

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16148

研究課題名(和文)内胚葉から食道領域が間充織とともに作り出される機構

研究課題名(英文)Developmental mechanisms of the epithelial and the mesenchymal components of the esophagus and trachea from the endoderm

研究代表者

寺元 万智子(Teramoto, Machiko)

基礎生物学研究所・再生生物学研究室・特別協力研究員

研究者番号：10793747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：通常は内胚葉由来の頭側前腸から食道と気管が分岐して発生する。内胚葉で転写因子SOX2が欠失したマウス胚では、咽頭から胃までを一本の管が繋ぎ、管中央からは左右に一对の気管支が発生した。管の上皮は呼吸器の性質を示す転写因子NKX2.1を発現し、咽頭から中央までの前側の管は気管、中央から胃までの後側の管は気管支の性質を持っていた。上皮周囲の間充織(SOX2は発現しない)の性質を調べると、上皮の性質に合わせた間充織が発生していた。多くの組織の発生において間充織が上皮の性質を決定する例がよく知られているが、本研究は上皮が間充織の性質を決定する具体例を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに行われてきた研究では、『食道の腹側から気管がどのようにして発生するか』、『気管から肺に至る組織の発生過程での間充織の効果』が多くの研究の対象であり、『食道自体』の発生を制御する機構についての研究は未だ断片的である。さらに、頭側の消化管上皮の性質は周囲の間充織の性質によって決定されることを示す研究が多かった。

本研究により、内胚葉で発現するSOX2が内胚葉を食道に発生させ、呼吸器の性質を持つ上皮によって間充織の性質も呼吸器に発生することの具体例を示し、上皮と間充織が相方向に作用することを明らかにした。

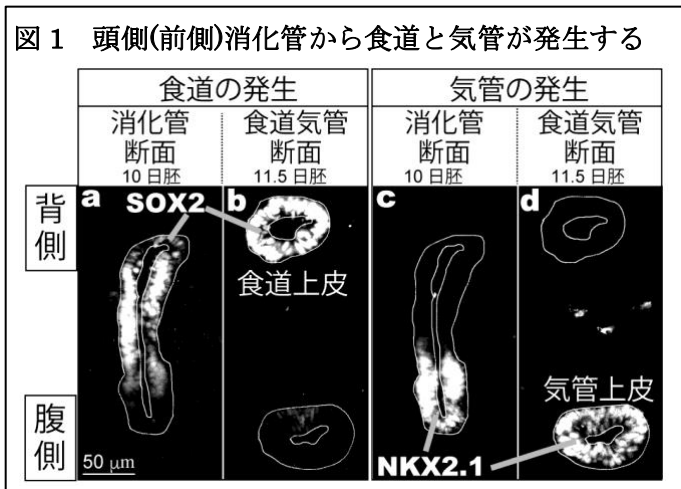
研究成果の概要(英文)：In the anterior foregut (AFG) of mouse embryos, the transcription factor SOX2 is expressed in the epithelia of the esophagus, and NKX2.1 is expressed in the epithelia of respiratory organs. In the absence of SOX2 expression in the endodermal epithelium, a single epithelial tube, which had the respiratory character, connected the pharynx and the stomach, and a pair of bronchi developed in the middle of the single tube. In addition, the mesenchyme surrounding the single tube assumed the respiratory character. The impact of mesenchyme-derived signaling on the early stage of AFG epithelial specification has been indicated. This study demonstrated the epithelial tissue specification causes concordant changes in mesenchymal tissues, indicating a reciprocity of epithelial-mesenchymal interactions.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 内胚葉 SOX2 食道 気管 AFG

1. 研究開始当初の背景

原腸陥入によって生まれる内胚葉は、マウス 7.5 日胚ではシート状である。内胚葉全体で転写因子 FOXA2 が発現され、その頭側で SOX2 が発現される。9.5-10 日胚に達すると内胚葉が管状になり前腸上皮に発生する。食道と呼吸器は、内胚葉に由来する AFG (Anterior foregut; 前腸の頭側) から発生する。AFG 上皮では、背側で SOX2 (図 1-a)、腹側で NKX2.1 (図 1-c) という異なる転写因子が発現される。11.5 日胚では、SOX2 を発現する消化管の背側から食道が (図 1-b)、NKX2.1 を発現する腹側から気管 (図 1-d) が発生する。SOX2 は内胚葉由来の上皮組織でのみ発現し、間充織では SOX2 の発現はない。



7.5 日胚では AFG を含む前側の内胚葉で SOX2 が発現し、9.5 日胚では将来食道を形成する背側で SOX2 が発現するが、将来呼吸器を形成する腹側では SOX2 の発現が抑制される。11.5-12.5 日胚になると呼吸器上皮で SOX2 の発現が再開する。このように、内胚葉および内胚葉由来の組織では、SOX2 の発現パターンはダイナミックに変動し、食道と呼吸器の発生に深く関与することが考えられた。

