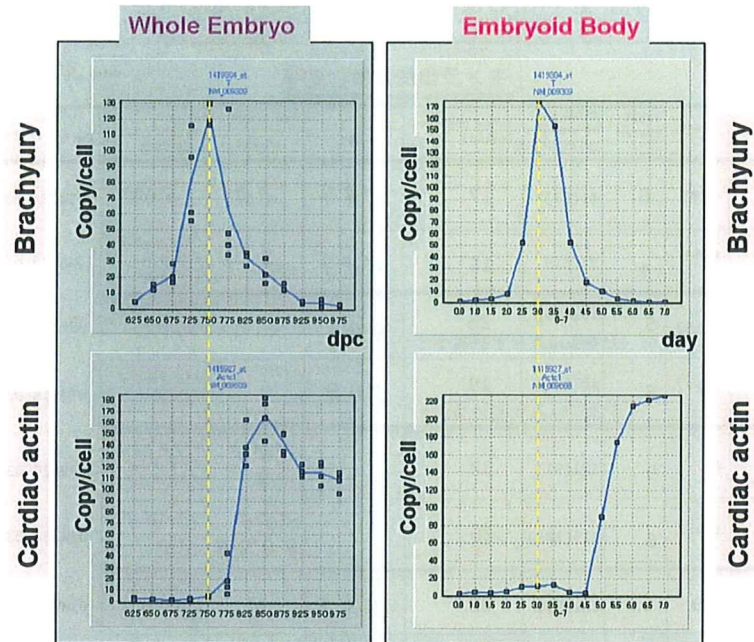
In vivo



In vitro



マウス胚とEBの分化マーカー発現パターンの比較



目 的

「胎児、ES細胞、概日変動等の自律的なカスケードの描出」

平成21年度：

- ・野生型胚およびES・EB分化系の局所カスケードの描出を行う。
- ・ES・EB分化系にレチノイン酸受容体(RAR)関連物質を暴露し、データを得て、ES分化系における局所カスケードを描出する。

**野生型胚およびES・EB分化系における
T (Brachyury) 遺伝子の局所カスケードの描出を行う**

**I 野生型マウス胚の遺伝子発現経時データベースを用いた
T遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出**

**II マウスES・EB分化系の遺伝子発現経時データベースを用いた
T遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出**

**野生型胚およびES・EB分化系における
T (Brachyury) 遺伝子の局所カスケードの描出を行う**

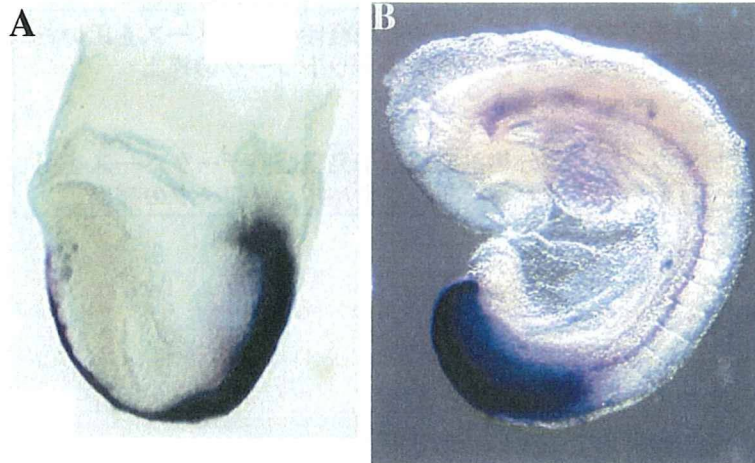
**I 野生型マウス胚の遺伝子発現経時データベースを用いた
T遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出**

**II マウスES・EB分化系における遺伝子発現変動の経時データベースを用いた
T遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出**

T遺伝子:

