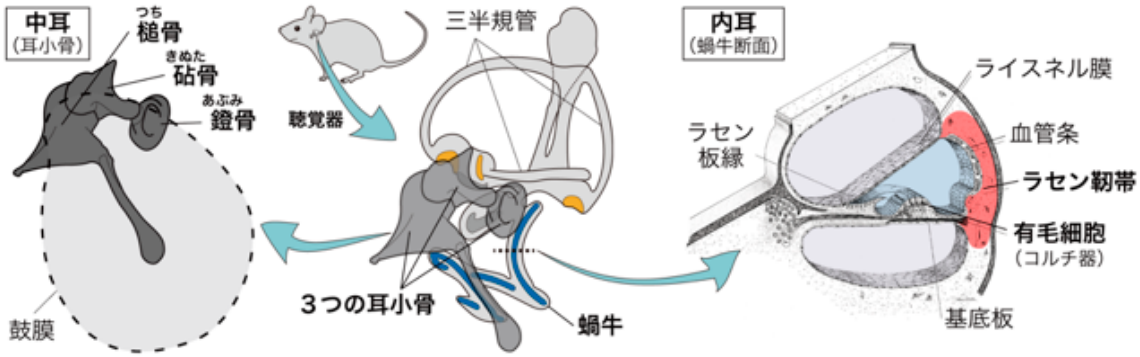
160　聴覚器の精緻な形態形成への転写因子Scx/Sox9の関与	樋口　真之輔

【目的】聴覚器としての中耳や内耳が、発生過程を経て正常な機能をもつ形態を獲得する仕組みのより深い理解を目的とした。中耳や内耳は、音波が鼓膜に機械刺激として伝わり、内耳の有毛細胞において神経の興奮に変換されるまでの過程で決定的に重要なはたらきをもつ。本研究では、中耳、内耳が正常な形態を獲得する発生学的メカニズムを、靭帯や腱の成熟過程や関連する転写因子に焦点を絞り、発生学的に探究した。特に 3 つの耳小骨の「つなぎ目」である靭帯に着目し、その靭帯の成熟に必須である転写因子 Scx や Sox9 の寄与を明らかにすることで、鋭敏な聴機能を担う中耳の形態づくりのしくみを探った。

【方法】Scx の組織特異的転写制御領域を用いて、*Scx* 発現領域で赤色蛍光蛋白質 tdTomato を発現する *ScxTomato* トランスジェニック（Tg）マウスを作製した。続いて、*Sox9EGFP* ノックインマウスと *ScxTomato Tg* マウスを交配した。得られた *ScxTomato;Sox9EGFP* マウス胚および新生仔を CUBIC-L/R 法により透明化して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】メッケル軟骨と顎関節形成領域に $Scx^{+}/Sox9^{+}$細胞がみられた。さらに、これらの蛍光レポーターマウスを *Scx* 欠失マウスと交配することで、Scx が欠失した場合の $Scx^{-}/Sox9^{+}$細胞、$Scx^{+}/Sox9^{+}$細胞、$Scx^{+}/Sox9^{-}$細胞の時間的・空間的局在変化の詳細を同時に可視化することができた。

聴覚器としての中耳や内耳の精緻な形態形成を保障するメカニズムはあまり知られていない



160. 聴覚器の精緻な形態形成への転写因子 Scx/Sox9 の関与

樋口　真之輔

*広島大学 大学院医系科学研究科 生体分子機能学

Key words：耳小骨，Scleraxis，共焦点レーザー顕微鏡，立体再構築

緒　言

哺乳類の中耳や内耳は聴覚器として、音波を効率的に神経の興奮に変換して中枢に伝える［1］。まず、中耳については、音エネルギー増幅器として重要なはたらきをもつ。というのも、空気中を伝播した音波は液体表面でほとんど反射され、液体内には伝わりにくいためである：陸棲動物が細胞外液で浸された有毛細胞で音を感知するのに、何も「工夫」がないと、音波のエネルギーは有毛細胞に達するまでに 30 分の 1 になる。これに対して哺乳類は、まず鼓膜と鐙骨底の面積比によって音圧を約 10 倍にし、さらに 3 つの耳小骨によるテコ運動によって音波振動を約 3 倍に増強するという仕組みにより、音エネルギーの損失を抑えている（図 1）。ところが、これら 3 つの耳小骨が緻密な形態をもち、さらにそれらが正しく関節するための発生学的メカニズムについては理解が不十分であり本研究の目的の 1 つとした。

