

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07370

研究課題名（和文）幹細胞を活用した転写制御因子群による感覚器形成機構の研究

研究課題名（英文）The role of transcriptional factors, Sox and its partners, in early sensory development

研究代表者

内川 昌則 (Uchikawa, Masanori)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：80346147

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：耳の内耳、鼻の嗅上皮、眼の水晶体などの感覚器は、共通原基である頭部外胚葉から形成される。それぞれの感覚器が特異化される機構を明らかにするために、転写制御因子群Soxとそのパートナー因子の役割に着目して解析した。本研究では、ES細胞から感覚器細胞分化系を確立した。内耳原基特異的Otic1エンハンサー活性を指標に、内耳原基細胞を効率的に誘導することができた。Otic1エンハンサーの活性に重要なSox8/9とSal14の標的配列の同定を試みた。方法としてはDamID法をニワトリ胚で採用した。その結果、ニワトリ胚でDamID法が有効であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚発生における細胞分化は、転写制御因子“群”によって制御される。特にその組合せを切り換えることで、細胞分化を制御していることが明らかになってきた。本研究では、感覚器原基の発生に密接に関連した発現制御領域（エンハンサー）の時間的・領域的特異性に着目した。その制御配列に作用する転写制御因子群を一つの組合せとして捉え、それらの細胞分化における役割を解析した。このような研究は、細胞分化における転写制御因子群の役割を明確にして、その応用を飛躍的に推進するものである。その成果は胚発生の理解に留まらず、再生医療への発展に大きく貢献すると期待され、その学術的な影響は大きい。

研究成果の概要（英文）：Sensory primordia of the inner ear, nasal epithelium, and lens are derived from the cephalic ectoderm. To elucidate the mechanisms of specification of sensory primordia, we have investigated the regulatory function of transcription factors, Sox and its partner factors. We improved establishment of the otic stem cells derived from ES cells utilizing Otic1 enhancer, which is active in otic placodes. As the Otic1 enhancer is activated by the combined action of Sox8/9 and Sal14, we established an experimental procedure to identify binding sequences of transcription factors using DNA adenine methyltransferase identification (DamID) in the chicken embryo. Utilizing the enhancers we identified, DamID is a very useful procedure in the chicken embryo.

研究分野：発生生物学

キーワード：転写制御因子群 感覚器形成 発現制御 エンハンサー Sox転写因子 Sal14 幹細胞 内耳原基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

耳の内耳、眼の水晶体、鼻の嗅上皮を代表とする感覚器は、その形態や機能は大きく異なるが、その形成過程には共通点が多い。いずれも胚の頭部外胚葉を起源とする。それらの形態形成は、頭部外胚葉が肥厚した感覚器プラコードを形成することで開始される。感覚器プラコードが初期に共通した性質を持つことは、組織の交換移植の実験から示唆される。この感覚器プラコード形成に先駆けて、共通に発現される転写制御因子が Sox2 である。

感覚器形成において Sox2 遺伝子は、時期・領域特異的な複数の発現制御領域(エンハンサー)により担われる。感覚器プラコードが形成される以前の頭部外胚葉における発現は N4 エンハンサーによって、内耳・嗅上皮プラコードでは NOP1, NOP2 エンハンサー、水晶体プラコードでは N3 エンハンサーにより制御される。そして内耳・嗅上皮プラコードで活性を示す NOP1, NOP2 エンハンサーでは転写制御因子群 Sox2/9 と Sal14 が、水晶体プラコードで活性を示す N3 エンハンサーでは転写制御因子群 Sox2 と Pax6 が、協調的に作用することがそれぞれのエンハンサーの活性化に重要であることを明らかにしてきた(図1)。

