

発生生物学研究室 Laboratory of Developmental Biology

研究員 (PI) Hisato Kondoh, Ph.D.

1. 研究概要

細胞・組織をタンパク質の動態システムとして成立させる転写因子制御を研究している。初期胚の細胞が発生過程を経ることによって、一定の構造と機能を持った細胞に成熟し、またその状態を維持する。それを実現しているのは、細胞間および細胞内シグナル伝達と、転写因子による遺伝子発現制御である。核における遺伝子発現が特定の細胞状態や機能を規定し、その状態や機能が核にフィードバックされて遺伝子発現を制御する。本研究では、このようなフィードバック制御を担う、細胞間・細胞内シグナル伝達と、転写因子の作用機構を解明し、それらがタンパク質の動態システムとして細胞・組織を成立させる原理を明らかにする。本年度は、以下の2課題の研究を行った。

2. 本年度の研究成果

(1) エピプラスト幹細胞株からの領域性をもった神経幹細胞株の樹立

エピプラスト幹細胞という体細胞全体の前駆体に対応する細胞株から、無血清培養の条件下で直接的に神経幹細胞株を樹立するという、独自の培養操作法を確立していた。胚の中で進行する神経系の領域化の過程を、エピプラスト幹細胞の培養操作技術を駆使して、以下のように単純化した。(1) 無血清合成培地の中でエピプラスト幹細胞の培養操作を行うことによって、胚の中でエピプラストと相互作用する周囲の組織からの影響を除外して神経系の成立と領域化の過程を解析できる。(2) 神経幹細胞株を樹立することによって、胚発生では神経組織(ニューロン、グリア)を生成し続ける神経幹細胞を、分化を停止させた状態で均質な細胞集団として集積して、詳細に解析することができる。

本研究では特に、胚で神経幹細胞が生まれる時期に、胚の尾側(後側)に向かってシグナルのレベルが上昇する Wnt シグナルに的を絞って、その神経幹細胞樹立過程における効果を分析した。

エピプラスト幹細胞を神経幹細胞樹立の培養条件下に置いてから5日までは、細胞は集塊状態で増殖し、神経幹細胞としての性質はまだ顕著ではないが、その時期に既に、エピプラストに特徴的な Pou5f1 遺伝子の発現は失われており、神経系に特徴的な Sox1 の発現が上昇していた。また、神経幹細胞株が樹立される約3週間よりも前に、神経系としての細胞の性質と、神経系の中での大まかな領域特性が獲得されることがわかった。

前・中脳で発現される Otx2, 菱脳・脊髄で領域ごとに異なった組み合わせで発現される Hoxa 遺伝子群の発現解析から、Low Wnt の条件下では前・中脳、Medium Wnt では菱脳、そして High Wnt では、頸部・胸部の脊髄に対応する神経幹細胞株が樹立されたことが明らかになった(図1)。

さらに、一度確立された神経幹細胞株の領域特性は Wnt シグナル強度を変化させても安定して維持されることを示した。実際の胚発生過程と対応させてみると、頭尾方向での Wnt シグナル強度の違いは、神経幹細胞が成立する時期を過ぎると胚の中では失われる。このことから、神経幹細胞が生み出される時期での胚の頭尾方向での Wnt シグナル強度の違いが、まず神経幹細胞の領域特性の確立に反映され、次いで、その領域特性が安定に維持されることによって、その後の機能領域に分かれた神経系の発生が実現すると考えられる。

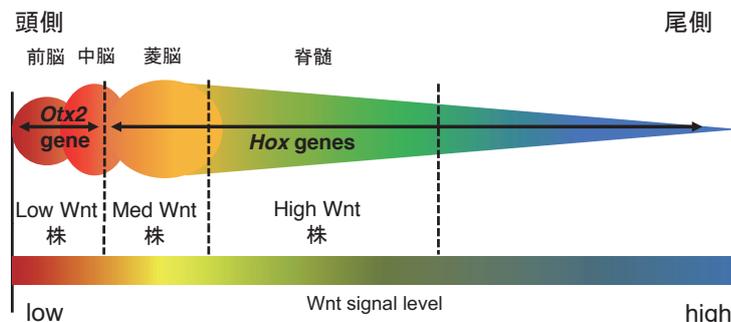


図1 Wnt シグナルの強度の違いによって規定される、エピプラスト幹細胞から樹立される神経幹細胞株の領域特性(渡邊優作修士論文より)。

(2) エピブラストから内胚葉への発生過程の ZIC 転写因子による制御

エピブラスト幹細胞を、Wnt シグナルを抑制した状態で浮遊細胞塊として培養したのちに、laminin を豊富に含む Matrigel 中に移すと、原腸陥入に類似した細胞集団の再編成がおきて内胚葉の発生をもたらすことを発表していた (Inamori, Fujii, et al., 2020)。このエピブラスト幹細胞の培養操作条件において、内胚葉の発生を特徴付ける Sox17 遺伝子の発現上昇と、転写因子遺伝子 Zic2 の発現上昇のタイミングが一致することを見出した。その制御関係を明らかにするために、マウス胚での Zic2 のノックアウトの効果を調べた。

