

平成30年6月18日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06741

研究課題名(和文) 鳥類の頸髄の特殊化に関わる運動神経群の発生の解明

研究課題名(英文) Elucidation of development of motor neuron groups related to specialization of the avian cervical spinal cord

研究代表者

八木沼 洋行 (Yaginuma, Hiroyuki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90230193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、鶏胚の頸髄特異的なアポトーシスを起こす運動神経(MN)がFoxp1の発現によって識別できることを見いだした。次いで、Foxp1陽性MNはアポトーシスを免れると四肢筋を支配する外側運動柱運動神経(LMC-MN)様に分化することを明らかにした。しかし、Foxp1には、直接アポトーシスを誘導する作用は認められなかった。さらに、通常上腕部領域で発現するHox遺伝子の異所性発現は、アポトーシスを防ぎ、Foxp1陽性MNをLMC-MN様に分化させることを明らかにした。これらの結果は、頸髄ではLMC-MNと相同のMNがHox依存的なアポトーシスによって除去されることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：In the avian embryo, a certain population of motor neurons (MNs) in the non-limb-innervating cervical spinal cord undergoes apoptosis in early developmental stages. We found that these apoptotic MNs can be distinguished by Foxp1 expression. After apoptosis inhibition Foxp1+ MNs exhibited characteristics of lateral motor column (LMC) MNs that innervate limb muscles. Functional analyses of Foxp1 indicated a role for Foxp1 in specifying LMC fate, but not in apoptosis induction. Furthermore, ectopic expression of Hox genes that are normally expressed in the brachial region prevented apoptosis, and directed Foxp1+ MNs to LMC MNs at the cervical level. These results suggest that Foxp1+ MNs in the cervical spinal cord are homologous to LMC MNs, and are eliminated by apoptosis depending on the Hox expression pattern.

研究分野：神経解剖学、発生学

キーワード：アポトーシス 運動神経 Foxp1 Hox 鳥類 頸髄 外側運動柱

1. 研究開始当初の背景

鳥類の頸部は哺乳類に比べて頸椎の数が多く、運動の自由度も大きい。頸部の運動神経の発生様式を見ても、鳥類に特異的な現象が観察される。それらの一つは、発生の早期に起こる運動神経細胞死である。この細胞死は標的器官との関係によって起こる細胞死ではなく、特定の分化を行った運動神経が細胞死を起こすことが、これまで明らかになっている。運動神経では発生の過程でLhx3という転写因子が前根から軸索を出す全ての運動神経で発現されるが、死ぬ直前の細胞からはこのLhx3の発現が消えることが示唆されているが、それ以上の詳しい解析はなされておらず、死ぬ細胞がどのような運動神経のサブグループに属するのかが不明であった。

もう一つの頸部の特徴的な点としては、運動神経にもかかわらず、軸索を後根から出して僧帽筋を支配するグループ(背側運動神経核:dMN)が存在していることである(2013 Kobayashi, Yaginumaら)。このサブグループの発生に関わる分子機構、とくに転写因子の働きについては未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

上記のような背景をもとに、本研究では以下の2つを目的として研究を進めた。

【1】細胞死を起こして消えてしまう運動神経群のidentity および細胞死を制御するメカニズムの解明

【2】背側運動神経核(dMN)の発生の機序、特に転写因子群の働きの解明

本研究を通して、運動神経の分化発生に関する個体発生的な知見はもとより、鳥類(そしてその祖先とされる恐竜類)に特徴的な細く長い頸部や頸髄の形質の獲得に関しての進化発生的な知見の取得も目指した。