脊索を含む中胚葉の形成と原腸陥入に関わる転写因子

T遺伝子の発現 A: 胎生7.75日、B: 胎生8.75日

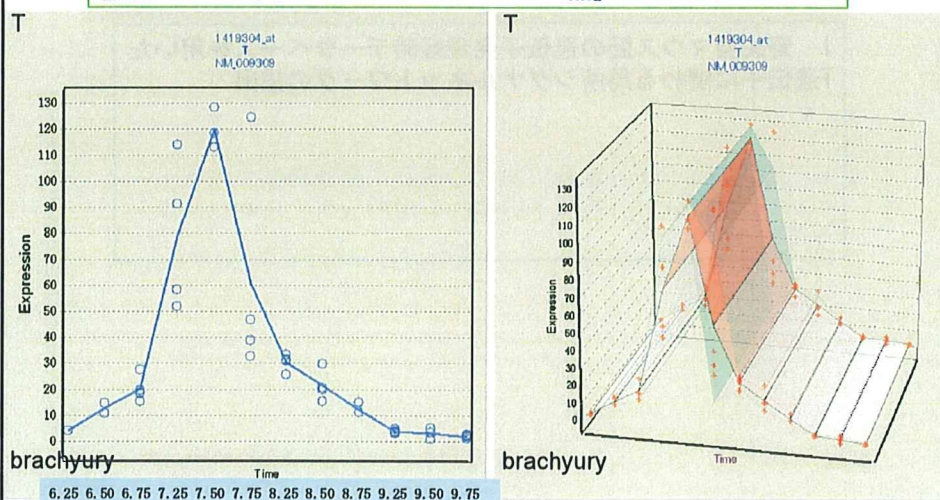


T遺伝子:

脊索を含む中胚葉の形成と原腸陥入に関わる転写因子

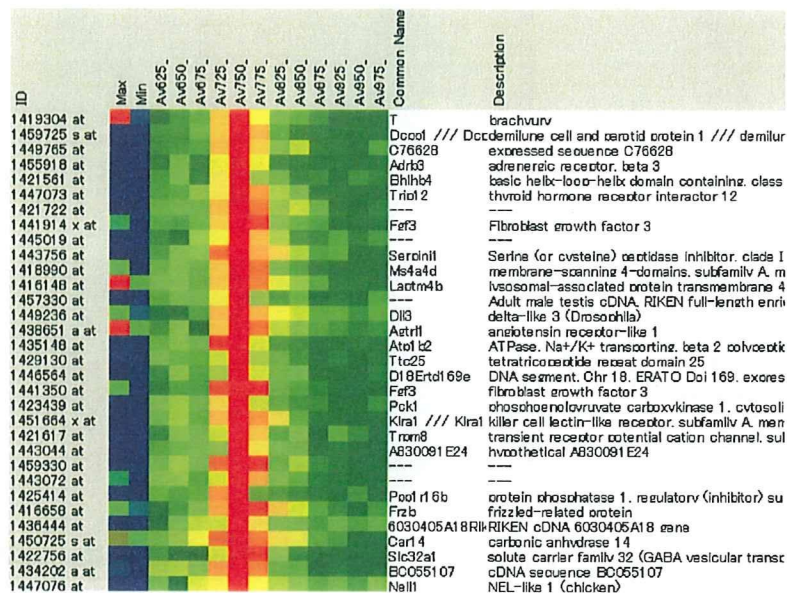
マウス野生型胚の遺伝子発現経時データベースにおける
T遺伝子の発現変動

[胎生6.25から9.75日: TIME POINT: 12点]



T遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出[野生型胚]

標準化(normalize)したT遺伝子の各時点の平均値の経時変化を基に
ピアソンの相関係数を求め α 値が高い順に並び替えた



T遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出[野生型胚]

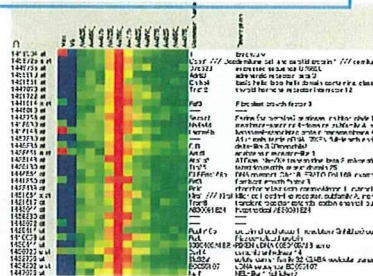
ピアソンの相関係数を求め α 値が高い順に並び替えた
発現コピー数に制限を設けなかった

