

発生生物学研究室 Laboratory of Developmental Biology

教授 近藤 寿人 Prof. Hisato KONDOH, Ph.D

助教 寺元 万智子 Assist. Prof. Machiko TERAMOTO, 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。

細胞が分化・発生というプロセス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、恒常性を維持するためには、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が重要である。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。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。

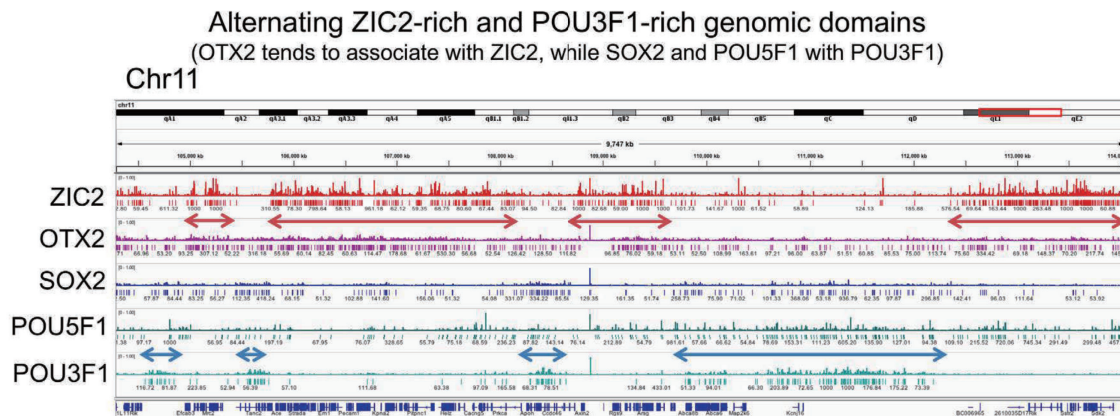
2. 本年度の研究成果

- (1) エピプラストの中に様々な領域が成立する過程が、さまざまな体細胞系列を発生させるための第一段階である。エピプラストの中にできる際立った構造は Node と原条である。マウスのエピプラスト幹細胞から、培養条件下で Node 様の組織状態を作り、それから内胚葉前駆体を効率よく作り出すための条件を検討した。それらの組織状態を生み出す、必要かつ最小限の条件として、3次元培養、Nodal 系シグナルの供給、Wnt シグナルの阻害が少なくとも必要であることがわかった。
- (2) エピプラスト状態を特徴づける転写因子に依存した制御を明らかにするために、エピプラスト幹細胞を用いて、そこで制御機能を発揮する主要な5つの転写因子、ZIC2、OTX2、SOX2、POU5F1、POU3F1 のゲノム上の結合部位を、ChIP-seq 法を用いて決定した。その結果、これまでの研究からは予想されなかった次の新しい知見が得られた。(1) ゲノムは、遺伝子密度が高く ZIC2 結合部位が豊富なメガベース(100万塩基対)程度の領域と、遺伝子密度が低く POU3F1 の結合部位が豊富な領域が交互に現れるモザイク状態からなっている。(2) エピプラスト幹細胞で遺伝子の活性化に関わる転写因子は、ZIC2 と OTX2 のペアによって活性化されている。(3) ES 細胞では、SOX2 と POU5F1 の転写因子ペアが主要な制御機能を担っているのに対して、エピプラスト幹細胞では ZIC2-OTX2 ペアが同様な制御機能を担うことを反映して、エピプラスト幹細胞での SOX2 や POU5F1 の結合領域は、ES 細胞における結合領域とは大きく異なる。
- (3) Node からは、脊索と内胚葉が発生するが、内胚葉は転写因子 SOX2 を発現して食道から胃にかけての消化管へと発生する領域、CDX2 を発現して腸へと発生する領域、NKX2.1 を発現して気管ならびに肺に発生する領域に分かれる。この内胚葉で Sox2 遺伝子を失活させると内胚葉の発生がどのように変化するのかを、マウス胚を用いて解析した。SOX2 の発現がなくなっても、内胚葉全体が腸に変わることはないが、発生する食道が気管の性質を持つようになることがわかった。
- (4) エピプラスト幹細胞から効率よく神経幹細胞株を樹立する方法を確立した。神経幹細胞株を樹立する過程での Wnt シグナルの強度を操作すると、胚の中樞神経系の前後の領域に対応したさまざまな領域特性を持った神経幹細胞株を樹立することができた。低 Wnt 条件は、頭部に対応した (Otx2 発現) 細胞株を生み、Wnt が高いと体幹部に対応した (Hox 発現) 細胞株を生み出した。ひとたび領域特性が確立されると、いずれの株も培養条件の Wnt シグナル強度を変化させてもその領域特性は安定に維持され、分化条件に移すと、領域特性を持ったまま、ニューロン、Astrocyte、Oligodendrocyte に分化した。
- (5) 低頻度で水晶体を生む平板培養された網膜細胞に Notch シグナルの阻害剤を加えると、網膜細胞の大半が水晶体に分化することを見出し、その過程を解析した。Notch シグナルの阻害に引き続いて、Prox1、Pitx1 など、水晶体発生の初期過程を司る転写因子が発現された。この研究の結果、網膜自体に水晶体への潜在的な分化能が潜在しており、それが正常網膜発生では Notch シグナルなどの細胞間相互作用によって抑制されていること、その抑制が解除されると水晶体への分化が起きることを示した。つまり、発生過程での特定の細胞系譜は、複数の異なった細胞種への分化能を生むことがあるが、その場合には抑制機構によって見かけ上一義的な分化がもたらされている。