3. 研究の方法

【1】細胞死を起こして消えてしまう運動神経群のidentity の解明

始めに、運動神経サブグループのマーカー分子(Is11, Lhx3, MNR, Foxp1)の発現と細胞死マーカーの発現を詳しく調べ、細胞死を起こす細胞群に特異的な分子を同定する。次いで、この細胞死を抑制することが明らかになっているBcl2の強制発現によって、この細胞群を不死化し、この細胞群のその後の発生を明らかにする。そのためには、孵卵1.5ないし2日のニワトリ胚において、レトロウイルスベクタープラスミドを電気穿孔法にて頸髄の一侧にBcl2を導入する。グループ特異的なマーカー(LIM-HD 転写因子群, RALDH2 など)で免疫染色等を行い、死ぬべきであった細胞のその後の発生について明らかにする。また、それらの投射先について神経線維全体に対す

る免疫染色法や順行性及び逆行性トレーサを用いて検索する。さらに、この細胞死の制御に関与すると思われる分子群について強制発現や発現抑制を行い、それらの分子群の機能を明らかにする。

【2】背側運動神経核(dMN)の発生の機序、特に転写因子群の働きの解明

Foxp1 やOnecut は、いずれも体性運動神経の発生に深く関与する転写因子である。それらが鰓弓運動神経に近い性質を持つdMNの発生に対してどのような影響を及ぼすか検討する。Onecut(Onecut 1)のmRNAはmicroRNA-9(miR-9)によって分解されることが知られているので、これを発現するベクターを孵卵2日程度のニワトリ胚の頸髄に電気穿孔法で導入して発現させることにより発現を抑える実験を行う。また、脊髄の吻尾軸の特定の部位に発現するHox遺伝子のdMNにおける発現について明らかにする。

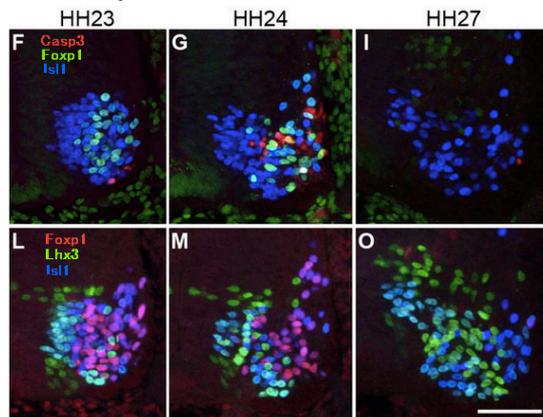
4. 研究成果

【1】細胞死を起こす運動神経群のidentity および細胞死を制御するメカニズムの解明

(1) 運動神経サブグループのマーカー分子(Is11, Lhx3, MNR, Foxp1)の発現と細胞死マーカー発現の解析

運動神経マーカーと細胞死マーカーとの分布を詳しく解析したところ、細胞死マーカーはLhx3陰性でFoxp1陽性の細胞の分布と一致していた。

図1 F, G, I: 細胞死の前(HH23)、細胞死期間(HH24)、細胞死期間後(HH27)における細胞死マーカー(赤:Casp3)とFoxp1(緑)の運動神経(Is11)における発現。L, M, O: 同じくLhx3(緑)とFoxp1(赤)の発現。Foxp1陽性細胞と細胞死マーカーの共存が認められ、細胞死時期の後にはFoxp1陽性細胞が認められない。



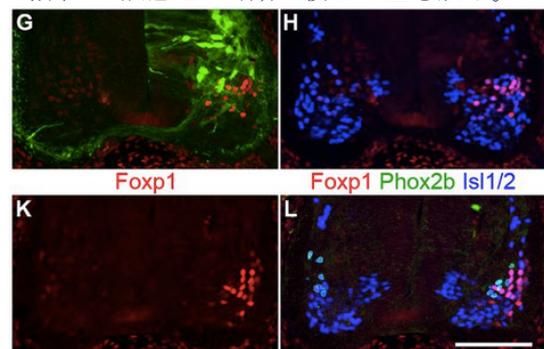
個々の細胞内での共存関係を調べたとこ

る、すべての死ぬ細胞において Foxp1 の発現が認められ、Lhx3 との共存はほとんど認められなかった。さらに、ステージを追って調べたところ、Foxp1 陽性の細胞は細胞死が起こる時期の前に出現し、細胞死が終わる時期には消失していることが明らかとなった (図 1)。この結果は、この細胞死は Foxp1 陽性の細胞群に起こり、この細胞死によってこの運動神経グループは排除されてしまうことを示す。