これまでに、SOX2 の発現量を胚全体で 50-10%に低下させたマウスで、食道と気管の分岐が異常になることや、食道の上皮の性質が食道と気管の性質を併せ持つことが以前に報告されていた (Que et al., 2007)。しかし、Sox2 遺伝子は腸管前部の上皮 (内胚葉由来) だけでなく、受精卵、神経系を含む多数の組織で発現し、SOX2 の活性を内胚葉で、しかも完全に失わせたわけではなかったため、食道と気管の発生に限定した SOX2 の役割を厳密に調べる必要があった。

2. 研究の目的

これまでに行われていた研究の弱点をなくし、食道と気管の発生に限定した SOX2 の役割を厳密に調べるために Foxa2 遺伝子が発現する内胚葉で Sox2 遺伝子を失活させることができるマウスを使用し、食道と気管の発生に限定した SOX2 の役割を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の方法

内胚葉全体で発現される転写因子 Foxa2 に EGFP と CreER のコード領域が挿入されたノックイン Cre driver を、floxed Sox2 ホモ接合体に導入したマウスを研究に使用した (図 2 参照)。Foxa2 遺伝子が発現する内胚葉で CreER と EGFP が発現している。タモキシフェンを妊娠メスに投与すると、CreER が活性化され、Sox2 遺伝子が内胚葉で不活性化される。本研究では、内胚葉が形成される E7.5、内胚葉が管状になる E8.5 に母獣にタモキシフェンを経口投与して SOX2 を失活させた。食道と呼吸器の形態がはっきりする E12.5-13 の胚を採取し、食道と呼吸器組織の性質を詳しく調べた。



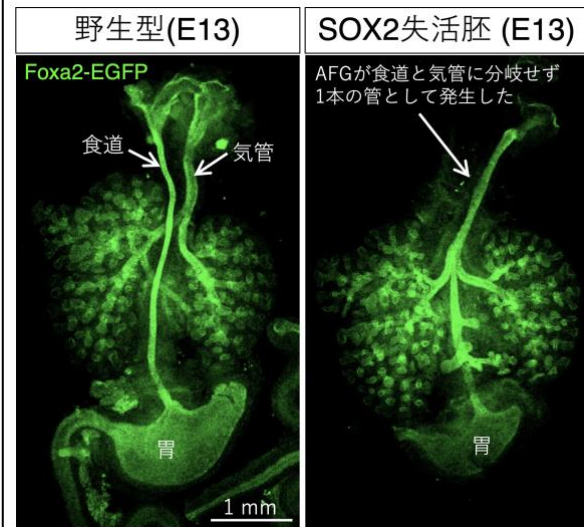
#### 4. 研究成果

(1) 転写因子 SOX2 を内胚葉で失活させると、AFG が気管と食道に分岐せずに、咽頭から胃までがつながった一本の管として発生し、その管の上皮全体が呼吸器の性質に発生する。SOX2 が発現する上皮だけでなく、その上皮を取り囲む間充織 (SOX2 を発現していない) の性質も呼吸器の性質に発生する

転写因子 SOX2 を内胚葉で失活させると、AFG (Anterior foregut; 前腸の頭側) が気管と食道に分岐せずに、咽頭から胃までがつながった一本の管として発生することがわかった (図 3 参照)。SOX2 が失活した AFG の上皮は呼吸器上皮で発現する転写因子 NKX2.1 を発現し、呼吸器の性質を持つことがわかった。AFG 上皮の周囲を取り囲む間充織 (SOX2 は発現していない) では、転写因子 SOX9 を発現する軟骨前駆細胞と、平滑筋の分布が呼吸器の間充織の特徴と同一のパターンであることから、間充織も呼吸器の性質に発生したことがわかった。

通常呼吸器では、頭側に気管が形成され、その後側では左右に分岐して気管支が形成され、気管と気管支はそれぞれ異なる性質を持つ。次に、SOX2 を失活させた AFG 上皮が気管と気管支のどちらの性質を持つかを調べた。通常、転写因子 SOX9 は、気管上皮では発現せず、気管支先端の上皮で発現する。SOX2 を失活させた AFG 上皮の前側では SOX9 は発現しておらず、後側の上皮では SOX9 が発現しており、前側上皮は気管、後側上皮は気管支の性質に発生していることがわかった。次に、間充織の性質を調べた。通常、

図 3 内胚葉で SOX2 が失活すると AFG が 1 本の管として発生した



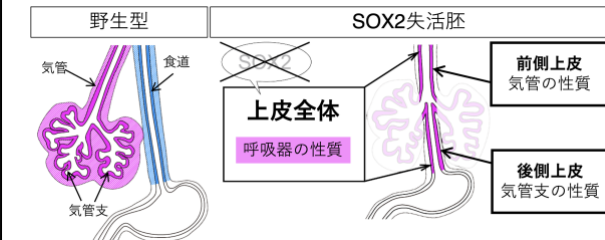
(左) 野生型胚組織 (13 日胚)、(右) Sox2 が失活した変異体胚組織 (13 日胚)。CreER と共にノックインされた EGFP が内胚葉で発現するため上皮の構造が観察できる。(図 2 参照)

