

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07273

研究課題名（和文）聴覚と平衡覚を担う内耳感覚上皮の形成とその配置の分子機構の解明

研究課題名（英文）Study on the formation and arrangement of the inner ear sensory epithelium responsible for hearing and balance.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の内耳は、最も精巧な感覚器の1つである。形成過程では適時適所で転写因子 SIX1がはたらき、耳胞が領域化され、細胞が分化し、形作りを進行させる。本研究はSix1遺伝子の発現制御機構の解明に挑戦した。マウス内耳有毛細胞のクロマチン構造の解析等の結果、転写を活性化する3種類のエンハンサー候補を同定した。上流のシグナル分子WNTと転写因子FOXを同定できた。また、エンハンサー内のSIX1結合部位の存在が、Six1の連続的な発現を可能にすることも示唆された。2つの主要なエンハンサーを欠失するマウスは重篤な行動異常を示し、内耳が小さく、正常な形態の蝸牛が存在しないことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の内耳は最も精巧な感覚器の1つであり、聴覚と平衡覚を司る。本研究は、内耳の形成に不可欠な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を発現させるスイッチの候補、上流ではたらくシグナルと転写因子、Six1が内耳形成過程で発現を続ける仕組みの一端も明らかにできた。2つの重要なスイッチを欠失するマウスは、行動と内耳構造が異常となり、鯔耳腎症候群の新たなモデルになることもわかった。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 mammalian inner ear is one of the most elaborate sensory organs. During development, the transcription factor SIX1 acts in the right place at the right time to regionalise the otic vesicle, differentiate the cells and facilitate the organ formation. The present study was undertaken to elucidate the regulatory mechanisms of Six1 gene expression. Based on the analysis of the chromatin structure of mouse inner ear hair cells, among others, three candidate enhancers that activate transcription were identified. The upstream signalling molecule WNT and the transcription factor FOX were identified. The presence of SIX1 binding sites within the enhancers was also suggested to allow for the continuous expression of Six1. Mice lacking two major enhancers showed severe behavioral abnormalities, a small inner ear and the absence of a normal morphology of the cochlea.

研究分野：発生生物学

キーワード：内耳形成 プラコード 耳胞 ホメオボックス遺伝子 エンハンサー ゲノム編集 行動異常 有毛細胞

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の内耳は進化が生み出した最も精巧な感覚器の1つである。前庭と蝸牛に有毛細胞を備えたと5種類の平衡覚受容器と聴覚受容器(コルチ器)が分布する。内耳の原基である球形の耳胞では、腹側領域(神経感覚領域)に感覚神経が分化し耳胞の内側前方に神経節を形成し、次に感覚上皮が分化し受容器を形成する。内耳形成は発生生物学の中心課題「細胞外シグナルによって決まる部位特異的な細胞分化と3次元組織構築」を解析し、その破綻による聴覚・平衡覚障害を理解し、治療するために重要な研究対象である。

申請者らはホメオドメイン型転写因子 SIX1 が内耳形成の最初期からプラコード前駆領域で発現を開始し、耳プラコードでも発現を続けることを報告した。SIX1 は耳胞でも発現を続け、耳胞の腹側を特徴づけ、前庭と蝸牛および感覚神経の形成においても特異的な発現が亢進し、分化と形態形成に不可欠な機能を持つことを明らかにした。SIX1 は異なるパートナータンパク質と協同し、線維芽細胞を感覚神経あるいは有毛細胞へと分化転換する能力を持つため、SIX1 が適時適所で発現を続け、耳胞を腹側化し、感覚神経と有毛細胞を生み出すことが内耳形成の鍵であると考えられた。そこで SIX1 の発現活性化機構を解明すべく、進化的に保存されたエンハンサーの検索を行った。その結果、初期に機能するエンハンサー(プラコードの前駆領域:1種類、耳プラコード:1種類、耳胞:2種類、感覚神経:2種類)と、後期に蝸牛有毛細胞で機能するエンハンサー候補領域を7箇所同定した。しかし、人工的なレポーター解析では解析した配列の能力は明らかになるものの、生体のゲノム中で必須なエンハンサーとして機能するの否かは不明であり、エンハンサーを活性化する転写因子や上流のシグナルの同定にも至っていない。そこで、ゲノム編集を利用し個体と器官培養系でエンハンサーの機能を直接解析する本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