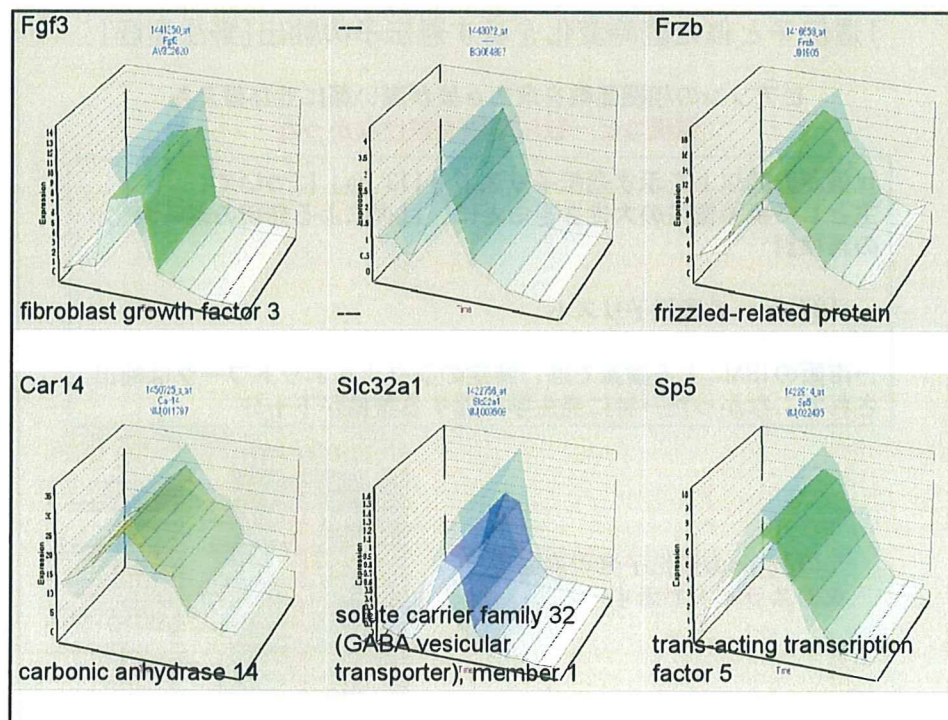
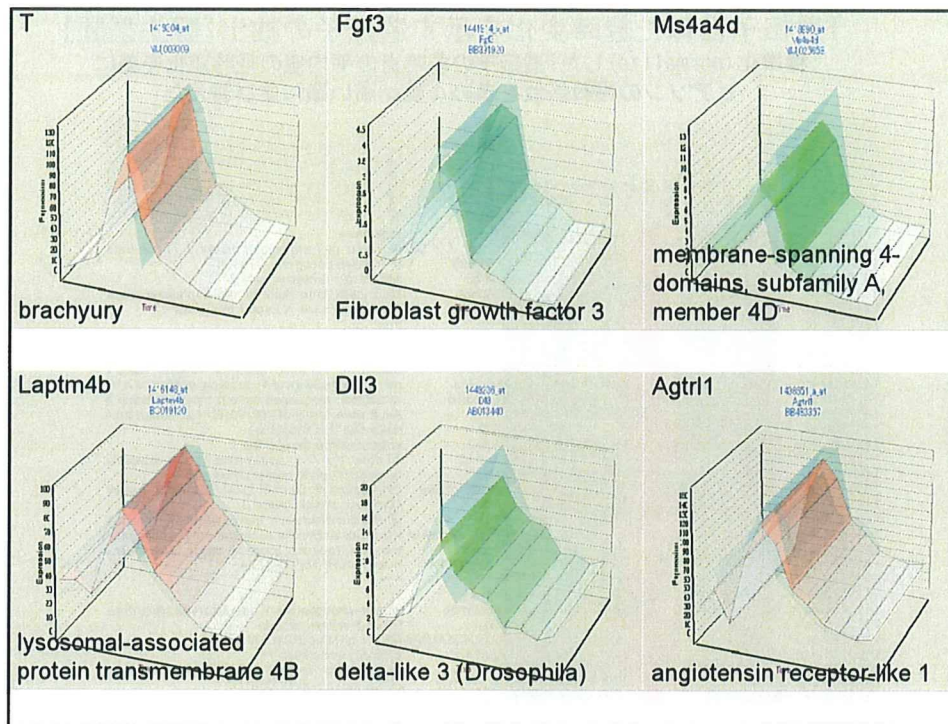
α 値が0.85以上を示す遺伝子リスト「113 ps」について、
主として標準偏差の大きさをもとに、目視による発現の経時変化
の再検討