(2) 不死化した死ぬべき細胞の分化

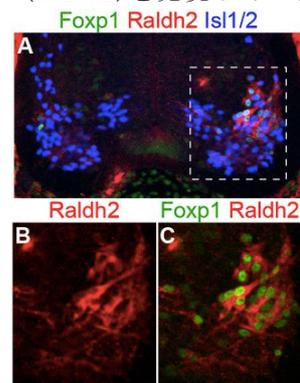
細胞死抑制遺伝子の Bcl2 を脊髄の側に導入して発現させたところ、細胞死が終わる時期になっても Foxp1 陽性の運動神経が認められた。また運動神経の総数も 27%ほど増えていることが明らかになった (図 2)。

図 2 Bcl2 (緑) 発現により Foxp1 陽性細胞 (赤) が細胞死の時期の後まで生き残る。



これら Foxp1 陽性の細胞群がどのような分化をするのか、外側運動神経 (LMC) および交感神経節前神経の分化マーカー (Raldh2、Lhx1、pSmad) の発現を調べたところ、LMC の分化マーカーの発現が認められた (図 3)。

図 3 Bcl2 導入により生き残った Foxp1 陽性細胞は外側運動神経細胞様のマーカー (Raldh2) を発現している。



また、軸索の投射先を調べたところ、LMC 相当の運動神経として矛盾がないことが明らかとなった。

(3) Foxp1 の細胞死と頸部運動神経の分化における役割

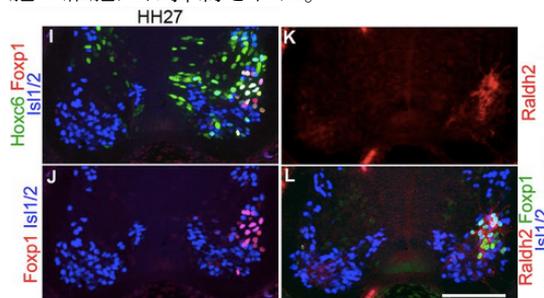
細胞死をおこす細胞群には Foxp1 が発現していることから、Foxp1 自身が細胞死に何らかの機能を果たしているか検討した。Foxp1 の発現を Foxp1 の shRNA の導入によって低下させた後も、逆に Foxp1 の強制発現したのちも、細胞死は同程度起こることが明らかとなり、Foxp1 の発現が細胞死の直接の原因とはなっていないことが明らかとなった。

さらに Foxp1 の頸髄運動神経の分化における役割を明らかにするため、頸部に異所性に Foxp1 を発現させた場合の分化について検討したところ、やはり、LMC 様に分化することが明らかとなった。これは、Foxp1 は、頸髄においても他のレベルと同じように、それを発現している運動神経を LMC 様に分化させる働きがあることを示唆している。

(4) Hoxc6 の異所性発現による頸部の細胞死の抑制

Foxp1 が直接細胞死の調節には関与しないことが明らかとなったことから、他の関与する分子の探索を開始した。細胞死が頸髄に限局することから、運動神経の吻尾軸における分化に関与することが知られている Hox 遺伝子群と細胞死の関係について調べることにした。Hox 遺伝子群の発現の範囲と細胞死の範囲を比較したところ Hoxc6 の発現と細胞死の分布が相補的であることが判明した。そこで、Hoxc6 を頸部で強制発現する実験を行った。その結果、Hoxc6 には細胞死を抑制する作用が認められた (図 4)。

