

令和元年6月22日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08453

研究課題名(和文)内耳機能の基盤となる部位特異的な有毛細胞と感覚神経の形成原理の解明

研究課題名(英文) Study on the molecular basis of the position-specific formation of the hair cells and sensory neurons in the inner ear

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：聴覚と平衡覚を司る脊椎動物の内耳は、進化が作り出した最も精巧な器官の一つである。本研究は、内耳形成で鍵となるSix1遺伝子に焦点を絞り、その発現制御と機能の解明を目指した。マウス内耳有毛細胞のATAC-seq解析では、Six1周辺に有毛細胞エンハンサー候補を7個同定できた。また、SIX1結合配列がゲノム全体の有毛細胞エンハンサー候補に高頻度で見つかり、SIX1が多数の遺伝子を制御し有毛細胞を特徴づける転写因子であることが強く示唆された。Six1-floxマウスを樹立し、内耳の感覚神経や有毛細胞で特異的にSix1を欠損するマウスの解析を進めることで、Six1の機能のより深い理解が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の内耳は最も精巧な器官の一つであり、聴覚と平衡覚を司る。本研究は、内耳の形成に重要なSix1遺伝子に注目した研究を進めた。その結果、有毛細胞でSix1がはたらくために必須なスイッチを同定できた。また、Six1が多数の遺伝子を活性化し有毛細胞を特徴づける転写因子であることもわかった。Six1の機能のさらなる理解に役立つマウスシステムも作った。本研究は内耳形成、難聴の理解・再生医療に役立つ。

研究成果の概要(英文)：The vertebrate inner ear responsible for hearing and balance is one of the most complex organs. This study aimed to understand the regulation and function of the key homeobox gene Six1. We carried out ATAC-seq analysis using hair cells isolated from E17.5 mouse embryos, and identified 7 candidate hair cell-enhancers located in the Six1-TAD. In addition, SIX1-binding sequences were enriched in top 1,105 hair cell-specific ATAC-seq peaks. This strongly suggest that SIX1 controls not only Atoh1 but also many hair cell genes and acts as the key transcription factor characterizing hair cells. We also established a new Six1-flox mouse strain and crossed them with mice expressing Cre in the otic placode, sensory neurons, hair cells and surrounding mesoderm. These mice should allow us a deeper understanding of the function of Six1 during the formation of the inner ear.

研究分野：発生生物学

キーワード：感覚器形成 Six遺伝子 内耳形成 有毛細胞 転写制御 エンハンサー 遺伝子改変動物 ホメオボックス遺伝子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

聴覚と平衡覚を司る脊椎動物の内耳は、進化が作り出した最も精巧な器官の一つである。内耳形成では、外胚葉が、予定プラコード域 (PPR) →プラコード→耳胞→複雑な膜迷路へと形を変え、蝸牛と前庭の6ヶ所に有毛細胞からなるセンサーが形成される。こうして形成される精巧な構造が、聴覚と平衡覚の基盤となっている。感覚神経と大部分の有毛細胞は耳胞腹側から形成される。耳胞の領域化には SHH やレチノイン酸、蝸牛や前庭の有毛細胞の分化には BMP や FGF 等のシグナルが関与する。一方、最終分化を決定づけるのは、bHLH 型転写因子の NEUROG1 (感覚神経) と ATOH1 (有毛細胞) だとされる。しかし、「局所的なシグナルの入力」と「分化を決定づける bHLH 因子の発現」の間はブラックボックスであり、この仕組みを解明することが最重要な課題となっている。内耳形成では、SIX1 と呼ばれるホメオボックス遺伝子が極めて重要な役割を果たしている。SIX1 の発現は、PPR、プラコード、耳胞、感覚神経、有毛細胞で順次活性化され、SIX1 欠損マウスでは、耳胞腹側からの発生が進まず、感覚神経も有毛細胞も分化しない。一方、蝸牛管での SIX1 とコファクター EYA1 の過剰発現は ATOH1 陽性の有毛細胞分化を誘導し、クロマチン再構成因子 BRG1 を加えた3者の過剰発現は NEUROG1 陽性の神経細胞の分化を誘導できる。以上より、内耳に局在するシグナルが、別々のエンハンサーを介して SIX1 の発現を活性化し、発現した SIX1 が耳胞前側では感覚神経を、蝸牛と前庭では有毛細胞への分化を運命づけることが強く示唆される。シグナルに応答した SIX1 の発現活性化とその機能を解明することが、部位特異的な細胞分化の謎を解く鍵であると気がついた。

### 2. 研究の目的

本研究は、「局所的なシグナルの入力」が「分化を決定づける bHLH 因子の発現」を決定する仕組みの解明を目指し、ホメオボックス遺伝子 SIX1 に焦点を絞り、以下の具体的目標を掲げる。