内耳形成過程では適時適所で SIX1 が順次発現し、はたらくことで、耳胞の腹側化、感覚神経の分化、有毛細胞の分化、という主要なイベントが引き起こされ、形作りが進行することが明確になってきた。しかし、生体のゲノムにおける各エンハンサーやエンハンサー候補の機能やエンハンサーを活性化する上流の転写因子やシグナルは不明であった。本研究は「細胞外シグナルを解読し精巧な内耳構造を作り出す分子機構」の解明を目的とした。具体的には、

- (1) Six1 有毛細胞特異的エンハンサーの同定と活性化機構の解明
  - (2) Six1 耳プラコード・耳胞特異的なエンハンサーの機能解析
  - (3) Six1 耳プラコード・耳胞特異的なエンハンサーを欠損するマウスの表現型解析
- である。

### 3. 研究の方法

#### (1) Six1 有毛細胞特異的エンハンサーの同定と活性化機構の解明

Six1 有毛細胞エンハンサーの同定: マウス 17.5 日胚の蝸牛有毛細胞の ATAC-seq 解析により、Six1 遺伝子の立体的区域(TAD)中の7箇所をエンハンサー候補領域として同定済である(ATAC1~ATAC7)。これら候補のレポーター解析をマウス蝸牛管の器官培養系で行い、有毛細胞における活性を調べる。同じ実験系で、ゲノム編集によるエンハンサーの機能阻害実験を行い、有毛細胞エンハンサーを同定する。また、マウス個体を用いた検証実験も行う。

有毛細胞への分化誘導シグナルの同定: マウス器官培養系で解析を行い、有毛細胞エンハンサーに結合する転写因子や作用するシグナルを同定する。

#### (2) Six1 耳プラコード・耳胞特異的なエンハンサーの機能解析

Six1 耳プラコード・耳胞エンハンサーの特徴の解析: Six1-21 エンハンサーは耳プラコードと耳胞における転写をどちらも活性化することができる。一方、Six1-12 エンハンサーは耳胞における転写を活性化するエンハンサーである。これら2つのエンハンサーについて、配列の特徴、エンハンサー活性を示す部位の違い、さらに、17.5 日胚の蝸牛有毛細胞におけるクロマチンの状態について明らかにする。

Six1 耳プラコード・耳胞エンハンサーを欠失するマウスの作製: 発現時期や発現部位は異なるが Six1-21 と Six1-12 という2つのエンハンサーをそれぞれ単独で、また両方欠失するヘテロマウスをゲノム編集により作製する。

### (3) 耳プラコード・耳胞特異的なエンハンサー欠失マウスの表現型解析

Six1-21 欠失マウスの表現型解析：ヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスの表現系の解析を行う。

Six1-12 欠失マウスの表現型解析：ヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスの表現系の解析を行う。

Six1-21/Six1-12 二重欠失マウスの表現型解析：ヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスの表現系の解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) Six1 有毛細胞特異的なエンハンサーの同定と活性化機構の解明

Six1 有毛細胞エンハンサーの同定：ATAC1～ATAC7 について、レポーター解析により特異的なエンハンサー活性の有無を明らかにすべく、pT2A-HL2 ベクター（hsp68 プロモーター、レポーター遺伝子 LacZ、Tol2 トランスポゾン配列を含む、名古屋大学・隅山健太先生に分与いただいた）に連結したレポータープラスミドを構築した。次に、野生型マウス 13 日胚の蝸牛管を単離し、コラーゲンとマトリゲルでコートしたフィルター上で培養する器官培養系の確立を試みた。先行研究を参考に、適切な成長因子等を加えて培養し、切り開いた蝸牛管を伸長させ維持することはできるようになった（広島大学・林利憲先生にご指導いただいた）。しかし、エレクトロポレーションによる再現性の良いプラスミド DNA の導入には成功しておらず、特異的なエンハンサー活性の検出に至っていない。