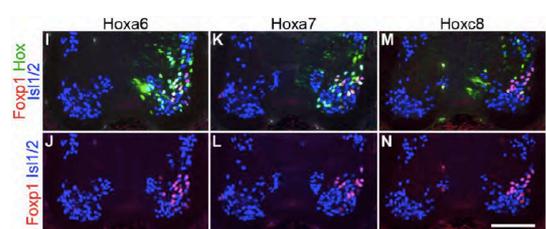
図 4 Hoxc6 の強制発現により、Foxp1 陽性細胞の細胞死は抑制された。



次に、Hoxc6 の機能を調べるため、Hoxc6 のノックダウンを頸髄から頸膨大 (上肢部) の境界付近で行った。Hoxc6 のみが細胞死を抑制する機能を持つのであれば、細胞死の領

域が頸膨大側に拡大するはずであるが、結果は、細胞死の領域の拡大は観察されなかった。これは Hoxc6 以外の重複して発現している Hox 分子にも細胞死を抑制する効果があるためと推察された。そこで、他の Hox 分子群の機能についても強制発現によって調べたところ、通常頸部で発現する Hox を過剰発現しても細胞死は抑制されないが、頸膨大以下で発現している Hox 分子群 (Hoxa6, Hoxa7, Hoxc8) は、強制発現によっていずれも細胞死抑制効果を示した (図 5)。

図 5 Hoxa6, Hoxa7, Hoxc8 はいずれも細胞死を抑制し、Foxp1 陽性細胞が生き残っている。



また、これらの分子の発現によって本来頸髄に発現している Hox 分子群の発現は影響されないことがわかった。以上の結果は、本来頸髄で発現している Hox 分子群は細胞死に対して許容的であるのに対して、頸膨大部以下に発現する Hox 分子群は細胞死に対して抑制的であることを示すものであり、さらに、その作用は頸髄に本来発現する Hox 分子群の発現を抑制することによって起こることではないことを示している。

以上の結果から以下のことが明らかとなった。

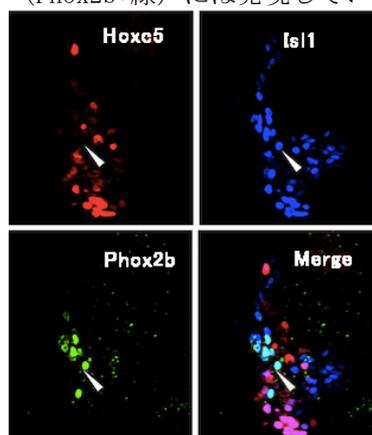
1. 発生早期の頸髄に特異的に起こる細胞死によって死ぬ細胞は Foxp1 陽性の細胞群であり、上肢を支配する外側運動神経細胞様に分化する細胞集団である。これは、鳥類の頸髄では、一過性に上肢を支配する運動神経群が現れるものの細胞死によって除去されていることを示唆する。
2. Foxp1 は運動神経細胞の外側運動神経細胞への分化に関与するが、細胞死そのものの調節に関わっていない。
3. Hoxc6 など頸髄には発現せず頸膨大以下に発現する Hox 分子群はこの細胞死に抑制的に働くが、Hoxc5 など本来頸髄に発現している Hox 分子群はこの細胞死に対して許容的に働く。

【2】背側運動神経核 (dMN) の発生の機序、

特に転写因子群の働きの解明。

dMN には Phox2b が発現しており、その発生分化に重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では、Phox2b 以外の分子の局在に着目して研究を行った。頸部の発現している Hox 分子群と Phox2b の共存について調べたところ、Hoxa5 は Phox2b 陽性の dMN に共存しているが、Hoxc5 は共存していないことが明らかになった (図 6)。

図 6 Hoxc5 (赤) は背側運動神経細胞 (Phox2b:緑) には発現していない。



運動神経の発生にマイクロ RNA の一つの miR9 が関与することが知られている。miR9 が dMN の発生に関与するか調べるために miR9 の強制発現を行い dMN の発生について観察した。その結果、dMN の背側への移動に異常があることが判明した。

背側運動神経核の発生については、今回の所見を端緒にして今後各分子の機能について検索を行う予定としている。

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 4 件)