(1) シグナルによる Six1 活性化機構の解明：蝸牛や前庭の有毛細胞における Six1 の発現を特異的に活性化するエンハンサーを同定する。有毛細胞エンハンサーと、既に同定済みの感覚神経エンハンサー (Six1-8) の活性化シグナルも解明し、活性化機構の違いを明らかにする。

(2) 内耳形成後期における SIX1 機能の解明：内耳形成後期における SIX1 の機能は個体では証明されていない。また、SIX1 は分化の制御とは別の内耳構築に関わる機能を持つかもしれない。耳胞、感覚神経、有毛細胞で SIX1 を欠損するコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作製し、表現型解析を行う。

(3) 有毛細胞と感覚神経における SIX1 機能の相違点の解明：SIX1 の発現は耳胞前側では感覚神経を、蝸牛と前庭では有毛細胞への分化を運命づける。SIX1 標的遺伝子を同定することで、SIX1 が部位そして時期特異的に異なる細胞を生み出す分子基盤を確明する。2つの細胞で SIX1 mRNA のスプライシングが違っている可能性もあるので、スプライシングバリエーションの有無についても検討する。

### 3. 研究の方法

(1) Six1 有毛細胞エンハンサーの同定：マウス胚より単離した内耳有毛細胞を用いて ATAC-sequencing (ATAC-seq) を行い、Six1 周辺のオープンクロマチン領域 (=有毛細胞特異的エンハンサー候補) の検索を行った。

(2) Six1 有毛細胞エンハンサーの特徴解析：ATAC-seq にて同定したエンハンサー候補について、進化的保存性、結合が予想される転写因子等の検索を行った。

(3) Six1 感覚神経エンハンサー (Six1-8) の特徴解析：Six1-8 の制御下で Cre を発現するトランスジェニックマウスで標識される細胞系譜、および Six1-8 の塩基配列の特徴を明らかにした。

(4) Six1-flox マウスの作製：ゲノム編集法にて Six1-flox マウスを作製した。

(5) Six1 の CKO マウスの解析：Six1-flox マウスと複数の Cre 発現マウスを交配し、表現型解析を行った。

(6) 有毛細胞における SIX1 機能の解明：ATAC-seq にて同定した内耳有毛細胞のすべてのオープンクロマチン領域について、SIX1 結合部位の有無について検索を行った。有毛細胞特異的な Six1 の転写開始点、転写産物の有無について調べた。

### 4. 研究成果

(1) Six1 有毛細胞エンハンサーの同定：内耳の有毛細胞特異的に EGFP を発現する Atoh1-EGFP ホモマウス 17.5 日胚より、蝸牛の有毛細胞を FACS にて単離した。1x10<sup>5</sup> 個の EGFP+有毛細胞と EGFP-コントロール細胞 (蝸牛管を構成する有毛細胞以外の細胞) を用いて ATAC-seq を行った。有毛細胞では 43,493 個、コントロール細胞では 35,706 個、17,215

個の共通な ATAC-seq ピークが検出された。このうち、Six1 遺伝子の転写に関わるクロマチン領域 (topologically associating domain : TAD、約 600 kb) 内には 7 個の有毛細胞特異的なピークが同定された。これらをも有毛細胞エンハンサー候補として ATAC1-ATAC7 と名付けた。そのうち ATAC1 は、耳・鼻・上鰓プラコードエンハンサーとして以前同定した Six1-21 エンハンサーであり、ATAC2 は、耳胞・上鰓プラコード・腎臓中胚葉エンハンサーとして同定した Six1-12 エンハンサーであったが、有毛細胞における活性は不明である。

内耳有毛細胞では、発現プロファイリングの報告は多いが、ATAC-seq の報告はなかった。今回同定した有毛細胞特異的なピークは、Six1 のみならず、有毛細胞特異的に発現するほとんどの遺伝子のエンハンサーを含むはずであり、内耳研究に大きなインパクトがある。現在、トランスジェニックマウスや単離した蝸牛感覚上皮へのエレクトロポレーションにより ATAC1-ATAC7 のエンハンサー活性を明らかにすべく、準備を進めている。

(2) Six1 有毛細胞エンハンサーの特徴解析：以前、Six1 近傍の進化的に保存されたエンハンサーを検索する際は、両隣の Six6 と Six4 までの約 160 kb の領域について検索を行ったが、最近、様々な細胞種における TAD が明らかとなり、本研究では約 600 kb の Six1 TAD に位置するすべてのエンハンサー候補 ATAC1-ATAC7 を同定した。ATAC1、ATAC2、ATAC7 は魚類まで保存された配列であるが、ATAC3-6 は哺乳類もしくはハ虫類までしか保存されていない配列であり、これらをエンハンサー候補として同定できたことは ATAC-seq という手法の有効性を示すものであった。JASPAR 2018 等による転写因子結合部位の検索等の解析は現在進めている。