エピブラストの内胚葉前駆体で特に強く発現する Foxa2 の特異性を用いて、Foxa2 発現細胞で Zic2 遺伝子をノックアウトする (塩基配列を欠失させる) と胚発生、特に内胚葉の発生がどのように影響されるのかを調べた。Foxa2 遺伝子座に Tamoxifen 依存的な組換え酵素 CreER の遺伝子を組み込むとともに、Zic2 遺伝子エクソンの両側に LoxP 配列を持つマウス系統を交配によって作成した。

この系統の妊娠マウスに Tamoxifen を投与すると、胚の中で Foxa2 を発現する細胞に限定して Zic2 遺伝子をノックアウトでき、そのノックアウトのタイミングも選択できる (図 2)。このマウス系統を使用して、着床直後に Zic2 をノックアウトした E6.5 マウス胚を集めて、免疫染色によって SOX17 発現を調べた。その結果、Foxa2 発現細胞で Zic2 遺伝子を不活化すると、SOX17 発現が著しく低下し、原腸陥入がおきなくなるとともに、内胚葉が作られなくなった。この結果から、ZIC 2 が内胚葉発生への制御に関わること、Sox17 は Zic2 の下流に位置することが示された。

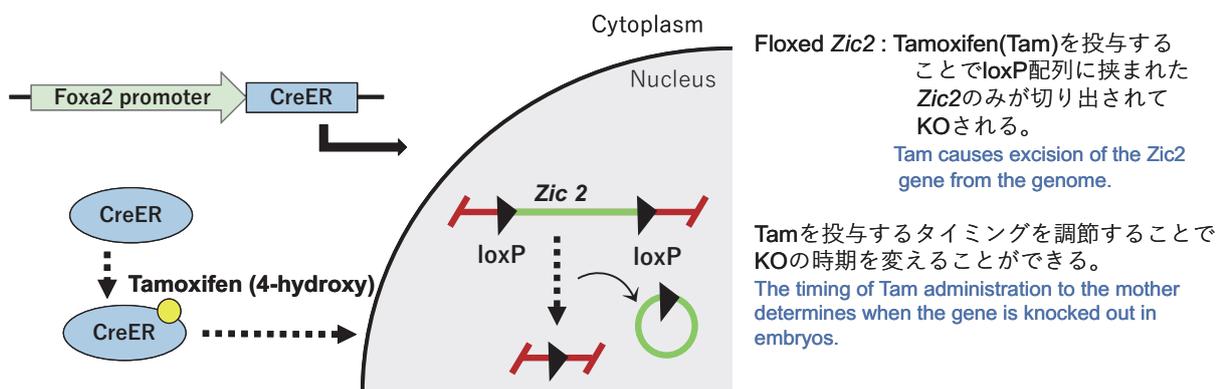


図 2 Tamoxifen 投与によってひきおこされる Zic2 遺伝子ノックアウトの過程 (藤井麻衣修士論文より)。

3. Research projects and annual reports

We have investigated how transcription factors regulate developmental processes under the inflow of various external signals involving cell-cell or cell-substrate interactions. This year, we focused on the following research projects to conclude issues that we previously raised.

This year's accomplishments

1) Deriving neural stem cell lines with specific anteroposterior CNS regionalities from epiblast stem cells

We have previously developed a procedure to directly establish the neural stem cell lines from epiblast stem cells under a serum-free culture condition. This procedure simplifies the neural stem cell-deriving processes during embryogenesis by starting from the epiblast stem cells. (1) The employment of the serum-free culture condition allowed the analysis of the processes of neural stem cell derivation and regional specificity endowment, being freed from complex interactions with the surrounding tissues that occur during embryogenesis. (2) Establishing neural stem cell lines in culture is equivalent to arresting the neural developmental process at the stem cell stage and accumulating the stem cells. In contrast, the stem cells in embryos proceed to neurogenesis differentiating neurons and glial cells.

This study highlighted the anteroposterior variations in the Wnt signal strength imposed on the embryonic CNS, which occur confined to the developmental stages of establishing the neural stem cell regional identities.

When the epiblast stem cells were placed in the neural stem cell-deriving culture condition, the cells developed as clumps in the first five days, without assuming a neural stem cell-like morphology. However, during this period, the epiblast-characteristic *Pou5f1* was already downregulated, and the neural-characteristic *Sox1* was activated. The above and other observations indicated that the neural characteristics and anteroposterior regional specificities were established earlier than the neural stem cell stabilization into cell lines, which occurred after three weeks.

The expression of the *Otx2* gene in the fore/midbrain and the *Hoxa* genes in the hindbrain and the spinal cord was investigated to identify the regional specificities associated with the individual neural stem cell lines. The analysis indicated that the neural stem cell lines established under the low, medium, and high Wnt condition bear the regional identities of fore/midbrain, hindbrain, and trunk spinal cord, respectively, of the ~E10.5 CNS (Fig. 1).