中耳と並んで、内耳にも、その中に含まれる有毛細胞に鋭敏な感度を保障するしくみがある。内耳は聴覚器官において音波による機械刺激から神経の興奮への変換において中心的な役割を担う（図 1）。内耳の有毛細胞が正常に働くために、有毛細胞の支持組織や、有毛細胞が置かれる生理学的環境が常に調節されている。中でも、蝸牛内におけるカリウムイオン K^+ の循環が重要であり、これが滞ると難聴の原因となる。とくに、K^+ 循環の経路であるラセン靭帯はコラーゲン線維性の組織で、この形成不全や不調がヒトの先天性難聴や老齢期における難聴の原因の一つだという示唆もあるが、内耳組織の中でもこれまであまり注目されてこなかった。種々の先行研究によると、ラセン靭帯の形成には Scleraxis（Scx）が重要だと考えられる。そこで、*Scx* 欠失マウスやレポーターマウスを用い、形態学および分子生物学的手法を駆使して、鋭敏な聴機能を実現するための組織形成のメカニズムを明らかにできる可能性がある。

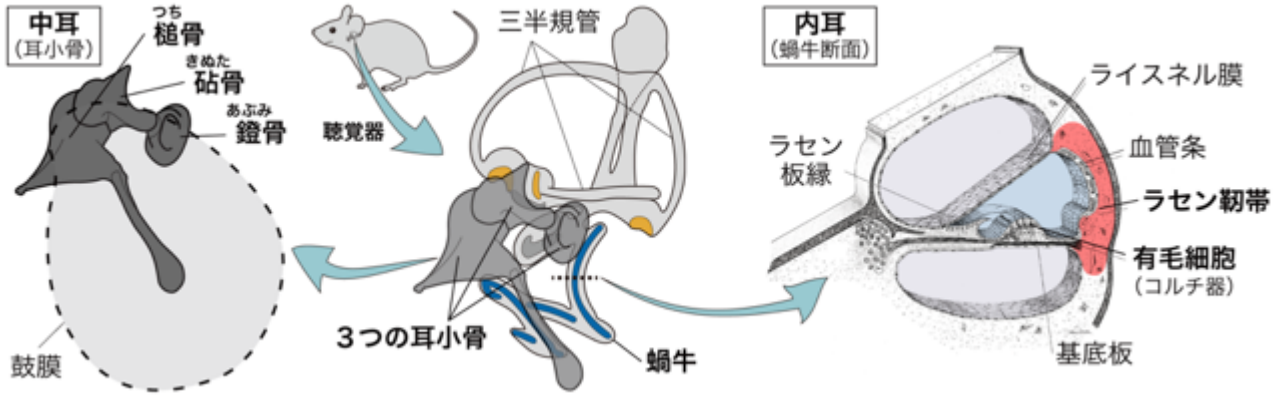


図 1. 聴覚機能を支える中耳や内耳の精緻な構造
中耳や内耳は、その形態と機能が密接に連関している。中耳は音エネルギー増幅器、内耳は有毛細胞に鋭敏な感度を保障する仕組みをもつ。

