

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590179

研究課題名（和文） プラコード前駆領域と感覚器プラコードの細胞系譜と頭部形成における機能解析

研究課題名（英文） The cell-lineage and the role of pre-placodal region and sensory placodes during head morphogenesis

研究代表者

佐藤 滋 (SATO SHIGERU)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70306108

研究成果の概要（和文）：脊椎動物頭部の感覚器の形成は、外胚葉→単一の前駆領域→各種プラコードの順に進む。この過程で鍵となる遺伝子が *Six1* である。本研究は、プラコードの発生運命、分化、頭部形成における役割の理解を目的として行った。まず、*Six1* の遺伝子スイッチを利用した 2 種類の有用なマウス系統を樹立した。次に、そのマウスを利用し、鼻プラコードでの *Six1* の発現制御機構、感覚神経節形成におけるプラコードの役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Sensory organs of vertebrate heads are formed as follows: ectoderm → pre-placodal region → various sensory placodes. *Six1* is the key gene in the process. In this study, we sought to understand the cell-lineage, differentiation and roles of sensory placodes during head morphogenesis. First, we established two useful transgenic mouse lines that express Cre recombinase under the control of *Six1* enhancers. Then, using the mice, we characterized how *Six1* is regulated during olfactory development and how placodal cells control the formation of sensory ganglia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般

キーワード：器官形成、感覚器形成、プラコード、転写制御、胚発生、ニワトリ、トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物頭部の感覚器は、主に感覚器プラコードに由来し、嗅覚や聴覚等の特殊感覚、顔面や口腔の体性感覚を受容する。魚類～鳥類では全てのプラコードは単一の外胚葉領域であるプラコード前駆領域 (PPR) から生

じるとされている。特異的マーカー (*Six1/4* と *Eya1/2*) の発見はプラコードの単一起源を支持し、これらのマーカーを利用した PPR 誘導の分子メカニズム、感覚器前駆細胞としての PPR の特徴の解明に向け、主に欧米で活発に研究が行われてきた。しかし、感覚器や頭頸部における PPR とプラコード由来細

胞の移動や局在パターンは明らかではなく、Fgf 等のシグナルが PPR (=Six1 発現) 誘導に至る仕組みは不明、哺乳類では PPR の報告すらなかった。また、視床下部の GnRH ニューロンや嗅神経幹細胞の由来についても論争があり、プラコード起源の感覚器形成過程の理解を大幅に進めるブレークスルーとなる研究が待たれていた。

PPR から感覚器まで発現する Six1 は感覚器形成に必須であり、欠損マウスは嗅上皮や内耳の劇的な形成異常を示す。私たちは、感覚器形成における Six1 の役割、マウスとニワトリの Six1 と Eya1/2 の PPR での発現を明らかにし、PPR とプラコード特異的な保存された複数のエンハンサーを同定した。以上の結果、PPR はマウスにも存在し、脊椎動物で保存された外胚葉の一画であることがはじめて明らかとなった。また、同定したエンハンサーの特異性と発現時期の早さは特筆すべき特徴であり、これらを最大限利用し、PPR とプラコードを遺伝的に標識・可視化することで、このユニークで重要な細胞集団の細胞系譜と移動、分化、頭部形成における機能の理解を目指す本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究はプラコード前駆領域 (PPR) と感覚器プラコードというユニークで重要な細胞集団の細胞系譜と移動、分化、頭部形成における機能の理解が目的であった。具体的な目的は以下の 3 点である。

(1) Cre-lox システムによる遺伝的な標識を利用した、PPR と各種プラコードの細胞系譜の解明。

(2) ジフテリア毒素を用いた特異的な細胞除去実験による PPR とプラコードの頭部形成における機能の解明。

(3) PPR、プラコード、感覚ニューロンの可視化とリアルタイムでの観察による、プラコード形成から感覚ニューロン分化の初期過程における細胞の移動・選別パターンと細胞分化の動態およびその因果関係の解明。