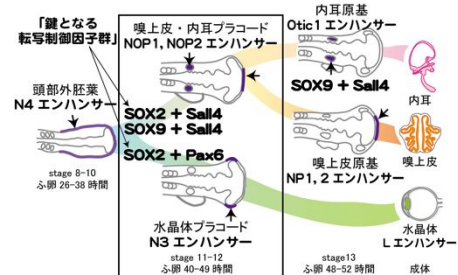


図1 感覚器形成過程の模式図と Sox2 遺伝子の発現制御
Sox2 遺伝子は、感覚器形成の時期・領域ごとに異なった制御領域(エンハンサー)により制御される。

2. 研究の目的

感覚器原基(耳、眼、鼻)が、共通原基である頭部外胚葉から特異化される機構の解明とその機構を駆使した感覚器細胞のプログラミングを目的とする。胚発生の細胞分化では転写制御因子が大きな役割を果たす。しかしその明確な理解には、個々の機能に注目するのではなく、組合せによる機能を理解する必要がある。

本研究では、転写制御因子群「Sox 転写因子とそのパートナー因子」の機能に着目する。感覚器形成を直接制御する Sox とそのパートナー因子による協調的な作用を明らかにする。さらに感覚器原基の幹細胞を出発点として、特定の感覚器細胞のプログラミングを試みる。

3. 研究の方法

本研究では、転写制御因子群「Sox とそのパートナー因子」による感覚器の特異化の仕組みの解明を目指す。感覚器形成の初期過程に重点をおき、以下の2つの課題に取り組む。

(1) 幹細胞を用いた感覚器プラコードの特異化の機構

感覚器形成過程に沿った各発生段階に対応した幹細胞群の単離

これまでに報告されている Oshima K (Cell. 2010;141(4):704-16.)らの方法をもとに、ES 細胞を用いた内耳有毛細胞の分化誘導系を確立した。この系を改変して、各エンハンサー活性を指標にした幹細胞群を単離する。

Sox2/9+Sal14(内耳・嗅上皮プラコード) vs. Sox2+Pax6(水晶体プラコード)の標的配列の解析

内耳・嗅上皮プラコードで活性を示す NOP1, NOP2 エンハンサーの活性化に必要な転写制御因子群 Sox2/9 と Sal14、水晶体プラコードで活性を示す N3 エンハンサーの活性化に必要な転写制御因子群 Sox2 と Pax6、それぞれの転写制御因子群の細胞分化における役割を明らかにする。それぞれの組合せの標的配列、その配列が制御する標的遺伝子を明らかにする。ChIP-Seq 法を用いる。細胞数を確保するために、上記の幹細胞群を活用する。

頭部外胚葉状態とそこから派生する各感覚器プラコードの遺伝子発現プロファイルの解析

感覚器原基の共通原基である頭部外胚葉と、そこから派生する各感覚器プラコードの細胞状態を明らかにするために、各段階の遺伝子発現プロファイルを作製する。各段階に対応したエンハンサー活性を指標にして、それぞれの段階の細胞群を単離して解析する。

感覚器プラコードの特異化に阻害的に働く制御機構の解析

感覚器プラコードの特異化に阻害的に働く因子を同定する。各感覚器プラコードの特異化の過程では、他の感覚器プラコードへの特異化を阻害する機構や、もとの頭部外胚葉に戻らないような機構が働くと考えられる。これまでの阻害的に働くエンハンサーの要素に作用する因子を同定する。

(2) 感覚器形成の開始機構を模範例とした転写制御因子群の操作による細胞分化の操作

上記の結果をもとに、より積極的な細胞分化の操作を試みる。以下の3つの操作を行う。

特定の幹細胞から次の発生段階の幹細胞へ高効率で遷移させる細胞プログラミング

異なった幹細胞間の細胞の遷移をもたらす細胞リプログラミング

分化組織の細胞から特定の幹細胞をもたらす細胞リプログラミング

4. 研究成果

(1) 幹細胞を用いた感覚器プラコードの特異化の機構

感覚器形成過程に沿った各発生段階に対応した幹細胞群の単離

これまでに Oshima K. et al. (Cell. 2010;141(4):704-16.)を参考に、ES 細胞から内耳細胞

分化系を確立し、さらに改善した。

ES細胞からEmbryoid bodyを作製して3胚葉を分化させるが、この際に3 reagents (Wnt signaling 阻害剤 XAV939, TGF signaling 阻害剤 SIS3, IGF1)を調整することで、優先的に感覚器原基を含む外胚葉に誘導した(図2)。その外胚葉からbFGFを作用させることで、内耳原基マーカーである*Eya1*と*Six1*の発現誘導および*Pax2*の発現維持を観察した(図3)。この結果からbFGF量を100 ng/mlで培養することで、内耳原基細胞をより効率的に誘導できることが明らかになった。