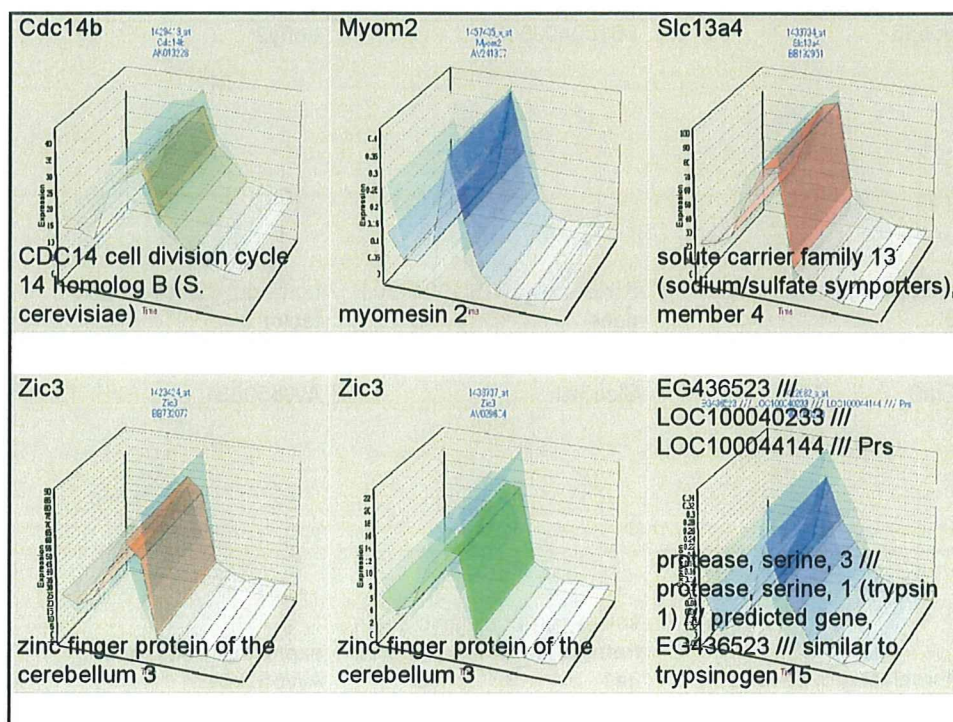
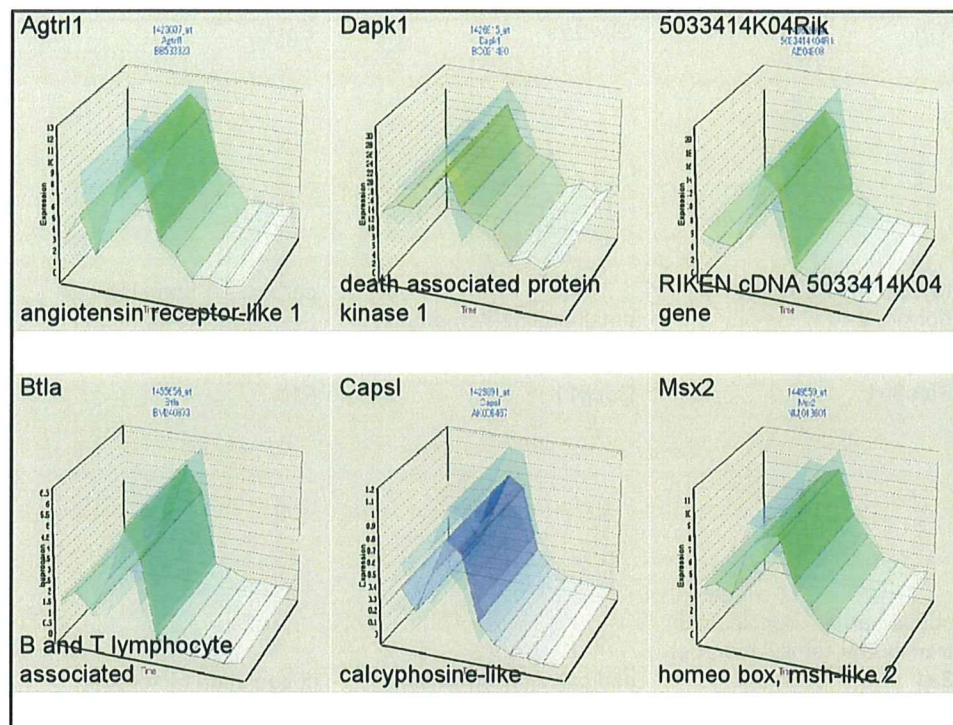
→「37 ps」の遺伝子リスト