以上の結果を受け、塩基配列の特徴から有毛細胞特異的なエンハンサー候補の絞り込みが可能かどうか、再度検討した。その結果を表 1 に示す。ATAC1 は耳プラコードの段階から機能しており、耳胞そして有毛細胞においても転写活性化に関わるエンハンサーかもしれない。ATAC2 は耳胞の段階から活性化に関わる可能性がある。Sox2 陽性 (Sox2+) 蝸牛管細胞の ATAC-seq を行った報告 (Wilkerson et al, 2019) も考慮すると、ATAC1 と ATAC2、さらに ATAC6 がエンハンサーとして協同し、有毛細胞における Six1 の発現を活性化している可能性を考えられる。蝸牛管の ChIP-seq を行った報告 (Li et al, 2020) は、ATAC1 および ATAC2 への Six1 の結合を示していた。

表 1 ATAC1～ATAC7 の塩基配列の特徴 (1)

| E17.5 蝸牛有毛細胞 ATAC-seq<br>(本研究) |                       |                         | E12-16 Sox2+/- 蝸牛管細胞 ATAC-seq<br>Wilkerson et al (2019) |           |             |             |           | E16.5 蝸牛管 ChIP-seq<br>Li et al (2020) |                  |                  | ENCODE           | 位置が重なる保存されたエンハンサー |         |           |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------------|---|-----------|-------------|-------------|-----------|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|---------|-----------|
| peak 番号                        | position              |                         | peak value  | E12 Sox2+ | E14.5 Sox2+ | E14.5 Sox2- | E16 Sox2+ | E16 Sox2-                             | E16.5 蝸牛 H3K27ac | E13.5 蝸牛 SIX1 結合 | E16.5 蝸牛 SIX1 結合 | cCRE              | エンハンサー名 | 既知の活性化部位  |
| ATAC1                          | Six6-Six1 intergenic  | Six1 の 3' 端より 6 kb 下流   | 113   | 高い        | 高い          | 低い          | 高い        | 低い                                    | 低い (3' 側にシフト)    | なし               | 高い               | ○                 | Six1-21 | 耳プラコード、耳胞 |
| ATAC2                          | Six1-Six4 intergenic  | Six1 の 5' 端より 3 kb 上流   | 66  | 高い        | 高い          | 低い          | 高い        | 低い                                    | 低い               | なし               | 高い               | ○                 | Six1-12 | 耳胞        |
| ATAC3                          | Mnat1 intron          | Six1 の 5' 端より 100 kb 上流 | 54  | なし        | なし          | なし          | なし        | なし                                    | なし               | なし               | なし               | ○                 |         |           |
| ATAC4                          | Slc38a6 intron        | Six1 の 5' 端より 260 kb 上流 | 58  | なし        | なし          | なし          | 低い        | なし                                    | なし               | なし               | なし               | ○                 |         |           |
| ATAC5                          | Slc38a6 intron        | Six1 の 5' 端より 285 kb 上流 | 59  | なし        | 低い          | なし          | 低い        | なし                                    | なし               | なし               | なし               | ○                 |         |           |
| ATAC6                          | D83001302 ORik intron | Six1 の 5' 端より 350 kb 上流 | 57  | 低い        | 高い          | 低い          | 高い        | 低い                                    | なし               | なし               | なし               | ×                 |         |           |
| ATAC7                          | intergenic            | Six1 の 5' 端より 360 kb 上流 | 69  | なし        | なし          | なし          | なし        | なし                                    | なし               | 低い               | 低い               | ○                 |         |           |