3. Research projects and annual reports

We investigate the functions of major transcription factors (TFs), e.g., SOX2 and signaling factors, e.g. Wnts, in epiblast cells and in the derivations of somatic cell lineages from the epiblast. The strategies include: (1) Use of conditional knockout mouse embryos that allow inactivation of specific TFs in defined cell groups and/or developmental stages; (2) Use of epiblast stem cell lines derived directly from mouse embryo epiblasts to analyze the process of regionalization of the epiblast cell sheet in vitro; (3) Derivation of stem cell lines representing an intermediate step of somatic development from the epiblast stem cells, in order to investigate the somatic lineage regulations.

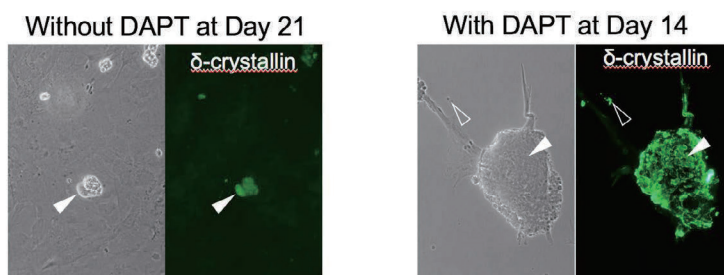
- (1) The first step in the specification of somatic cell lineage is the regionalization of the epiblast cell sheet. The most prominent regional structures are the Node and the primitive streak. Starting from the epiblast stem cells in culture, we investigated the conditions under which cell organization representing Node-streak structures are formed and endoderm tissues are derived. We found that the three-dimensional culture of epiblast stem cells, low Wnt signaling, and high Nodal signaling are the minimal requirement for the formation of such cell organization.
- (2) To obtain an insight into the transcription factor (TF)-dependent regulation of epiblast stem cells (EpiSCs), we performed ChIP-seq analysis of the genomic binding sites in EpiSCs of five major TFs, ZIC2, OTX2, SOX2, POU5F1, and POU3F1, using biotinylated TF. We identified the following new features: (1) The genomic domains of megabase scale rich in ZIC2 peaks and genes, and those rich in POU3F1 but sparse in genes, alternate in EpiSCs, reflecting the clustering of regulatory regions that act in short- and long-ranges, which involve binding of ZIC2 and POU3F1, respectively. (2) The enhancers bound by ZIC2 and OTX2 prominently regulate TF genes in EpiSCs. (3) The binding sites for SOX2 and POU5F1 in mouse ESCs and EpiSCs are divergent, reflecting the alteration of the TF pair of major regulatory functions from SOX2/POU5F1 in ESCs to OTX2/ZIC2 in EpiSCs.



- (3) The endoderm that is derived from the node is regionalized with expression of the transcription factors Sox2 (esophagus and stomach precursor), Cdx2 (gut precursor) and Nkx2.1 (trachea and lung precursor). Conditional knockout of Sox2 in the endoderm resulted in transformation of the esophagus into trachea-like tissue, whereas gut development was not affected.
- (4) We established NSC lines from EpiSCs via passages in a serum-free culture condition. The NSC lines thus established produced neurons, astrocytes, and oligodendrocytes under differentiation conditions. We also established NSC lines with addition of either Wnt antagonist or Wnt agonist to the culture medium. Microarray analyses focusing on transcription factor transcripts indicated that NSC lines

established under low- and high-Wnt conditions had characteristics of anterior and posterior CNS, marked by the expression of *Otx2* and *Hox* genes, respectively. Our results suggest that the manipulation of extracellular signals during the NSC derivation allows the establishment of NSC lines harboring various regional specificities.

Neural retina-derived lens cells expressing δ -crystallin



(5) Embryonic neural retinas of avians produce lenses in culture, which is a paradigm of trans-differentiation. Retina-to-lens transdifferentiation occurs in spreading cultures, suggesting it is triggered by altered cell-cell interactions. Addition of Notch signal inhibitors strongly promoted lens development from the neural retina. After Notch

signal inhibition, transcription factor genes that regulate the early stage of eye development, *Prox1* and *Pitx3*, were sequentially activated. These observations indicate that the lens differentiation potential is intrinsic to the neural retina, and this potential is repressed by Notch signaling during normal embryogenesis.