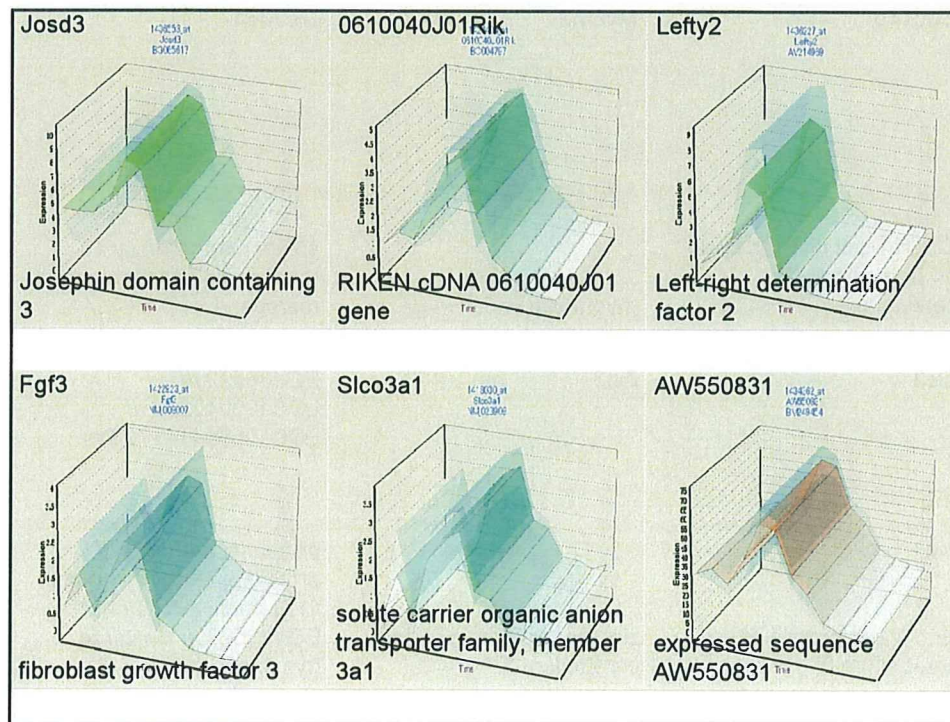
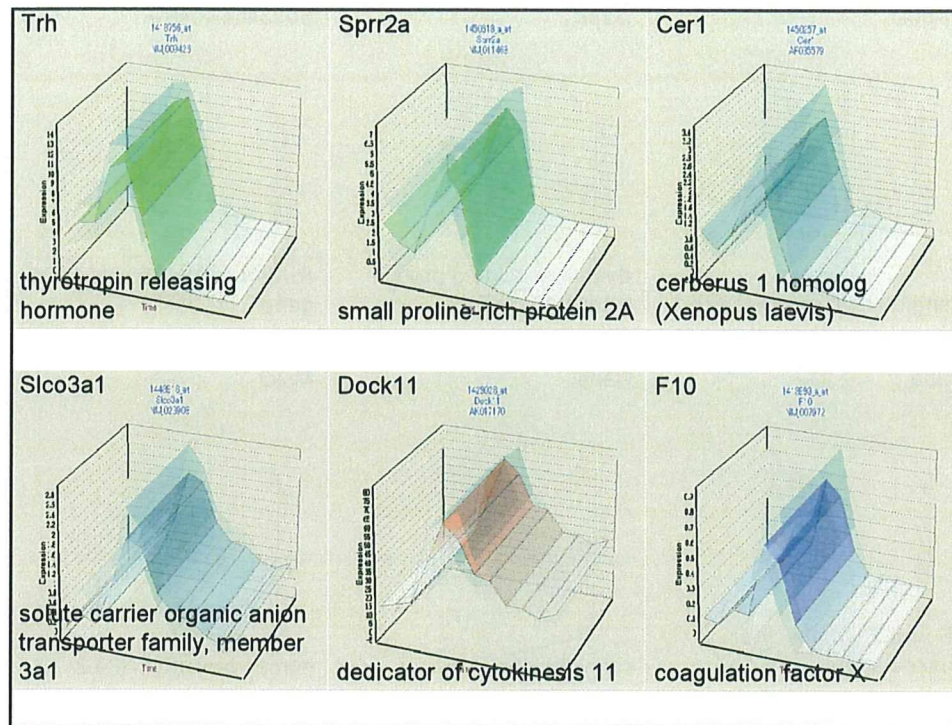
→市販のIPAによる検索では、特定のシグナルネットワークは抽出
されてこなかった→特に発生学に関する整備が不十分