3. 研究の方法

(1) PPR と各種プラコードの細胞系譜の解析

① PPR 全体で転写を活性化するメカニズムあるいは DNA 断片の同定 : PPR 特異的に Cre を発現するマウス系統の樹立は PPR というユニークな細胞集団を理解するために

非常に有用なツールとなる。しかし、すでに同定した Six1 の PPR エンハンサー (Six1-14) は PPR の前側部分だけに特異的であり、PPR 全体で転写を活性化するメカニズムあるいは DNA 断片は不明であった。そこで、Six1-14 以外の保存配列、Six1-14 と他の保存配列の組み合わせ、あるいは、新たな動物種由来の Six1-14 の活性を調べることで、Cre 発現マウス作製に用いる DNA 断片について検討した。種々の DNA 断片の下流に HSV-TK プロモーターと EGFP を繋げ、ニワトリ胚にエレクトロポレーションにより導入する、という方法を用いた。

② Cre 発現マウスを用いたプラコードの細胞系譜の解析 : Six1-8 は、鼻、耳、上鰓、三叉神経節プラコード (胴体部では脊髄神経節でも) で転写を活性化する。一方、Six1-21 は鼻、耳、上鰓、下垂体前葉プラコードで特異的に転写を活性化する。両エンハンサー下で特異的に Cre を発現するマウスはすでに作製したので、C57BL/6 系統への戻し交配を行い、系統として樹立を目指した。ROSA-loxP-LacZ を交配し、E8 から E18.5 までの胚を集め、X-Gal 染色により LacZ 発現細胞の局在部位を調べ、PPR と各種プラコードの細胞系譜を調べた。器官や組織内の一部の細胞だけが LacZ 陽性であった場合、各種マーカー遺伝子・タンパク質を用いて、細胞種を特定した。

(2) プラコードの頭部形成における機能の解析

① ROSA-EGFP-loxP-DTA マウスについて : Cre リコンビナーゼをある細胞で発現させると、loxP サイトでの組換えが起こり、ジフテリア毒素 A (DTA) が発現する。こうして、特定の細胞だけを傷害し、その細胞の欠損が及ぼす影響を観察することで、その細胞の正常発生でのはたらきの評価に利用できる。

② プラコードの傷害実験 : 2 種類の Six1 エンハンサー (Six1-8、Six1-21) 下で Cre を発現するマウスと ROSA-EGFP-loxP-DTA を交配し、E9.5 から E12.5 までの胚を固定し、頭部形態の組織化学的な観察を行い、Six1 を発現する PPR とプラコード細胞の頭部形成における役割について検討した。

(3) PPR とプラコードの細胞の移動・選別についての解析

① レポーターコンストラクトについて : Tol2 配列を持つ複数のベクターを入手し、種々のエンハンサー下で EGFP や mRFP1 を発現す

るコンストラクトを作製した。これをニワトリ原腸胚（ステージ 4）の少数の細胞にエレクトロポレーションにより導入し、PPR からプラコードが形成される際の個々の細胞の移動・選別パターンと分化（＝プラコードエンハンサーの活性化）のタイミングに注目して観察を行った。

②PPR の同定と単離について：PPR 細胞の移動・選別の解析を行うためには、PPR を切り出し、別の胚の様々な部位に移植し、移植先での細胞の振る舞いを観察することも必要である。そのため、ステージ 6 のニワトリ胚から PPR を切り出す技術を Streit 博士（King's College London）の指導により習得した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①2 系統の Cre 発現マウスの樹立と特徴の解明：Six1 の 2 種類のプラコードエンハンサー（Six1-8、Six1-21）の制御下で Cre を発現するマウス系統を樹立した。バックグラウンドは C57BL/6J で、現在戻し交配第 11 世代である。すべての感覚器プラコード（鼻、三叉神経節、上鰓、耳）、下垂体前葉プラコード、さらには、脊髄神経節で特異的に Cre を発現させることが可能になった。