4. 論文、著書など

原著論文

Iida H, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens transdifferentiation. *Dev Biol*. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.11.004. Epub 2016 Nov 11.

Menuchin-Lasowski Y, Oren-Giladi P, Xie Q, Ezra-Elia R, Ofri R, Peled-Hajaj S, Farhy C, Higashi Y, Van de Putte T, Kondoh H, Huylebroeck D, Cvekl A, Ashery-Padan R. Sip1 regulates the generation of the inner nuclear layer retinal cell lineages in mammals. *Development* 143, 2829-2841 (2016).

Teramoto M, Kudome-Takamatsu T, Nishimura O, An Y, Kashima M, Shibata N, Agata K. Molecular markers for X-ray-insensitive differentiated cells in the Inner and outer regions of the mesenchymal space in planarian *Dugesia japonica*. *Dev Growth Differ*. 58, 609-619 (2016).

Kondoh H, Takada S, Takemoto T. Axial level-dependent molecular and cellular mechanisms underlying the genesis of the embryonic neural plate. *Dev Growth Differ*. 58, 427-436 (2016). (総説)

Takemoto T, Abe T, Kiyonari H, Nakao K, Furuta Y, Suzuki H, Takada S, Fujimori T, Kondoh H. R26-WntVis reporter mice showing graded response to Wnt signal levels. *Genes Cells*. 21, 661-669 (2016).

Yasumi T, Inoue M, Maruhashi M, Kamachi Y, Higashi Y, Kondoh H, Uchikawa M. Regulation of trunk neural crest delamination by δ EF1 and Sip1 in the chicken embryo. *Dev Growth Differ*. 58, 205-214 (2016).

著書

Uchikawa M, Nishimura N, Iwafuchi-Doi M, Kondoh H. Enhancer analyses using chicken embryo electroporation. In "Methods in Molecular Biology – Avian and Reptilian Developmental Biology" (Sheng G, eds) Springer (in press).

5. 学会発表など

Kondoh H et al. Functional genomics of peri- and post-implantation stage stem cells. The 39th Annual Meeting of Molecular Biology Society Japan. Yokohama, 12.2 (2016).

Iida T, Ishii Y, Kondoh H. Intrinsic lens potential of neural retina inhibited by Notch signaling as the cause of lens

transdifferentiation. The 39th Annual Meeting of Molecular Biology Society Japan. Yokohama, 12.1 (2016).

近藤寿人 ヘンゼン結節周辺組織の発生能の再検討. 日本発生生物学会秋季シンポジウム. 三島市 10.20 (2016).

飯田英明 神経性網膜に内在する水晶体分化能を抑制する Notch シグナル: その破綻が水晶体への「分化転換」をもたらす. 日本発生生物学会秋季シンポジウム. 三島市 10.19 (2016)

Kondoh H. Functional genomics of peri- and post-implantation stage stem cells. IRM Distinguished Lecture, University of Pennsylvania Institute for Regenerative Medicine. 6.29 (2016). (招待講演)

Kondoh H., Matsuda K, Mikami T, Oki S, Shigenobu S. Genome-wide functional interactions of five major transcriptional factors in mouse epiblast stem cells. Cell Symposia: Transcriptional Regulation in Development and Disease. Chicago, 6.26-28, 2016

Iida H., Ishii Y., Kondoh H. Simultaneous promotion of neuronal and lens development from chicken embryonic neural retina. 第49回日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Yoshihi K., Ishii Y., Kondoh H. Reinvestigation of the developmental potential of grafted Hensen's node. 第49回日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Nakamura K., Boitet C., Satake S., Yoshihi K., Ishii Y., Kondoh H. Direct derivation of embryonic neural progenitor cell lines from epiblast stem cells. 第49回日本発生生物学会年会. 東京都 6.2 (2016).

Kondoh H. Molecular and cellular mechanisms underlying lens transdifferentiation from embryonic neural retina. Avian Model Systems 9. Taipei, Taiwan, 2016.3.28-31. (招待講演)

6. その他特記事項

外部資金

科学研究費補助金 基盤研究(A) 課題名: エピプラストから多様な体細胞系列を生み出す遺伝子制御ネットワークの解析 研究代表者: 近藤寿人、取得年度: H26-28年(3年)

学外活動

近藤寿人

日本発生生物学会 Development Growth and Differentiation 副編集長

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

International Society of Differentiation, Board of Directors

日本学術会議 連携会員 発生生物学分科会委員長

日本学術振興会 科学研究費委員会専門委員

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

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 運営委委員

大阪大学大学院生命機能研究科 招へい教授