\* E17.5 蝸牛有毛細胞 ATAC-seq、E12-16 Sox2+/- 蝸牛管細胞 ATAC-seq、E16.5 蝸牛 ChIP-seq の peak value の列はいずれも 3 段階に色分けした。ただし、peak value がほぼゼロの場合は「なし」と表示した。ENCODE の candidate cis-Regulatory Element (cCRE) は同定されている場合に「○」と表示した。ATAC1 は Six1-21、ATAC2 は Six1-12 という保存されたエンハンサーと位置が重なる。

### (2) Six1 耳プラコード・耳胞特異的なエンハンサーの機能解析

有毛細胞への分化誘導シグナルの同定：有毛細胞エンハンサーの特定には至っていない。しかし、3 つの異なるエンハンサー、ATAC1、ATAC2、ATAC6 が協同してはたらくと仮定すると、表 2 に示す塩基配列の特徴より、いくつかの転写因子とその上流のシグナルによる制御を推察することができる。ATAC1 と ATAC2 はともに TCF/LEF の結合配列を持ち、内耳の形成過程で重要な役割を果たす Wnt シグナルの関与が示唆される。ATAC1 と ATAC6 には FOX の結合配列があるが、FOX は TCF/LEF および  $\beta$ -catenin と相互作用し、Wnt シグナルを増強する転写因子である。また、リン酸化が FOX の機能に重要であることもわかっている。ATAC1 と

ATAC2 は SIX1/2 の結合配列を持っている。内耳形成における Six1 の発現はプラコード前駆領域にはじまるが、耳プラコード、耳胞、蝸牛の感覚上皮、有毛細胞、さらに耳胞に由来する感覚神経へと続く。SIX1/2 の結合を強く示唆するデータ（表 1 と表 2）は、順次機能する複数のエンハンサーによる Six1 発現の継続性の分子基盤を明らかにした可能性がある。

以上の結果に基づき、理研 BRC・天野孝紀先生と議論をさせていただき、内耳形成に不可欠な転写因子である SIX1 の発現制御に関わる主要なエンハンサー Six1-21 (ATAC1) と Six1-12 (ATAC2) を単独または両方欠失するマウスの作製を決めた。gRNA のデザインから受精卵への導入、目的とする変異マウスの同定まで天野先生に進めていただき、マウスの供給を受けた。

表 2 ATAC1～ATAC7 の塩基配列の特徴 (2)

|       | 進化的な保存性   | ENCODE<br>(60 vert cons<br>element lod score) | 結合する転写因子の候補<br>(JASPAR CORE vertebrates<br>collection, 2018) |
|-------|-----------|---|--|
| ATAC1 | 哺乳類～魚類    | 2,661   | TCF, SIX2, FOX   |
| ATAC2 | 哺乳類～魚類    | 1,198   | TCF, SIX1, SOX, GATA, PAX                                    |
| ATAC3 | 哺乳類～爬虫類   | 409   | TCF, SIX1, SOX, FOX  |
| ATAC4 | 有胎盤動物     | 53  | TCF, SOX, FOX, PAX, SMAD                                     |
| ATAC5 | 有胎盤動物     | 196   | TCF, SOX, FOX, PAX   |
| ATAC6 | 有胎盤動物     | 0   | FOX  |
| ATAC7 | 哺乳類～爬虫・鳥類 | 1,590   | TCF, SIX2, SOX, FOX, PAX                                     |

### (3) 耳プラコード・耳胞特異的なエンハンサー欠失マウスの表現型解析

Six1-21 と Six1-12 エンハンサーのヘテロ欠失マウス、ホモ欠失マウスのいずれも期待されるメンデル比で生まれ、胚性致死ではなく、明らかな形態や行動の異常も見られなかった。Six1-21 は Six1 エクソン周辺の非コード配列中で最も保存性の高い配列であり、耳プラコードと耳胞に加え、嗅上皮、上頰神経節、脳下垂体前葉、唾液腺でも転写を活性化するため、この結果は驚きであった