図 4 Sox2 遺伝子が失活した AFG の上皮と間充織は呼吸器の性質に発生した

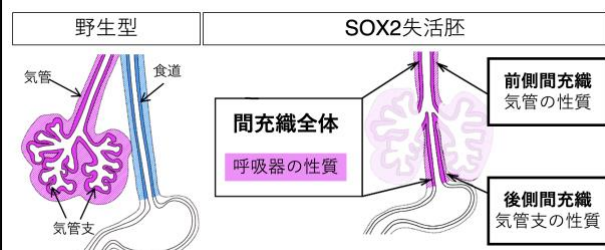
内胚葉で Sox2 遺伝子を不活化すると、AFG の上皮だけでなく、間充織も呼吸器 (気管+気管支) の性質になる。

AFG の上皮の前側は気管、後側は気管支の性質を持つ (4-a)。この上皮の領域性の違いは、間充織の性質に忠実に反映されていた (4-b)。

#### 4-a ; 上皮の性質まとめ



#### 4-b ; 間充織の性質まとめ

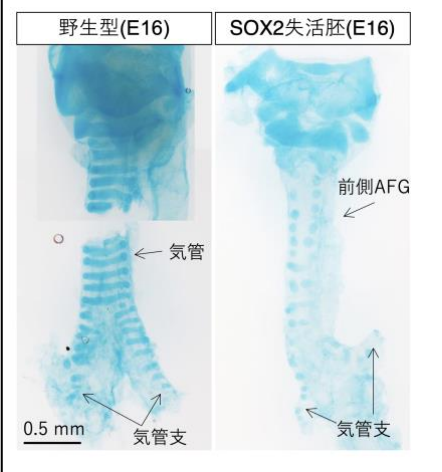


転写因子 *Hoxb6* は、気管の間充織では発現せず、気管支間充織の先端で発現する。SOX2 を失活させた AFG 間充織の前側では *Hoxb6* は発現しておらず、後側の間充織では *Hoxb6* が発現していた。これらのことから、SOX2 を失活させた AFG 上皮の前側は気管の性質を持ち、後側では気管支の性質を持っていること(図 4-a 参照)、前側上皮周辺の間充織は気管、後側の間充織は気管支の性質を持つこと(図 4-b 参照)を示し、上皮の性質の細やかな違いが忠実に間充織の性質にも反映されていることを明らかにし、これらの成果をまとめた論文を発表した (Teramoto et al., 2019)。

## (2) 上皮の SOX2 の発現が、間充織における軟骨の成熟に関与する可能性が示唆された

### 図 5 SOX2 が失活した 16 日胚の前側 AFG 間充織では軟骨が形成されていなかった

野生型 16 日胚の気管 (左) と、SOX2 が失活した 16 日胚の前側 AFG (右) のアルシアンブルー染色。野生型胚では間充織に形成される軟骨 (青) がリング状に観察できるが、SOX2 失活胚の AFG 間充織にはリング状の軟骨が形成されていない。



内胚葉が作られる 7.5 日胚の時から内胚葉で SOX2 を失活させ、11-13 日胚の組織について研究を行った。その結果、11-13 日胚の、特に気管の性質を持つ前側の AFG の間充織は、平滑筋の分布と軟骨前駆細胞で発現する転写因子 SOX9 の発現が、野生型の間充織とほぼ同様のパターンであることが観察されていた。しかし、16 日胚では、野生型では通常形成されているリング状の軟骨が、SOX2 失活胚組織では観察されなかった。この結果は、上皮での SOX2 の発現が、食道の形成だけでなく、呼吸器の間充織における軟骨の成熟に関与することを示している。

## (3) エピプラスト幹細胞から内胚葉系オルガノイドへの分化誘導系の確立

研究協力者及び大学院生により、エピプラスト幹細胞から内胚葉系オルガノイドへの分化誘導系が確立され、その成果をまとめた論文が発表された (Inamori et al., 2020)。SOX2 を失活させた胚組織の入手効率が非常に低いことから、組織ではなく培養細胞を用いることで、上皮から間充織へとはたらきかける因子を探索するために非常に有用な実験系となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Teramoto M, Sugawara R, Minegishi K, Uchikawa M, Takemoto T, Kuroiwa A, Ishii Y, Kondoh H.	4. 巻 9
2. 論文標題 The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Open.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.048728.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inamori S, Fujii M, Satake S, Iida H, Teramoto M, Sumi T, Meno C, Ishii Y, Kondoh H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Modeling early stages of endoderm development in epiblast stem cell aggregates with supply of extracellular matrices.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12663.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Teramoto M, Sugawara R, Kuroiwa A, Ishii Y, Kondoh H
2. 発表標題 Endodermal SOX2 expression determines the esophagus character of the anterior foregut in both epithelial and mesenchymal components
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teramoto M, Sugawara R, Kuroiwa A, Ishii Y, Kondoh H
2. 発表標題 The absence of SOX2 in the anterior foregut alters the esophagus into trachea and bronchi in both epithelial and mesenchymal components.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	近藤寿人  (Kondoh Hisato)		
研究協力者	飯田 英明  (Iida Hideaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------