(3) Six1 感覚神経エンハンサー (Six1-8) の特徴解析：Six1-8 の制御下で Cre を発現するトランスジェニックマウスを作製した。R26R-LacZ マウスとの交配で得られた胚の解析を行ったところ、感覚器プラコード由来の感覚神経は Six1-8 エンハンサーの制御下で Six1 を発現し、やや遅れて ISL1/2 陽性になることがわかった。神経堤由来の SOX10 陽性グリアでは Six1-8 の活性はなかった。Cre 発現マウスを作製してはじめてわかったことは、Six1-8 エンハンサーは鼻プラコードの一部の細胞で一過性に転写を活性化でき、Six1-8 エンハンサーが ON になった細胞の多くは、その後、前脳に向かって移動する細胞の集まり (migratory mass) を形成するパイオニアニューロンに分化することである。嗅上皮形成において Six1-8 は移動前のパイオニアニューロンにおける一過性の発現を活性化するエンハンサーであることが示唆された。嗅上皮では Six1-21 エンハンサーが 1 日遅れで Six1 の転写を活性化し、嗅神経細胞が分化する。Six1-8 エンハンサーの機能には、核内受容体の認識配列、TCF/LEF の認識配列が必須であることが、ニワトリ胚を用いたレポーター解析の結果明らかとなった。耳胞の前側から感覚神経が形成されるが、その過程では、適切なレベルのレチノイン酸シグナルの入力が必須であることがわかっており、Six1-8 がそのターゲットである可能性を考えている。

(4) Six1-flox マウスの作製：ゲノム編集法により Six1 の 5'UTR と第 1 イントロンの中間部に loxP 配列を挿入し、Cre 発現マウスを交配した際に、5'UTR から第 1 イントロンの途中までの約 0.9 kb を欠失する Six1-flox アリルを持つマウスを作製した (理研 CLST との共同研究)。目的のアリルを持つ 9 種類のマウスをライン化し、塩基配列を確認し、さらに F1 個体を Cre 発現マウスと交配し、0.9 kb の欠失が生じることも確認した。その中で、1 ライン (No. 39) を選び、オフターゲット効果の可能性を排除するためにバッククロスを進めた。

(5) Six1 の CKO マウスの解析：内耳形成における Six1 の役割を明確にするために、Six1-8-Cre、Six1-21-Cre、Atoh1-CreER、Mesp1-Cre マウスと Six1-flox マウスを交配し、Six1 の conditional knock-out (CKO) マウスを作製し、表現型の解析をはじめた。これまでに、Six1-21-Cre>Six1-flox マウスは胎生致死になる可能性が高いことがわかった。Six1-8-Cre>Six1-flox マウスは、頻度は低いものの、CKO 個体が得られ、回転するような行動異常が観察され、内耳の感覚神経形成不全のため聴覚あるいは平衡覚に異常が生じている可能性が高い。現在、詳細な解析を進めている。

(6) 有毛細胞における SIX1 機能の解明：ATAC-seq により明らかとなった思いがけない発見は、HOMER というプログラムにより有毛細胞特異的な上位 1,105 個のピークに最も高頻度で検出される de novo モチーフは SIX1 結合コンセンサス配列に最も良く似ていることがわかったことである。34.91% のピークにこのモチーフが存在していた (バックグラウンドは 7%)。既知のモチーフ検索を行った際にも、SIX1 結合コンセンサス配列は上位から 7 番目 (12.96%、バックグラウンドは 1.67%) という結果であった。この結果は、有毛細胞分化における Six1 の役割は、分化決定因子 Atoh1 の活性化だけでなく、他の多数の有毛細胞特異的な遺伝子の転写も活性化しており、まさに有毛細胞を特徴づける主要な転写因子であることが強く示唆された。

公開されている内耳有毛細胞の RNA-seq や CAGE-seq のデータを調べたが、有毛細胞特異的な Six1 の転写開始点や転写産物は同定されなかった。したがって、有毛細胞特異的な

イソフォームがある訳ではなく、有毛細胞特異的エンハンサーの制御下で発現する SIX1 タンパク質が、多数の標的遺伝子のエンハンサーに結合し発現を活性化していると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

①Takahashi M, Tamura M, Sato S, Kawakami K.  
Mice doubly deficient in Six4 and Six5 show ventral body wall defects reproducing human omphalocele.  
Dis Model Mech. 2018 Oct 25;11(10). pii: dmm034611. doi: 10.1242/dmm.034611.  
査読有

②Sato S, Furuta Y, Kawakami K.  
Regulation of continuous but complex expression pattern of Six1 during early sensory development.  
Dev Dyn. 2018 Jan;247(1):250-261. doi: 10.1002/dvdy.24603. Epub 2017 Nov 30.  
査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

①Sato, S, Furuta, Y, Kawakami, K : The development of a novel tool to analyze cranial placode development. 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Funabori, May 10-13, 2017. (Program Book: p.104)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/biol/home.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。