*現在の所属：神戸大学附属学校部

発生過程において、軟骨と腱／靭帯の形成はそれぞれ basic helix-loop-helix 型転写因子である Sxleraxis（Scx）と SRY-box containing gene 9（Sox9）によって制御されている。軟骨と腱／靭帯は互いに独立した細胞集団として生じ、分化成熟が進行するにつれて、骨／軟骨 - 腱／靭帯接合部を形成する。この接合部の細胞集団における Scx と Sox9 の発現履歴は一様ではない。*Cre-loxP* システムを用いた細胞系譜解析によって、骨/軟骨-腱/靭帯連結部を形成する細胞群は、軟骨から腱／靭帯に向かって $Scx^{-}/Sox9^{+}$細胞、$Scx^{+}/Sox9^{+}$細胞、そして $Scx^{+}/Sox9^{-}$細胞という勾配のある発現履歴をもつ、ユニークな細胞集団であることが明らかになっている。そこで、聴覚器を対象として、Scx と Sox9 を発現する細胞を蛍光イメージングによって可視化する新しいシステムを構築すれば、複雑な頭蓋顔面領域における $Scx^{+}/Sox9^{+}$細胞の局在と形態形成への寄与を解明できる可能性がある。

そこで本研究は、聴覚器としての中耳や内耳が、発生過程を経て正常な機能をもつ形態を獲得する仕組みのより深い理解を目的とした。中耳や内耳は、音波が鼓膜に機械刺激として伝わり、内耳の有毛細胞において神経の興奮に変換されるまでの過程で決定的に重要なはたらきをもつ（図 1）[1]。本研究では、中耳、内耳が正常な形態を獲得する発生学的メカニズムを、靭帯や腱の成熟過程や関連する転写因子に焦点を絞り、発生学的に探究した。特に 3 つの耳小骨の「つなぎ目」である靭帯に着目し、その靭帯の成熟に必須である転写因子 Scx や Sox9 の寄与を明らかにすることで、鋭敏な聴機能を担う中耳の形態づくりのしくみを探った。

方法および結果

1. マイクロ CT による *Scx* 欠失マウスの表現型解析

まず、*Scx* 欠失マウスにおける頭蓋顎顔面全体の形態の際の有無と程度を把握するために、マイクロ CT を用いて 3.5 ヶ月齢の *Scx* 欠失マウスを対照マウスとともに撮影し、立体構築した（図 2）。下顎骨に着目すると、側頭筋の付着部である筋突起が低形成で、この段階で腱、筋のみならず骨格にも一定の影響が生じていた。さらに、顎関節をつくる関節突起、下顎突起が低形成であった。また、咬筋の顎骨への付着部である咬筋稜が、*Scx* 欠失マウスでは腹側に拡大しており、異形成であった（図 2）。このように、*Scx* 欠失による腱の形成不全や、これに由来する筋、骨格の異形成が様々に生じていた。