ES細胞から内耳細胞分化系を用いて内耳原基細胞を分離するために、内耳プラコード特異的にエンハンサー活性を示す*Sox3* 遺伝子のエンハンサーの1つ、*Otic1* エンハンサーを活用した。このエンハンサー活性をES細胞の内耳細胞分化系で調べたところ、bFgfによって内耳原基細胞に分化すると活性化された。この活性は内耳原基の分子マーカー*Pax2*の発現細胞と一致した(図4)。*Otic1* エンハンサーの活性を指標に内耳原基細胞を分離できる系を確立することができた。しかし、その誘導は培養された細胞の中の一部に留まることもわかった。内耳原基細胞における*Sox9*と*Sal14*の役割を明らかにするためには、培養するES細胞数を増やすなどの対策が必要であることがわかった。

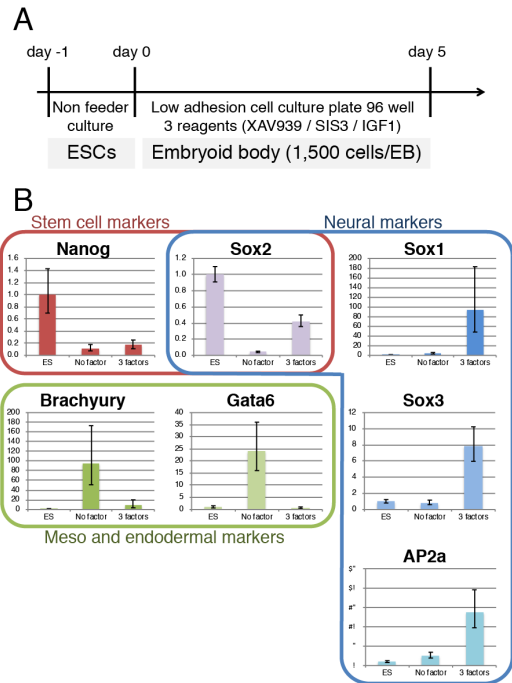


図2. マウスES細胞の内耳原基分化系の確立: Embryoid bodyの作成
A ES細胞の培養条件
B ES細胞(ES)と、XAV939, SIS3, IGF1を加えて培養したEmbryoid body (3 reagents)と、加えなかったもの(No reagent)の遺伝子発現量の変化 (qPCR)

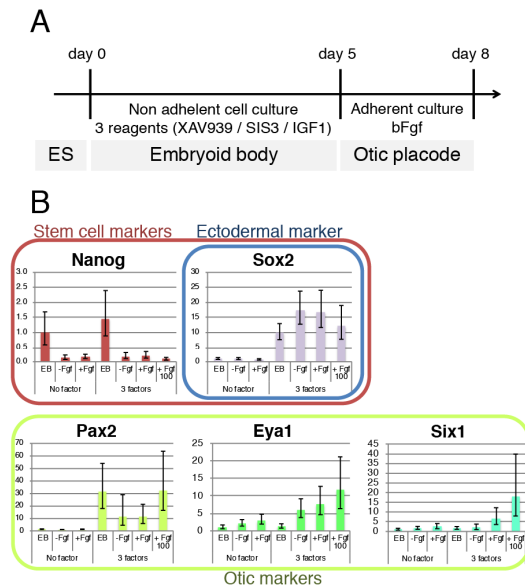


図3. マウスES細胞の内耳原基分化系の確立: Embryoid bodyの内耳原基分化誘導
A Embryoid bodyの培養条件
B XAV939, SIS3, IGF1を加えて培養したEmbryoid body (3 reagents EB)と、加えなかったもの(No reagent EB)、さらにそれぞれbFgfを加えて3日間培養したもの(+ Fgf)、bFgf量を増やした(3 reagentsのみ +Fgf100)、加えなかったもの(-Fgf)の遺伝子発現量の変化 (qPCR)

