

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22247035

研究課題名(和文) 胚発生と対応する幹細胞群を活用した、神経系原基形成の遺伝子制御ネットワークの研究

研究課題名(英文) Gene regulatory network governing the neural plate development from the epiblast

研究代表者

近藤 寿人 (KONDOH, Hisato)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：70127083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,500,000円、(間接経費) 10,050,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞系列の前駆体であるエピブラストから神経板(神経系原基)が生まれるプロセスを、Sox2エンハンサー欠損マウス胚やエピブラスト幹細胞を活用して研究した。N2エンハンサーが活性を持つ前部神経板は、神経系発生の促進と、他の細胞系列を抑制する転写制御とが同時に作動することによって、エピブラストから直接生まれる。一方、N1エンハンサーが活性を持つ後部神経板は、中胚葉と神経板の共通の前駆体である「体軸幹細胞」から発生すること、Tbx6に依存したN1の抑制によって中胚葉が生まれることがわかった。これらの知見は、体細胞系列分離に関する三胚葉説をはじめとする旧説を根本から塗り替えるものである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the regulatory mechanisms that underlie the derivation of the neural plates (neural precursors) from the pan-somatic tissue precursor epiblast. We took advantage of mutant mouse embryos and epiblast stem cells under culture conditions. The anterior neural plate, as marked by Sox2 N2 enhancer activity, was derived directly from the epiblast through the cooperative action of transcription factors that promote neural development but repress the development of all non-neural lineages. By contrast, the posterior neural plate, as marked by Sox2 N1 enhancer activity, developed through neuro-mesodermal bipotential precursors named "axial stem cells". Tbx6-dependent repression of the N1 enhancer was required for mesodermal development. These new findings revise the classical view of somatic cell lineage separation, where germ layer separation was assumed to be the essential first step.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：エピブラスト 前部神経板 後部神経板 転写因子 Sox2 幹細胞 原腸陥入

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の体の組織のすべては、着床後に行われるエピブラスト(胚盤葉上層)に由来する。そしてエピブラストから原腸陥入期に最初に作られるのが神経系原基である。神経系原基はエピブラストからどのようにして作られるのか?これは、胚体の発生を出発させる根幹とも言うべき重要なプロセスであるのもかわらず、それを制御する遺伝子制御ネットワークはほとんど研究されていない。このことが、現在の幹細胞科学において、幹細胞から特定の細胞種を生み出すための方法論が脆弱にとどまっている原因でもある。

### 2. 研究の目的

本研究では、転写制御因子のノックアウトマウスや、エピブラストを直接培養条件下で株化したエピブラスト幹細胞を活用して、胚の体細胞組織の発生を出発させるプロセスとその制御を解明する。培養条件下でエピブラスト幹細胞から派生するさまざまな幹細胞集団の中から、神経系をはじめとする個別の細胞系列や各々の発生段階に対応した細胞集団を特定し、それらが新しい発生段階に遷移するのを促す、遺伝子制御ネットワークを明らかにする。転写因子群の作動状態の分析と、転写因子活性の操作を組み合わせ、原腸陥入期における神経系原基の形成(神経系原基の生成、領域特性の成立、そして神経系原基の発生の進行)を支配する、遺伝子制御ネットワークの全体像を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ノックアウトマウス胚を用いた研究: Sox2 遺伝子のエンハンサーに関するノックアウトマウス胚、Tbx6 のノックアウト胚、それらの交配によって得られたダブルノックアウト胚の神経系の発生を解析した。

(2) マウス胚のエピブラストと、培養されたエピブラスト幹細胞の比較: 正常マウス円筒胚のエピブラストを単離し、異なった培養条件下におけるエピブラスト幹細胞との類似性や相違点を cDNA のマイクロアレイ解析によって検討した。

(3) エピブラスト幹細胞の操作による転写因子ネットワークの解析: エピブラスト幹細胞の状態、あるいはエピブラスト幹細胞から前部神経板への遷移状態において、特定の転写因子の過剰発現あるいはノックダウンを行

って、それらが他の転写因子の発現に与える影響を系統的に分析した。

(4) 転写因子と制御標的の相互作用の研究: ビオチン化転写因子を用いて ChIP-seq (クロマチン免疫沈降-塩基配列決定)解析を行い、エピブラスト幹細胞の全ゲノム上の転写因子結合部位を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 前部神経板と後部神経板の形成機構の比較と解析