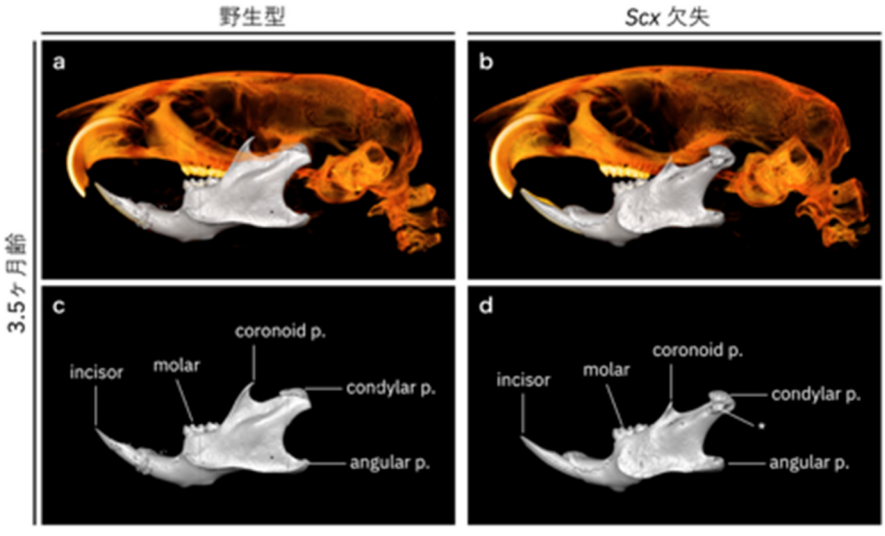


図 2. マイクロ CT 像に基づく *Scx* 欠失マウスの頭蓋顎顔面の表現型

a、b） 野生型（a）、*Scx* 欠失（b）の 3.5 ヶ月齢マウスにおける立体構築像。下顎骨を白く表示し、それ以外の領域はオレンジ色でレンダリング像を示す。

c、d） a（c）、b（d）それぞれにおいて下顎骨のみを表示したもの。

2. 動物の作製と胚の透明化

Scx の組織特異的転写制御領域を用いて、*Scx* 発現領域で赤色蛍光蛋白質 tdTomato を発現する *ScxTomato* トランスジェニック（Tg）マウスを作製した。続いて、*Sox9EGFP* ノックインマウスと *ScxTomato* Tg マウスを交配した。得られた *ScxTomato;Sox9EGFP* マウスの新生仔（P0）を CUBIC-L/R 法により透明化した。CUBIC-B 液により脱灰を行うと、蛍光を保ったまま十分な透明度を得られることがわかった。

3. 顎関節における Z スタック画像の取得と立体構築

透明化した P0 マウスのサンプルを共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、メッケル軟骨と顎関節形成領域に $Scx^{+}/Sox9^{+}$細胞がみられた。さらに、これらの蛍光レポーターマウスを Scx 欠失マウスと交配することで、*Scx* が欠失した場合の $Scx^{-}/Sox9^{+}$細胞、$Scx^{+}/Sox9^{+}$細胞、$Scx^{+}/Sox9^{-}$細胞の時間的・空間的局在変化の詳細を同時に可視化することができた。

このマウスの新生仔において、顎関節領域における観察を行った。まずは多光子顕微鏡で観察したところ、光学的連続切片を得ることができ、これに基づいて詳細な形態構造を Scx/Sox9 の発現とともに可視化できるようになった。ところが、多光子顕微鏡を用いると励起レーザーの特性のために自家蛍光が非常に問題となり、最終的には単光子の共焦点レーザー顕微鏡により画像を取得した。新生仔において、CUBIC-L/R 法により十分に透明化できていれば、作動距離の長い水浸レンズを用いることで、600 μm 程度の深度まで十分な SN 比を保って撮影できることがわかった。

開発した手法を用いて、*Scx* を欠失し、かつ Scx は赤、Sox9 は緑の蛍光をもつマウスを交配により作製した。*Scx* はノックアウトされているが、レポーターの発現により、*Scx* が発現「すべき」細胞を可視化することができた。得られた Z-スタック画像に基づき、顎関節領域の下顎頭とその周囲の Scx/Sox9 両陽性細胞を観察した（図 3）。