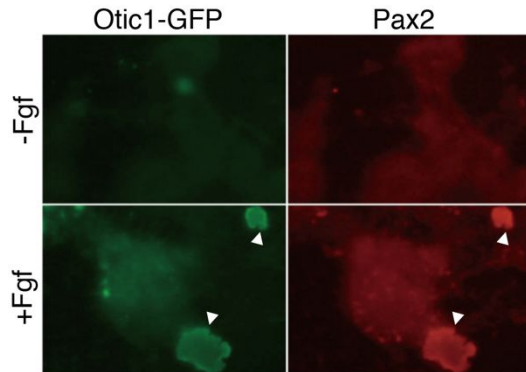


図4. マウスES細胞の内耳原基分化系の確立
内耳原基細胞における*Otic1*エンハンサーの活性と*Pax2*の発現

Sox2/9+Sal14(内耳・嗅上皮プラコード) vs. Sox2+Pax6(水晶体プラコード)の標的配列の解析

内耳・嗅上皮プラコードで活性を示すエンハンサーNOP1, NOP2に加え、内耳プラコード特異的に活性を示す*Otic1*エンハンサーを解析した結果、その活性化に必須なエレメントには*Sox8/9*と*Sal14*の協調的な作用が重要な役割を果たすことが明らかとなった。そこで転写制御因子群*Sox8/9*と*Sal14*(内耳プラコード)、*Sox2/9*と*Sal14*(内耳・嗅上皮プラコード)、*Sox2*と*Pax6*(水晶体プラコード)の感覚器原基の形成における役割を明らかにするため、それぞれの組合せの転写制御因子群のゲノム上の標的配列を網羅的に解析する方法を確立した。

そのために ChIP-seq 法を用いる計画だったが、特に転写制御因子ではその細胞数が多く必要になる。の結果から、特に内耳プラコードでは *Otic1* エンハンサーの活性を指標に内耳原基細胞を分離できるが、その細胞数を増やす必要があること、また他の感覚器プラコードではそれぞれの幹細胞群を新たに単離する必要があることなどから、ニワトリ胚を使った DamID 法の導入を検討した(図 5)。DamID 法は、大腸菌の Dam methyltransferase を用いることで高感度にその標的配列を同定でき、通常の ChIP-seq の 1/10-1/100 ぐらいの細胞数で行うことができる。ただし、DamID 法ではその発現量の調節が一つの鍵となる。ニワトリ胚を用いたエレクトロポレーション法による遺伝子導入では、Vector の DNA 量でその発現量を調節できる。さらにこれまでに解析してきた時期・領域特異的なエンハンサーによる発現制御と組み合わせることで、In vivo でその標的配列を同定できる可能性があった。これまでに、各感覚器プラコードに関わる転写制御因子群と Dam の融合蛋白質を発現するための Vector を作成した。ニワトリ胚における条件を検討した結果、Dam 融合蛋白質による特定の配列をメチル化することを確認できた。今後は、これらの配列のみを PCR を用いて特異的に増やすために、導入した Vector を取り除く作業が必要である。その方法を現在確立している。この方法が確立すれば、転写制御因子の標的遺伝子の同定が In vivo で容易に行えるようになり、転写制御因子群の機能解析に大きく貢献すると考えられる。

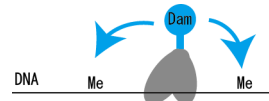


図 5. DamID 法
大腸菌 Dam methylase を転写制御因子と融合蛋白質として発現させ、結合した近傍の GATC 配列の A をメチル化し、それを検出する。