エピブラストから、神経系の原基である神経板が生み出されるための、幹細胞群の制御機構を研究した。その制御機構は、前部神経板 (Sox2 遺伝子の N2 エンハンサーが関与) と後部神経板 (Sox2 遺伝子の N1 エンハンサーが関与) とで全く異なっていた。

エピブラスト幹細胞株を用いて、エピブラストから前部神経板に発生する過程を解析した。このプロセスは中間段階を経ない、細胞の直接的な変化によるものである。その間に、主要な Pou 転写因子が、Pou5f1(Oct3/4) から Pou3f1(Oct6)をへて Pou3f2(Brn2)に置き換わることが、重要な転写制御の変化である。転写因子遺伝子 Sox2 の発現が、Pou 因子の作用に依存した N2 エンハンサーの活性によって維持される必要があるが、異なった Pou 因子がその活性をリレーする形で N2 エンハンサーの活性を確保している。

後部神経板は、エピブラストから直接に生み出されるのではなく、神経板と沿軸中胚葉の共通の前駆体である「体軸幹細胞」の状態を経る。体軸幹細胞は、ノードよりも後側に位置し、原条の両側に配置される上層の細胞群である。N1 エンハンサーは、体軸幹細胞で活性を持つが、その細胞群のうち、原条を通して中胚葉層(中間層)に移行(原腸陥入)した細胞では、N1 の活性が遮断される。

Tbx6 遺伝子のノックアウトマウス胚では、沿軸中胚葉のかわりに脊髄が発生するという現象(図1)を手がかりにして、体軸幹細胞

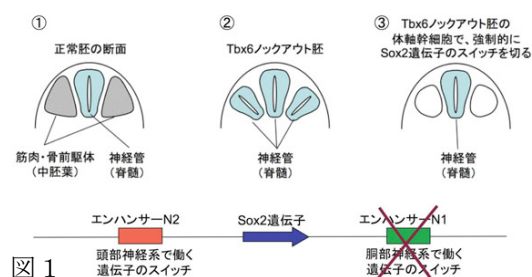


図1

胞の制御を明らかにした。*Tbx6* ノックアウト胚では、体軸幹細胞が、中胚葉層に移動したあとも N1 エンハンサーの活性が遮断されることなく持続してしまった結果、*Sox2* が発現されて異所的な脊髄を作る。野生型胚の中間層で *Sox2* を強制発現すると、*Tbx6* が働いている状況下でも、*Sox2* の作用によって中間層で神経系を生み出すことができる。*Tbx6* は、N1 エンハンサーの活性を抑制する作用と、中胚葉を生み出す作用をあわせ持つ。体軸幹細胞では、*Sox2* と *Tbx6* という2つの転写制御因子の活性のせめぎ合いの結果によって、後部神経板、沿軸中胚葉への発生が選択される。

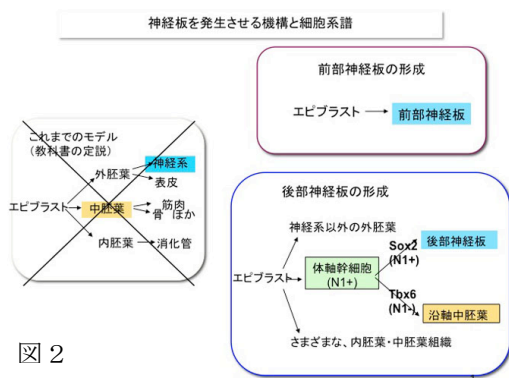


図 2

以上の研究成果 (図 2) は、体細胞系列の派生に関して、これまでに普及していた「三胚葉モデル (まず組織が三胚葉に分かれることが、細胞系列分岐に必須の初期過程であるというモデル)」を否定するものである。エピプラストからさまざまな体細胞系列を派生する機構については、根本から再検討する必要がある。

## (2) 前部神経板形成に関わる遺伝子制御ネットワークの解析

まずエピプラスト幹細胞を維持するための培養条件、つまり「アクチビンと FGF の存在下でファイブロネクチン処理培養皿を用いる」から、神経板状態をもたらす培養条件つまり「アクチビン、FGF 非存在下でジェラチン処理培養皿を用いる」に条件を変えた時に 24 時間以内の短期間における転写制御状態の変動を、マウス胚の中の変化と対応づけた。その結果、エピプラスト幹細胞は E6.5 のエピプラストに、上記の条件下でもたらされる神経板状態の細胞は E7.5 の前部神経板にほぼ対応することが確認された。この状態遷移に関わる転写制御機構を調べる目的で、