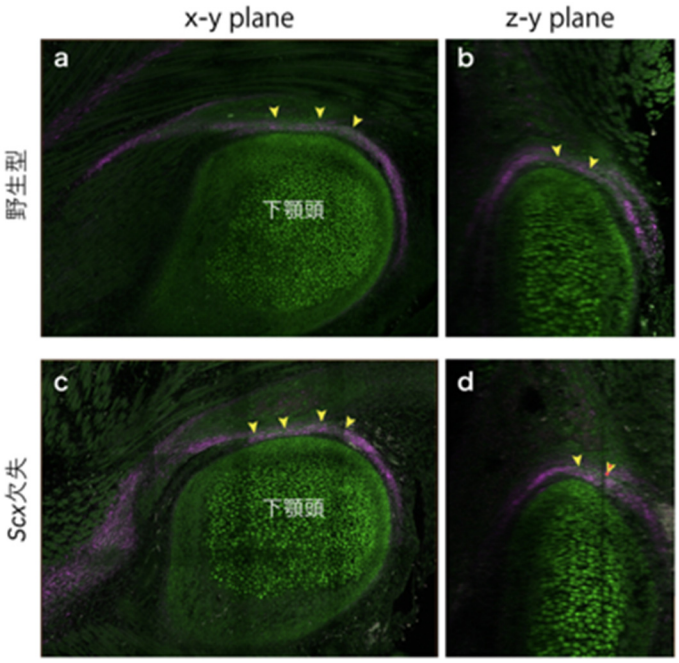


図 3. 共焦点レーザー顕微鏡の Z-スタック像に基づく下顎頭周辺の細胞分布の観察
a～d）野生型（a、b）、Scx 欠失（c、d）の新生仔マウスにおける観察。マゼンタ：Scx、緑：Sox9 で示す。

新生仔では下顎頭の形態には大きな差異はないが、この立体構築に基づくと、Scx/Sox9 両陽性である細胞群が関節円板の前駆細胞に多かった（図 3）。この立体構築の元画像と y-z 画像を参照しても、やはり Scx/Sox9 両陽性細胞、Scx 欠失マウスについては「Scx/Sox9 両陽性細胞であるべき細胞」が多く分布していた。

3. 顎関節におけるZスタック画像の取得と立体構築

さらに、上記の手法を中耳の耳小骨にも適用し、同様に観察を行った。耳小骨は槌骨、砧骨、鐙骨の3つの骨からなり、それぞれが互いに関節でつながっており、Scx/Sox9両陽性である細胞群があると予想できた(図4)。結果、Scx/Sox9両陽性である細胞群は、各耳小骨の関節面、および槌骨と鼓膜の接続部に見られた。

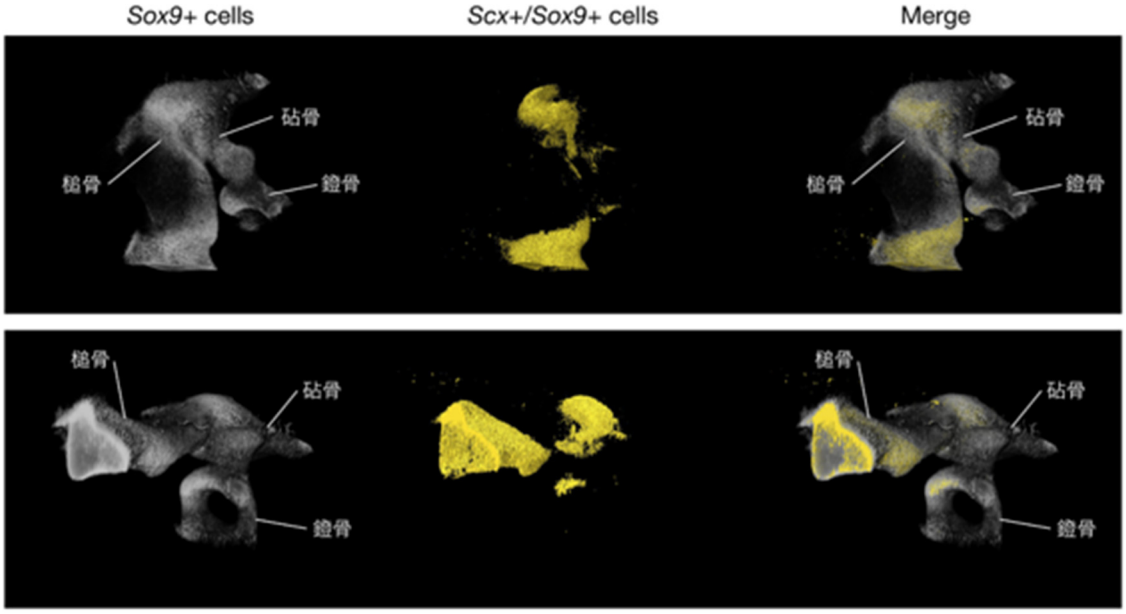


図4. 共焦点レーザー顕微鏡のZ-スタック像に基づく耳小骨における細胞分布
野生型の新生仔マウスにおいて、中耳領域を立体再構築したもの。灰：Sox9陽性細胞、
黄：Scx/Sox9両陽性細胞。