頭部外胚葉状態とそこから派生する各感覚器プラコードの遺伝子発現プロファイルの解析

当初の幹細胞群を単離する方法から、In vivo で解析できるに TRAP(Translating Ribosome Affinity Purification)法を検討した(図 6)。この方法では、時期・領域的特異的なエンハンサー活性を活用する。感覚器原基の共通原基である頭部外胚葉(N4 エンハンサー)、そこから派生する各感覚器プラコード(内耳プラコード; *Otic1* エンハンサー、内耳・嗅上皮プラコード; *NOP1*, *NOP2* エンハンサー、水晶体プラコード; *N3* エンハンサー)を活用した。各段階に特異的にフラグ付きリボソームタンパク質を発現させ、そこに結合した mRNA を網羅的に解析する。各段階の遺伝子発現プロファイルを作製する。そのための Vector の作製も完了した。この方法によって、In vivo で発現する遺伝子を網羅的に解析できるようになった。

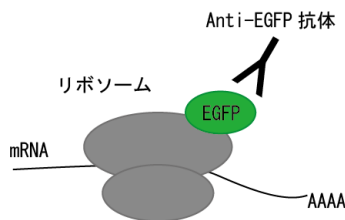


図 6. TRAP 法
リボソームタンパク質と EGFP の融合蛋白質を目的の細胞で発現させ、抗 EGFP 抗体でリボソーム蛋白質とそれと結合する mRNA を単離する。

感覚器プラコードの特異化に阻害的に働く制御機構の解析

内耳・嗅上皮プラコードで活性を示す *NOP1* エンハンサーの抑制エレメントの 1 つは、*Zeb1/2*, *Snail1/2* zinc finger proteins が作用する。内耳特異的な *Otic1* エンハンサーにおける抑制配列にも *Zeb1/2*, *Snail1/2* の結合配列が存在した。その配列を除くと、内耳原基以外に神経冠細胞でも *Otic1* エンハンサーの活性が観察された。このことから内耳プラコード形成には、*Sox8/9* と *Sal14* の協調的作用とともに、これらが発現されている他の組織、神経冠細胞などでは *Zeb1/2*, *Snail1/2* によって内耳原基への分化が抑制されている可能性が考えられる。今後、この抑制の機構を阻害することで、感覚器原基間の相互転換などを検討したいと考えている。

(2) 感覚器形成の開始機構を模範例とした転写制御因子群の操作による細胞分化の操作

上記の結果をもとに、より積極的な細胞分化の操作を試みる。

特定の幹細胞から次の発生段階の幹細胞へ高効率で遷移させる細胞プログラミング

異なった幹細胞間の細胞の遷移をもたらし細胞リプログラミング

分化組織の細胞から特定の幹細胞をもたらし細胞リプログラミング

これまでに について、ES 細胞を用いた内耳細胞分化系で行ってきた。内耳原基を効率的に遷移させるために、*Fgf* や *Wnt* signal の作用量などを検討した。その結果、内耳原基細胞を最も効率的に分化させることはできたが、その細胞は多くても全体の半分ほどの細胞群だった。また、内耳原基細胞のマーカーの *Pax2* の発現量も細胞ごとに異なることが明らかになった。均一の内耳原基細胞を分化させるには、更なる改善が必要と考えられる。

内耳プラコードで特異的な活性を示す *Otic1* エンハンサーの解析から、*Sox8/9* と *Sal14* の協調的な作用と、他のもう一つの活性化エレメントに結合する転写制御因子を同定することができた。この因子を *Sox9* と *Sal14* とともにニワトリ胚

の頭部外胚葉に異所的に発現したところ、*Otic1* エンハンサーの異所的な活性化が観察された(図 7)。このことから *Sox* とそのパートナー因子とともに、いくつかの鍵となる転写制御因子を同時に作用させることで、特異的な感覚器原基を誘導できることが示唆された。

今後、さらに解析を進め「*Sox* とそのパートナー因子」による感覚器原基の細胞分化における役割を明らかにする。それらとともに作用する転写活性化因子や転写抑制因子の作用を加味す