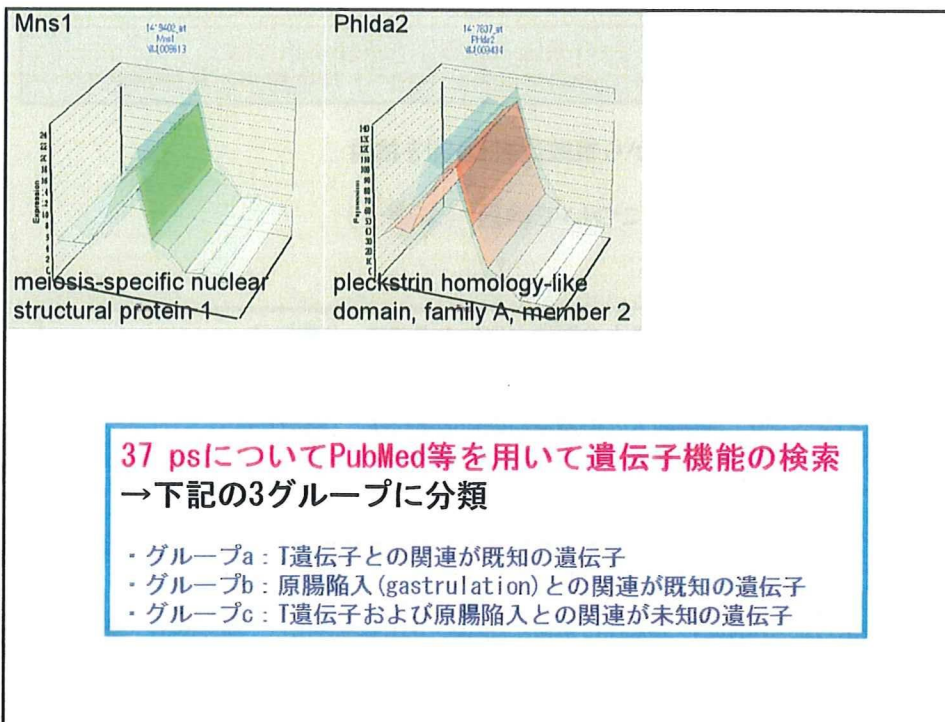
この37 psの遺伝子発現変動を
次のスライドで示す











T遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 **【野生型胚】**

ーマウス野生型胚の遺伝子発現経時データベースー

37 ps (31遺伝子)

グループa：T遺伝子との関連が既知の遺伝子：2遺伝子

Sp5、Zic3 [カエル]

グループb：原腸陥入との関連が既知の遺伝子：6遺伝子

Dll3、Agtr11 [ゼブラフィッシュ]、Frzb [カエル]、Msx2 [ウニ]、Trh、Ger1、Lefty2

グループc：T遺伝子および原腸陥入との関連が未知の遺伝子：23遺伝子

Fgf3、Ms4a4d、Laptn4b、BG064897、Car14、Slc32a1、Dapk1、5033414K04Rik、Btla、Cps1、Cdc14b、Myom2、Slc13a4、EG436523、Sprr2a、Slco3a1、Dock11、F10、Josd3、0610040J01Rik、AW550831、Mns1、Phlda2

当該遺伝子とT遺伝子の関連を検討するには、
発現部位の重なりを、whole mount ISHにより確認する必要がある

→31遺伝子の中から複数選択しISHを検討

→9つの遺伝子について検討 (朱書き)

グループa: T遺伝子との関連が既知の遺伝子: 2遺伝子

Sp5, Zic3 [カエル]

グループb: 原腸陥入との関連が既知の遺伝子: 6遺伝子

Dll3, Agtr11 [ゼブラフィッシュ]、Frzb [カエル]、Msx2 [ウニ]、Trh, Cer1
、Lefty2

グループc: T遺伝子および原腸陥入との関連が未知の遺伝子: 23遺伝子

Fgf3, Ms4a4d, Laptm4b, BG064897, Car14, Slc32a1, Dapk1,
5033414K04Rik, Btla, Caps1, Cdc14b, Myom2, Slc13a4, EG436523,
Sprr2a, Slco3a1, Dock11, F10, Jcsd3, 0610040J01Rik, AW550831, Mns1
、Phlda2

当該遺伝子とT遺伝子の関連を検討するには、
発現部位の重なりを、whole mount ISHにより確認する必要がある

→31遺伝子の中から複数選択しISHを検討

グループa: T遺伝子との関連が既知の遺伝子: 2遺伝子

Sp5, Zic3 [カエル]

Develop. Growth Differ. (2002) 44, 55-61

***Xenopus Brachyury* regulates mesodermal
expression of *Zic3*, a gene controlling left-right
asymmetry**

Tetsuya Kitaguchi,^{1,2} Kiyomi Mizugishi,¹ Minoru Hatayama,¹ Jun Aruga^{1*}
and Katsuhiko Mikoshiba^{1,2}

¹Laboratory for Developmental Neurobiology, Riken Brain Science Institute, Wako-shi, Saitama 351-
0199 and ²The Division of Molecular Neurobiology, The Department of Basic Medical Science, The
Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.