Moreover, the established anteroposterior regional specificity of the neural stem lines was stably maintained without relying on the subsequent Wnt signal levels. In embryos, the anteroposterior differences of Wnt signal inputs to the neural tissues occur before E10, but are then lost. Thus, both in vivo and in vitro, the differences in the Wnt signal inputs during the neural stem cell derivation provide the regional identity to the neural stem cells; once the stem cells are established, the regional identities are stably maintained regardless of the Wnt signal inputs at later stages.

2) Involvement of the transcription factor ZIC2 in the regulation of endoderm derivation from the epiblast

We have previously shown that epiblast stem cell aggregates cultured under a low-Wnt signal condition undergo cell rearrangements analogous to the node-proximal gastrulation upon transferring in the laminin-rich Matrigel matrix (Inamori, Fujii, et al., 2010). We also found that the endoderm-characteristic transcription factor gene *Sox17* was activated synchronously with the *Zic2* gene activation. We examined the consequence of *Zic2* knockout in the mouse embryos at the gastrulation stage to investigate the relationships between *Zic2* and *Sox17* gene functions.

We set up genetically engineered mouse lines where the *Zic2* gene is knocked out (ablated) in the *Foxa2*-expressing cells, the precursors for the endoderm development in the epiblast, to see the consequence of *Zic2* gene knockout in these cells. The mouse lines produced by genetic crossing harbored the tamoxifen-activatable recombinase gene *CreER* in the *Foxa2* locus and a *LoxP* sequence-flanked *Zic2* exon. Administration of tamoxifen to the pregnant mice allows inactivation of the *Zic2* gene in the *Foxa2*-expressing cells in developing embryos, the timing of which can be manipulated (Fig. 2).

Taking advantage of these mouse lines, we collected E6.5 embryos with *Zic2* knockout and immunostained for *SOX17* expression. The data showed that *Zic2* ablation in the *Foxa2*-expressing cells caused the *Sox17* downregulation, the gastrulation inhibition, and the endoderm loss in the embryos. These observations indicated that the transcription factor ZIC2 is involved in the endoderm genesis, and *Sox17* is downstream of *Zic2*.

4. 論文, 著書など 原著論文

Taira Y, Ikuta Y, Inamori S, Nunome M, Nakano M, Suzuki T, Matsuda Y, Tsudzuki M, Teramoto M, Iida H, Kondoh H.

The formation of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm causes ectopic lens development in hedgehog signaling-defective avian embryos. *Dev Dyn*. 2020 Dec;249(12):1425-1439. doi: 10.1002/dvdy.222.

Iwanami N, Takeshita K, Lawir DF, Suetake I, Tajima S, Sikora K, Trancoso I, ÓMeara C, Siamishi I, Takahama Y, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Yonezawa Y, Schorpp M, Boehm T. Epigenetic Protection of Vertebrate Lymphoid Progenitor Cells by Dnmt1. *iScience*. 2020 Jul 24;23(7):101260. doi: 10.1016/j.isci.2020.101260.

Inamori S, Fujii M, Satake S, Iida H, Teramoto M, Sumi T, Meno C, Ishii Y, Kondoh H. Modeling early stages of endoderm development in epiblast stem cell aggregates with supply of extracellular matrices. *Dev Growth Differ*. 2020 May;62(4):243-259. doi: 10.1111/dgd.12663.

Iida H, Furukawa Y, Teramoto M, Suzuki H, Takemoto T, Uchikawa M, Kondoh H. Sox2 gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2. *Genes Cells*. 2020 Apr;25(4):242-256. doi: 10.1111/gtc.12753.

5. 学会発表など

Yuki Taira, Yuya Ikuta, Machiko Teramoto, Mitsuo Nunome, Mikiharu Nakano, Takayuki Suzuki, Yoichi Matsuda, Masaaki Tsudzuki, Hisato Kondoh "The formation of multiple pituitary pouches from the oral ectoderm in hedgehog signaling-defective avian embryos causing ectopic lens development." 53rd Annual Meeting of JSDB, May, 2020, Kumamoto.

Hisato Kondoh, Hideaki Iida, Koya Yoshihi, Kagayaki Kato. "Live imaging of avian epiblast development using randomly or selectively marked cell populations." 53rd Annual Meeting of JSDB, May, 2020, Kumamoto.

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(B)

課題名：体細胞系列の選択的な発生をもたらすエピプラストの領域化と転写制御ネットワーク

研究代表者：近藤寿人、取得年度：2017-2020年度（4年）

2) 学外活動

近藤寿人

日本分子生物学会 Genes to Cells Associate Editor

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニワトリ・ウズラ」運営委員長

JST さきがけ「多細胞」領域 アドバイザー

JT 生命誌研究館顧問

International SOX Research Conference Steering Board



近藤寿人、藤井麻衣（白鳥研究室）、渡邊優作（板野研究室）