図 7. *Sox9*, *Sal14* ともう一つの転写活性化因子を頭部外胚葉で異所的に発現させたことによる *Otic1* エンハンサーの異所的な活性化

ることで、感覚器原基間の相互転換を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uchikawa Masanori, Nishimura Naoko, Iwafuchi-Doi Makiko, Kondoh Hisato	4. 巻 1650
2. 論文標題 Enhancer Analyses Using Chicken Embryo Electroporation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)	6. 最初と最後の頁 191 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7216-6_12	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 Sugahara Satoko, Fujimoto Tooru, Kondoh Hisato, Uchikawa Masanori	4. 巻 433
2. 論文標題 Nasal and otic placode specific regulation of Sox2 involves both activation by Sox-Sall4 synergism and multiple repression mechanisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 61 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2017.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Yu, Nishimura Naoko, Matsuda Kazunari, Ranawakage Deshani C., Kamachi Yusuke, Kondoh Hisato, Uchikawa Masanori	4. 巻 60
2. 論文標題 Cooperation of Sall4 and Sox8 transcription factors in the regulation of the chicken Sox3 gene during otic placode development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 133 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iida Hideaki, Furukawa Yoko, Teramoto Machiko, Suzuki Hitomi, Takemoto Tatsuya, Uchikawa Masanori, Kondoh Hisato	4. 巻 25
2. 論文標題 Sox2 gene regulation via the D1 enhancer in embryonic neural tube and neural crest by the combined action of SOX2 and ZIC2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 242 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12753	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 Kajikawa Eriko, Horo Uzuki, Ide Takahiro, Mizuno Katsutoshi, Minegishi Katsura, Hara Yuichiro, Ikawa Yayoi, Nishimura Hiromi, Uchikawa Masanori, Kiyonari Hiroshi, Kuraku Shigehiro, Hamada Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Nodal paralogues underlie distinct mechanisms for visceral left-right asymmetry in reptiles and mammals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 261 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-019-1072-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teramoto Machiko, Sugawara Ryo, Minegishi Katsura, Uchikawa Masanori, Takemoto Tatsuya, Kuroiwa Atsushi, Ishii Yasuo, Kondoh Hisato	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 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio048728
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hideaki Iida, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh
2. 発表標題 Regulation of a pan-neural Sox2 enhancer D1
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会年会 第70回日本細胞生物学会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田 英明、内川 昌則、近藤 寿人
2. 発表標題 D1エンハンサーによる、胚の中樞神経系と頭部神経堤におけるSox2発現の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Okamoto, Naoko Nishimura, Kazunari Matsuda, Deshani C. Ranawakage, Yusuke Kamachi, Hisato Kondoh and Masanori Uchikawa
2. 発表標題 Cooperative activation of Sal14 and Sox8 transcription factors in the regulation of the chicken Sox3 gene during inner ear development
3. 学会等名 50th Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡本 優、西村 なおこ、松田 一成、Deshani C. Ranawakage、蒲池 雄介、近藤 寿人、内川 昌則
2. 発表標題 内耳発生における転写制御因子Sox8とSal14によるSox3遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡本 優、西村 なおこ、近藤 寿人、内川 昌則
2. 発表標題 Sox3遺伝子の内耳特異的なエンハンサーにおけるSox因子とSal14による協調的な活性化機構
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hideaki Iida, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh
2. 発表標題 Possible Sox2 autoregulation involving POU partner factors in the establishment of embryonic neural primordia
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田 英明, 内川 昌則, 近藤 寿人
2. 発表標題 単一エンハンサー内でのSOX2-ZIC2、SOX2-PAX3の2つの転写因子相互作用によって、Sox2遺伝子が神経系と神経堤で活性化される
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内川 昌則
2. 発表標題 二ワトリ胚への遺伝子導入を活用したエンハンサーの解析；エンハンサーの網羅的なスクリーニングから転写因子の協調的作用まで
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会（招待講演）
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