そこで、Six1-21 と Six1-12 の両方を同時に欠失するアリルを持つヘテロ欠失マウスを作製したが、明らかな異常は見られなかった。そこで、ホモ欠失マウスを作製したところ、Six1-21/Six1-12 二重欠失マウスは重篤な行動異常を示すことがわかった。二重欠失マウスは頭部をくり返し上げる動作 (head tossing) と巡回行動 (circling) を示し、内耳機能の異常が強く示唆された。しかし、出生直後に死亡する Six1 欠損マウスでも、10.5 日胚における耳胞の大きさや形には明らかな異常は認められず、ヘテロ欠失マウスでは異常が見られない。したがって、Six1-21/Six1-12 二重欠失マウスにおいても耳胞は形成され、耳胞以降の内耳形成過程の異常が示唆される。Six1-21/Six1-12 二重欠失マウスの成体から内耳を取り出して観察しところ、内耳が小さく、正常な形態の蝸牛が存在しないこともわかった (図 1)。この表現型は、鯰耳腎症候群の最適なモデルとされる Catweasel 変異 (Six1<sup>Cwe</sup>) に類似することから、新たなモデル動物として期待される。内耳の形態異常について、より詳細な解析を進めている。

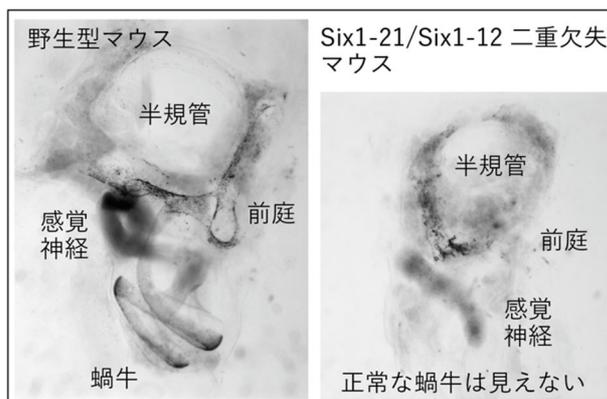


図 1 Six1-21/Six1-12 二重欠失マウスの表現型

### <引用文献>

Wilkerson BA, Chitsazan AD, VandenBosch LS, Wilken MS, Reh TA, Bermingham-McDonogh O. Open chromatin dynamics in prosensory cells of the embryonic mouse cochlea. *Sci Rep* 9(1):9060, 2019.

Li J, Zhang T, Ramakrishnan A, Fritsch B, Xu J, Wong EYM, Loh YE, Ding J, Shen L, Xu PX. Dynamic changes in cis-regulatory occupancy by Six1 and its cooperative interactions with distinct cofactors drive lineage-specific gene expression programs during progressive differentiation of the auditory sensory epithelium. *Nucleic Acids Res* 48(6):2880-2896, 2020.

Bosman EA, Quint E, Fuchs H, Hrabé de Angelis M, Steel KP. Catweasel mice: a novel role for Six1 in sensory patch development and a model for branchio-oto-renal syndrome. *Dev Biol* 328(2):285-96, 2009.

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Misa Minegishi, Takahiro Kuchimaru, Kaori Nishikawa, Takayuki Isagawa, Satoshi Iwano, ..., Tatsuyuki Sato, Daigo Sawaki, Shigeru Sato, ... | 4. 巻<br>14              |
| 2. 論文標題<br>Secretory GFP reconstitution labeling of neighboring cells interrogates cell-cell interactions in metastatic niches                       | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>8031-8031 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41467-023-43855-2  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Junpei Terakawa, Vanida A Serna, Devi M Nair, Shigeru Sato, Kiyoshi Kawakami, Sally Radovick, Pascal Maire, Takeshi Kurita | 4. 巻<br>27              |
| 2. 論文標題<br>SIX1 cooperates with RUNX1 and SMAD4 in cell fate commitment of Mullerian duct epithelium                                 | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Cell Death and Differentiation   | 6. 最初と最後の頁<br>3307-3320 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41418-020-0579-z   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sato S, Kawakami K  |
| 2. 発表標題<br>Regulation of Six1 expression during hair cell development in the inner ear |
| 3. 学会等名<br>日本発生物学会第53回大会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|