この 2 系統のマウスの作製には、インスレーター配列を含むトランスジーンを用いたが、ときどきユビキタスに Cre を発現する胚が観察された。ユビキタスな発現と胚や親の性別とは無関係であり、インスレーター配列があっても、予想外のパターンで Cre を発現する場合があることがわかった。

②プラコードの細胞系譜と Six1 の発現制御について：Six1-8 神経節プラコードエンハンサーの制御下で Cre を発現するマウス系統の解析により、このエンハンサーは鼻プラコードでも転写を活性化することがわかった。その活性は、弱い、あるいは、一過的であり、以前のトランスジェニックマウスを用いた解析（E10.5 で固定・染色）では検出することができなかった。

Six1-8 の発現時期は、メインの鼻プラコードエンハンサーである Six1-21 よりも早く、また、前脳に向かって移動するパイオニアニューロンがかなり多く標識される、という特徴を持つらしいことがわかってきた。この発見は、嗅上皮の発生とパイオニアニューロン形成の分子基盤を解明するための重要な第一歩であると考え、詳細な解析を続けている。

③PPR エンハンサーについて：Six1 に隣接

する Six4 近傍の保存配列のエンハンサー活性を検討したところ、神経板を除く外胚葉全体で転写を活性化した。しかし、この配列と Six1-14（Six1 の前側 PPR エンハンサー）との組み合わせで PPR 全体で転写が活性化されることはなかった。驚いたことに、ゼノパスの Six1-14 はニワトリ胚に導入すると、マウスやニワトリの配列に比べ、PPR の広い領域でも転写を活性化することがわかった。PPR 特異的 Cre 発現マウスの作製には最適なエンハンサーの可能性があるため、マウスでの活性を検討するためのトランスジーンの構築を現在行っている。

④DTA マウスとの交配による細胞除去実験：Six1-8 神経節プラコードエンハンサーの制御下で Cre を発現するマウスと ROSA-EGFP-loxP-DTA マウスの交配により得られた胚は、E10.5 で脳神経節（特に三叉神経節）が非常に小さく、ニューロンの数が著しく減少していた。この異常は Six1/Six4 二重欠損マウスの表現型に類似していた。プラコードの除去が神経堤や周囲の中胚葉の発生に及ぼす影響について各種マーカーを用いて検討中である。体幹部では脊髄神経節もほとんど形成されていなかった。

⑤Six1 エンハンサーの進化的な保存性について：マウス Six1-21 プラコードエンハンサーに類似した配列（64/129 塩基が同一）がナメクジゲノムの保存された領域に見つかった。残念ながらニワトリ胚では特異的なエンハンサー活性は検出できなかった。一方、コントロールとして用いた Six1-10 類似配列（120/213 塩基が同一）は、体節エンハンサーとしての機能が保存されていた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

Six1-8 と Six1-21 エンハンサーを利用した Cre 発現系統の樹立により、レンズプラコードを除くすべてのプラコードで Cre を発現することができるようになった。その発現時期は非常に早く、また、中枢神経系等の周辺の重要な組織での発現がないため、コンディショナルノックアウトマウスの作製や DTA マウスとの交配による細胞除去実験での利用に最適である。感覚器の発生や機能の解明を目指す様々な研究に有用なツールであり、感覚器研究に大きなインパクトがある。例えば、内耳発生の研究においては、従来の Foxg1-Cre あるいは Pax2-Cre と組み合わせることで、遺伝子機能についての詳細な解析が可能になると思われる。本研究では、2 種類の Cre 発現マウスを利用することで、鼻プラコードにおける Six1 の発現は

Six1-8 と Six1-21 の 2 種類のエンハンサーによって制御されていることがわかった。またこの発見は、未だ不明な部分が多いパイオニアニューロン形成の分子基盤を解明するための重要な第一歩だと考えている。