複数の転写制御因子の過剰発現と発現抑制の効果と比較しながら解析した。その結果、エピプラスト状態からの脱却には、*Pou5f1* の活性低下がきっかけをあたえること、神経板の成立には *Zic* 属の転写制御因子が必要であること、神経板に前部神経板としての性質を与える上で、*Otx2* が大きな働きをしていることなどが明らかになった。とりわけて、*Zic* 属転写因子が、神経板の発生に必須の制御機能を持っていることが見いだされたのが重要である。*Zic2/3* は、神経板発生の中核となる転写因子の発現を活性化するだけでなく、中胚葉系、内胚葉系の組織の発生に必須な転写因子の発現を強く抑制する。*Sox2*, *Otx2* などの転写因子も、特定の発生過程を促進する一方で、他の細胞系列への発生を抑制する活性を持っており、前部神経板がエピプラストから発生する過程においては、前部神経板以外の細胞系列への発生がすべて抑制されていた (図 3)。このことを一般化すれば、エピプラストから特定の系列の体細胞組織が発生するためには、他の細胞系列への発生を抑制する機構が重要だということを示唆している。

エピプラストからの前部神経板に限定した発生を実現する転写制御因子の促進機能と抑制機能の組み合わせ

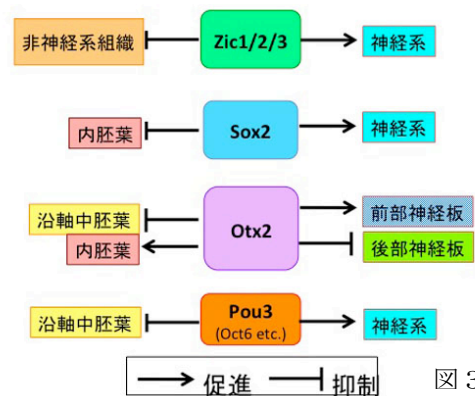


図 3

## (3) 前部神経板の領域化機構

前脳前端部の前駆体に対応する前部神経板の再前端のサブドメインは、マウス8日胚の段階で転写因子 *Hesx1*, *Six3* が発現される。この状態の細胞を検出するためのレポーター遺伝子を開発した。*Hesx1* 遺伝子の5'側に位置するエンハンサーによってEGFPを発現させたところ、トランスジェニックマウス胚で *Hesx1* の発現特異性が再現された。

このレポーター遺伝子を用いて、エピプラスト幹細胞から開始した神経板発生の2日目に前脳前端部の前駆体が効率よく発生する条件を探した。その結果、Wnt阻害タンパク質であるDkk1の強制発現や、薬理的なWntシグナル阻害剤を用いて、エピプラスト幹細胞に内在するWntシグナルの作用を低下させると、効率よく前脳前端部の前駆体を発生させることができた。実際7日胚では、前部神経板の再前端を裏打ちする始原内胚葉でDkk1が発現されており、この発現が前部神経板の最前端を前脳前端部の前駆体へと発生させていることが示された。

#### (4) 転写因子のゲノム上の制御標的の解析

エピプラスト幹細胞から前部神経板を生ずる過程で、Sox2、Pou5f1などの主要な転写因子がゲノム上のどの遺伝子群を制御標的にし、また発生過程で制御標的遺伝子をどのように変化させるのかを明らかにするために、in vivo ビオチン化転写因子を用いたChIP-seq法を開発した。それをエピプラスト幹細胞に対して適用したところ、Sox2、Pou5f1が結合するゲノム部位は、ES細胞の場合と一部重複しながらも全体としては大きく異なることがわかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