考　察

1. 聴覚器の精緻な形態形成へのScx/Sox9の関与とそれを可視化する手法の開発

本研究により、動物モデルと透明化手法、光学顕微鏡を用いて頭蓋顔面におけるScsとSox9の発現を、時空間的に把握する系を提示できた。具体的には、顎関節においては*Scx*ノックアウトマウスにおける「両陽性であるべき」細胞が野生型に比べて多くみられ、さらに耳小骨においては、耳小骨の関節面や、顎関節の関節円板の前駆細胞に存在するScx/Sox9両陽性の細胞を可視化できた。これらの手法を他のステージ、組織にも適用することで、「顔と頭の形づくり」のより深い理解を目指せると考えられた。

2. 今後の聴覚器研究への発展性

本研究で着目した3つ揃いの耳小骨も、内耳のラセン靭帯のいずれもが哺乳類の系統で新しく獲得された構造である。そのため、他の系統の動物との比較発生学的解析から、進化の観点で哺乳類の成り立ちをより深く理解できる可能性がある。例えば鳥類の内耳蝸牛には、螺旋靭帯が存在しないが(図5)、さえずる鳥がいることからわかるように、一定の鋭敏な聴覚を備える。だとすると、ヒトをはじめ哺乳類では螺旋靭帯が正常な聴覚に必須な生物学的理由は未解明の問題であり、これに本研究の知見が寄与できると考えられた。

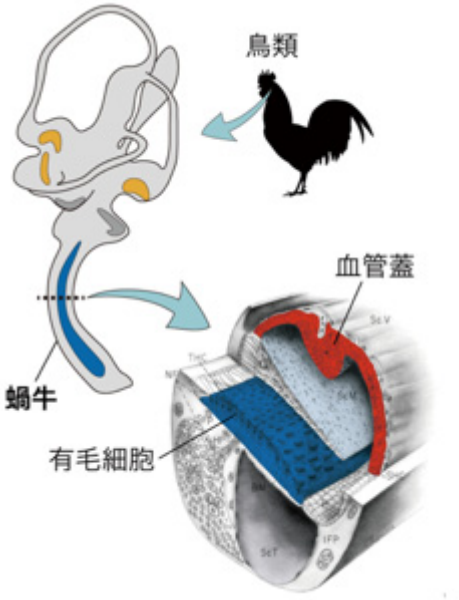


図 5. 鳥類の内耳には哺乳類とは異なり螺旋靭帯が存在しない
螺旋靭帯に対応する部分には上皮性の血管蓋があるのみであるが、鳥類も種によっては非常に鋭敏な聴覚を備える。

また、マウスや他のモデル動物において難聴モデルが作製されているが、本研究の成果を関連研究の推進に還元できる可能性がある。例を挙げれば、70 歳台の半分が老人性難聴だとされるように、超高齢化社会において難聴の克服は重要な課題であり、本研究の知見が難聴の病態解明に貢献できるかもしれない。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、同講座主任教授の宿南知佐先生、独立行政法人東京都健康長寿医療センター老年病態研究チーム筋老化再生医学研究の吉本由紀博士、および School of Dental Sciences, Newcastle University の Ralf Kist 博士である。また、本研究の遂行に関連して先端バイオイメージング支援プラットフォーム（ABiS）により、愛媛大学大学院医学系研究科分子病態医学講座の今村健志先生、川上良介先生から多大なるご支援をいただいたことに深謝申し上げる。

文　献

1） Higuchi S, Sugahara F, Pascual-Anaya J, Takagi W, Oisi Y, Kuratani S. Inner ear development in cyclostomes and evolution of the vertebrate semicircular canals. Nature. 2019 Jan;565(7739):347-350. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30518864 DOI: 10.1038/s41586-018-0782-y.