ブラコードを遺伝的に除去し、その再生能力（調節能力）や、神経堤の発生に及ぼす影響、周囲組織の発生を制御するシグナル源としての役割を問うた研究はない。本研究では Six1-8-Cre マウスを利用した解析により、神経節によってブラコード細胞除去の影響が異なることをはじめて明らかにできた。

(3) 今後の展望

Six1 エンハンサーの制御下で Cre を発現する 2 種類のマウスを利用し、すでに開始した細胞系譜と発生メカニズムの解析、細胞除去実験を継続することで、ブラコードの発生と頭部形成における役割を明らかにしたい。また、種々の floxed マウスと交配し、シグナル分子や受容体、転写因子の役割についても検討し、感覚器形成の分子基盤のさらなる理解を目指す。鼻ブラコード/嗅上皮の一部の細胞だけで一過的に Six1-8 エンハンサーが活性化されるメカニズムを明らかにすることで、パイオニアニューロン形成の分子基盤の一端を明らかにできるのではないかと期待している。最後に、Six1-14 は唯一の同定された PPR エンハンサーである。しかし、このエンハンサーを用いても、PPR 全体で転写を活性化することはできていない。PPR 誘導（=Six1 の発現誘導）の分子基盤を解明し、PPR 細胞の属性を理解するためには、新たな方法でのアプローチが必要であろう。そして、本研究では十分な解析ができなかった PPR 細胞の移動や分化についてのリアルタイム解析を進めたい。

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 3 件）

- ① Sato S, Ikeda K, Shioi G, Nakao K, Yajima H, Kawakami K. (2012). Regulation of Six1 expression by evolutionarily conserved enhancers in tetrapods. *Dev Biol* 368:95-108. DOI:10.1016/j.ydbio.2012.05.023
- ② Yajima H, Motohashi N, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanasaki H, Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K. (2010). Six family genes control the proliferation and differentiation of

muscle satellite cells. *Exp Cell Res* 316:2932-2944.

DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.08.001

- ③ Sato S, Ikeda K, Shioi G, Ochi H, Ogino H, Yajima H, Kawakami K. (2010). Conserved expression of mouse Six1 in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR. *Dev Biol* 344:158-171. DOI: doi: 10.1016/j.ydbio.2010.04.029

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① Sato S, Yajima H, Kawakami K. Six1 homeobox genes in the evolution of the sensory nervous system. 学融合推進センター・共同研究プロジェクト研究会「脳の進化—大脳新皮質の起源を尋ねて—」, 総合研究大学院大学葉山キャンパス共通棟, 葉山, 2012年11月13日. (口頭発表)
- ② Sato S, Ikeda K, Shioi G, Nakao K, Aizawa S, Yajima H, Kawakami K. Conservation and diversity of Six1 gene enhancers in chordates. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会, 神戸国際会議場, 神戸, 2012年5月28日-31日. (口頭発表とポスター発表)
- ③ Sato S, Ikeda K, Shioi G, Nakao K, Aizawa S, Yajima H, Kawakami K. Six1 enhancers as a tool to understand sensory organogenesis. EMBO workshop "Frontiers in sensory development", Universitat Pompeu Fabra, Parc de recerca Biomèdica (PRBB), Barcelona, Spain, May 3-6, 2011. (口頭発表)
- ④ 佐藤 滋, 池田 啓子, 塩井 剛, 中尾和貴, 相沢 慎一, 矢嶋 浩, 川上 潔. 脊椎動物の感覚器形成の初期過程の理解を目指して. 日本動物学会第81回大会, 東京大学教養学部, 東京, 2010年9月23日-25日. (口頭発表)
- ⑤ Sato S, Ikeda K, Shioi G, Nakao K, Aizawa S, Yajima H, Kawakami K. Six1 enhancers as a tool to understand vertebrate sensory organogenesis. 日本発生生物学会第43回大会, 国立京都国際会館, 京都, 2010年6月20日-23日. (ポスター発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 滋 (SATO SHIGERU)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70306108

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：