- ① Matsuda K, Kondoh H. Dkk1-dependent inhibition of Wnt signaling activates Hesx1 expression through its 5' enhancer and directs forebrain precursor development. *Genes Cells*. 19, 374-385 (2014). doi: 10.1111/gtc.12136. 査読有り
- ② Yoshida M, Uchikawa M, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Takemoto T, Kondoh H. Regulation of mesodermal precursor production by low-level expression of B1 Sox genes in the caudal lateral epiblast. *Mech Dev*. 132, 59-68 (2014). doi: 10.1016/j.mod.2014.01.003. 査読有り
- ③ Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* 140, 4129-4244 (2013). doi: 10.1242/dev.091793. 査読有り
- ④ Evsen, L., Sugahara, S., Uchikawa, M., Kondoh, H., Wu, DK. Progression of neurogenesis in the inner ear requires inhibition of Sox2 transcription by neurogenin1 and neurod1. *J Neurosci*. 33, 879-890 (2013). doi: 10.1523/JNEUROSCI.4030-12.2013. 査読有り
- ⑤ Nishimura, N., Kamimura, Y., Ishida, Y., Takemoto, T., Kondoh, H., Uchikawa, M. A systematic survey and characterization of enhancers that regulate Sox3 in neurosensory development in comparison with Sox2 enhancers. *Biology* 1, 714-735 (2012). doi:10.3390/biology1030714. 査読有り
- ⑥ Kondoh, H., Takemoto, T. Axial stem cells deriving both posterior neural and mesodermal tissues during gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* 22, 374-380 (2012). doi: 10.1016/j.gde.2012.03.006. 査読有り
- ⑦ Iwafuchi-Doi, M., Matsuda, K., Murakami, K., Niwa, H., Tesar, P. J., Aruga, J., Matsuo, I., Kondoh, H. Transcriptional regulatory networks in epiblast cells and during anterior neural plate development as modeled in epiblast stem cells. *Development* 139, 3926-3937 (2012). doi: 10.1242/dev.085936. 査読有り
- ⑧ Uchikawa, M., Yoshida, M., Iwafuchi-Doi, M., Matsuda, K., Ishida, Y., Takemoto, T., Kondoh, H. B1 and B2 Sox gene expression during neural plate development in chicken and mouse embryos: universal versus species-dependent features. *Dev Growth Differ* 53, 761-771 (2011). doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01286.x. 査読有り
- ⑨ Takemoto, T., Uchikawa, M., Yoshida, M., Bell, D. M., Lovell-Badge, R., Papaioannou, V. E., Kondoh, H. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature* 470, 394-398 (2011). doi: 10.1038/nature09729. 査読有り
- ⑩ Iwafuchi-Doi, M., Yoshida, Y., Onichtchouk, D., Leichsenring, M., Driever, W.,

Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H. The Pou5f1/Pou3f- dependent but SoxB-independent regulation of conserved enhancer N2 initiates Sox2 expression during epiblast to neural plate stages in vertebrates. *Dev Biol* 352, 354-366 (2011). doi: 10.1016/j.ydbio.2010.12.027. 査読有り

- ⑪ Kondoh, H., Kamachi, Y. SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 391-399 (2010). doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.003. 査読有り

[学会発表] (計 3 2 件)

- ① Kondoh, H. Inhibitory mechanisms required for deriving specific somatic lineages from the epiblast. The 61<sup>st</sup> NIBB conference “Cellular Community in Mammalian Embryogenesis”. Okazaki, Japan, July 10-12 (2013).
- ② Kondoh H. Distinct regulatory mechanisms for the genesis of anterior and posterior neural plates, the primordia for brain and spinal cord. “Symposium on Sensory Systems & Neural Circuits” Tokyo, Japan, Feb 11-12 (2013).
- ③ Kondoh H. Distinct regulatory mechanisms for the genesis of anterior and posterior neural plates. Hong Kong Society for Developmental Biology Symposium “From Embryology to Disease Mechanisms” Hong Kong, November 26-27 (2012).
- ④ Kondoh H. Generation of neural primordia in vertebrate embryos by mechanisms that challenge the classical models. Commemorative Symposium for the 27th International Prize for Biology "Genetic Regulation of Development". Kyoto, Japan, Nov 30-Dec 1 (2011).
- ⑤ Kondoh H. Generation of neural primordia in vertebrate embryos by mechanisms that challenge the classical models. “Cold Spring Harbor Asia Conference on Developmental Control of Sex, Growth and Cellular Fate”. Suzhou, China, October 11-15 (2011).

ほか 2 7 件

[その他]

- ① 論文⑩に関する新聞報道(2011年2月17日): 毎日新聞、日本経済新聞、読売新聞、朝日新聞、産経新聞ほか。
- ② 本研究の科研費 NEWS での紹介: 2011年度 VOL.2, 最新の研究成果トピックス「三胚葉モデル」にかわる新しい機構による、神経系の成立。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 寿人 (KONDOH, Hisato)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授  
(現、京都産業大学総合生命科学部・教授)  
研究者番号: 70127083

### (2) 連携研究者

蒲池 雄介 (KAMACHI, Yusuke)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授  
研究者番号: 90263334

内川 昌則 (UCHIKAWA, Masanori)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教  
研究者番号: 80346147

竹本 龍也 (TAKEMOTO, Tatsuya)  
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教  
(現、徳島大学・助教)  
研究者番号: 30443899