Developmental Biology 227, 358-372 (2000)

doi:10.1006/dbio.2000.9878, available online at <http://www.sciencedirect.com> on IDEAL[®]

***Sp5*, a New Member of the *Sp1* Family, Is
Dynamically Expressed during Development
and Genetically Interacts with *Brachyury***

Stephen M. Harrison,^{1,2} Denis Houzelstein,¹ Sally L. Dunwoodie,³
and Rosa S. P. Beddington¹

¹Division of Mammalian Development, The National Institute for Medical Research,
The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom

T遺伝子と似た発現

グループa: Sp5、Zic3 ; グループb: Dll3、Frzb、Lefty2

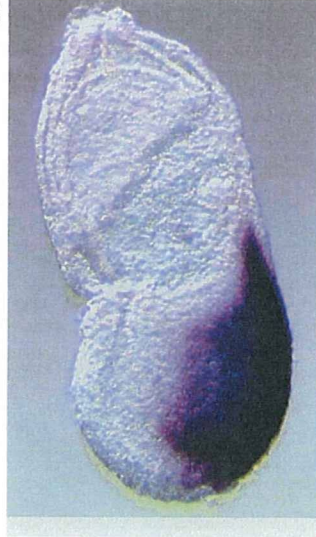
A: Zic3

B: Dll3

A



B



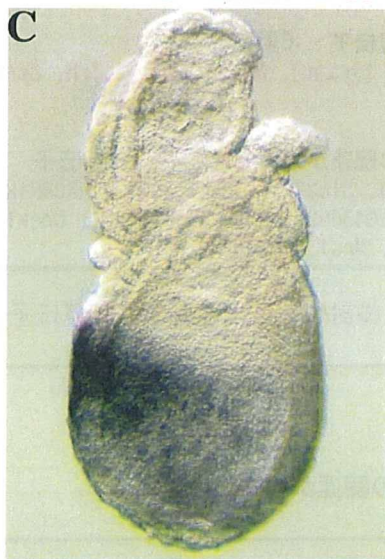
T遺伝子とは似ていない発現

グループb: Trh[胚前方]、Cer1 [胚前方]、Msx2[胚体外]

グループc: Fgf3[胚体外] C: Trh

D: Fgf3

C



D

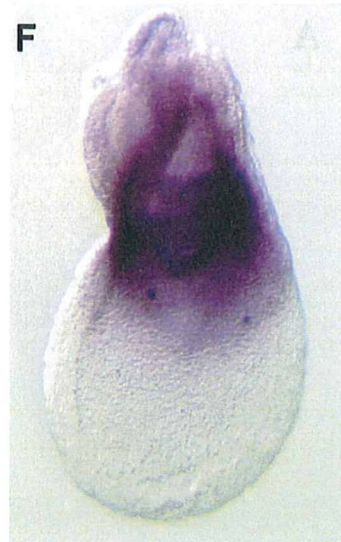


T遺伝子とは似ていない発現

グループb: Trh[胚前方]、Cer1 [胚前方]、Msx2[胚体外]

グループc: Fgf3[胚体外] **E: Cer1**

F: Msx2



31遺伝子の中から9つの遺伝子を選択しISHを検討 (朱書き)

グループa: T遺伝子との関連が既知の遺伝子: 2遺伝子

Sp5、Zic3 [カエル]

グループb: 原腸陥入との関連が既知の遺伝子: 6遺伝子

Dl13、Agtr11 [ゼブラフィッシュ]、Frzb [カエル]、Msx2 [ウニ]、Trh、Cer1、Lefty2

グループc: T遺伝子および原腸陥入との関連が未知の遺伝子: 23遺伝子

Fgf3、Ms4a4d、Laptm4b、BG064897、Car14、Slc32a1、Dapk1、5033414K04Rik、Btla、Caps1、Cdc14b、Myom2、Slc13a4、EG436523、Sprr2a、Slco3a1、Dock11、F10、Josd3、0610040J01Rik、AW550831、Mns1、Phlda2