1. Watanabe Y, Sakuma C, Yaginuma H. Dispersing movement of tangential neuronal migration in superficial layers of the developing chick optic tectum. *Dev Biol.* 2018 May 15;437(2):131-139. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.03.010. Epub 2018 Mar 14. PubMed PMID: 29548944. 査読有

2. Hashimoto M, Yamanaka A, Kato S,

- Tanifuji M, Kobayashi K, Yaginuma H. Anatomical Evidence for a Direct Projection from Purkinje Cells in the Mouse Cerebellar Vermis to Medial Parabrachial Nucleus. *Front Neural Circuits*. 2018 Feb 7;12:6. doi: 10.3389/fncir.2018.00006. eCollection 2018. PubMed PMID: 29467628;PubMed Central PMCID: PMC5808303. 査読有
3. Mukaigasa K, Sakuma C, Okada T, Homma S, Shimada T, Nishiyama K, Sato N, Yaginuma H. Motor neurons with limb-innervating character in the cervical spinal cord are sculpted by apoptosis based on the Hox code in chick embryo. *Development*. 2017 Dec 15;144(24):4645-4657. doi: 10.1242/dev.158873. Epub 2017 Oct 23. PubMed PMID: 29061638. 査読有
4. Watanabe Y, Yaginuma H. Tangential cell migration during layer formation of chick optic tectum. *Dev Growth Differ*. 2015 Oct;57(8):539-43. doi: 10.1111/dgd.12238. Epub 2015 Sep 30. Review. PubMed PMID: 26419493. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. Yaginuma H. Mechanisms of motoneuron death in the developing cervical spinal cord. XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 2018
2. 向笠勝貴, Hox code に基づく細胞死によって形成される脊髄運動神経の頸-上肢境界 第123回日本解剖学会全国学術集会 シンポジウム 2018年
3. 向笠 勝貴, ニワトリ胚頸髄運動神経で観察されるアポトーシスはHox発現パターンに依存して実行される。2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年
4. 本間 俊作, 脊髄神経の分岐パターンに残るlateral somitic frontierの痕跡。2017年度 生命科学系学会合同年次大会 2018年
5. Mukaigasa K. Foxp1-expressing motor neurons undergo apoptosis dependently on the Hox expression pattern in the cervical spinal cord of chick embryo. 50th Japanese Society of Developmental Biologists 2017
6. 向笠勝貴, ニワトリ胚頸髄特異的細胞死とHox転写因子群の関連。日本解剖学会第63回東北・北海道連合支部学術集会 2017年
7. 向笠勝貴, ニワトリ胚発生過程で起こる

- 頸髄限局性アポトーシスに対するHox遺伝子の関与 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年
8. 向笠勝貴, ニワトリ胚脊髄頭側において、四肢支配運動ニューロンの特徴を示す運動ニューロンはHox遺伝子の発現パターンに依存したアポトーシスを起こす。第39回日本分子生物学会年会 2016年
 9. 本間俊作, 透明化標本における深部観察のための単純な最適化法 第39回日本神経科学大会 2016年
 10. 八木沼洋行, 頸髄運動神経の発生から見た頸部の進化 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 (会頭企画シンポジウム) 2016年
 11. 向笠勝貴, 発生期ニワトリ胚の頸でアポトーシスを起こす細胞は上肢支配ニューロンの特徴を示す。第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
 福島県立医科大学研究成果情報
<https://www.fmu.ac.jp/univ/kenkyuseika/research/1710.html>
 研究者データベース
http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/317_ja.html?k=%E5%85%AB%E6%9C%A8%E6%B2%BC

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木沼 洋行 (YAGINUMA Hiroyuki)
 福島県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 90230193

(2) 研究分担者

本間 俊作 (HOMMA Shunsaku)
 福島県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号: 20261795

向笠 勝貴 (MUKAIGASA Katsuki)
 福島県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 60706349