検討後、抽出されてきた遺伝子

・ T遺伝子との関連が既知の

Sp5とZic3遺伝子

・ 原始線条部位に発現し、T遺伝子との関連が強く示唆される

Dl13、FrzbおよびLefty2遺伝子

T遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出 [野生型胚]

- ・ 経時変化を基としたピアソンの相関係数の利用
- ・ ISHによる発現部位の可視化

31遺伝子の中から9遺伝子を選択しISHを検討後、抽出されてきた5遺伝子

- ・ T遺伝子との関連が既知の
Sp5とZic3遺伝子
- ・ 原始線条部位に発現し、T遺伝子との関連が強く示唆される
Dl13、FrzbおよびLefty2遺伝子

Q: この5遺伝子の転写開始点上流にT-box結合配列は存在するのか?



*In silico*でのプロモーター解析

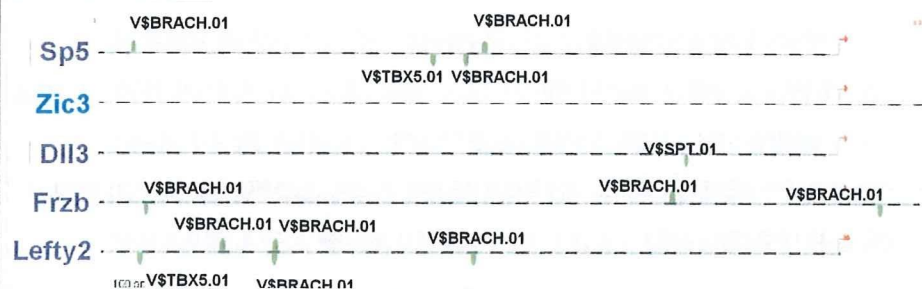
- ・ 市販のGenomatixを利用

T-box結合配列は Zic3以外の4遺伝子に存在する

by Dr Igarashi, K

Genomatix

転写開始点上流3kb



- ・ T遺伝子の異所的な発現によりZic3が誘導されるという報告がある
→ 間接的な発現制御の可能性が高い

Develop. Growth Differ. (2002) 44, 55-61

***Xenopus Brachyury* regulates mesodermal expression of *Zic3*, a gene controlling left-right asymmetry**

Tetsuya Kitaguchi,^{1,2} Kiyomi Mizugishi,¹ Minoru Hatayama,¹ Jun Aruga^{1*} and Katsuhiko Mikoshiba^{1,2}

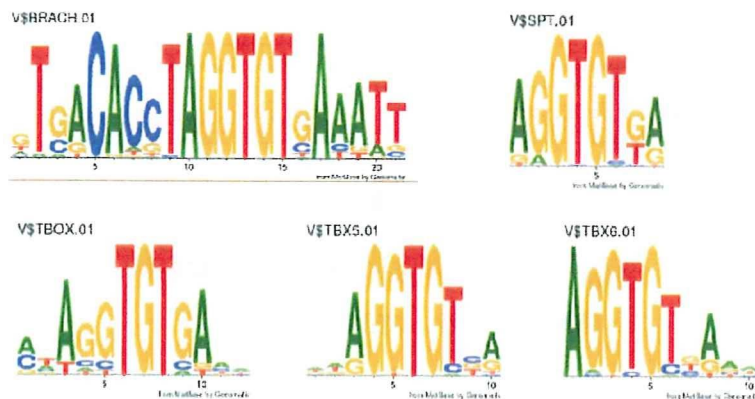
¹Laboratory for Developmental Neurobiology, Riken Brain Science Institute, Wako-shi, Saitama 351-0198 and ²The Division of Molecular Neurobiology, The Department of Basic Medical Science, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.

T-box結合配列 : V\$BRAC family (Brachyury gene, mesoderm developmental factor)

Genomatix

Matrices members

V\$BRACH.01: Brachyury
V\$SPT.01: T-box gene 16 (tbx16) of zebrafish
V\$TBOX.01: T-box transcription factor binding sites
V\$TBX5.01: T-Box factor 5 site (TBX5), mutations related to Holt-Oram syndrome
V\$TBX6.01: T-Box family transcription factor



5遺伝子全てに存在する結合配列

