

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21352

研究課題名(和文) マウス頬ひげ原基誘導と感覚神経回路網のパターン連携に関する研究

研究課題名(英文) Pattern formation between the induction of whiskers and sensory nerves of mice

研究代表者

石田 研太郎 (Ishida, Kentaro)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20707898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、胎仔期マウスの頬ひげの器官原基誘導と神経線維の侵入・接続を生体外培養系で再現する手法を開発し、感覚器官としての頬ひげが中枢神経と連携する仕組みの解析を目的とした。はじめに、免疫組織化学的手法により、頬ひげと神経の接続部の細胞集団を解析した。次に、マウス胎仔の頬皮膚と三叉神経節の器官培養法を開発した。そして、これらの共培養により頬ひげと三叉神経の接続を培養皿上で構築する手法を開発した。本研究で得られた知見や培養実験方法は、感覚器官としての頬ひげの成立と三叉神経との接続・連携の仕組みの解明に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to analyze the pattern formation between the induction of whisker follicles and somatosensory nerves through development of organ culture methods in order to observe the formation of a key structure, called Merkel cell-neurite complex, on a dish. I first analyzed the complex between whisker follicles and trigeminal nerves using immunohistochemical techniques. I initially developed two distinct culture methods of a whisker pad and a trigeminal ganglion explant, and then combined them. After the co-cultivation of the whisker row with a trigeminal ganglion explant, a Merkel cell-neurite complex composed of Merkel cells, trigeminal nerve fibers and Schwann cells was observed. My method for the formation of a Merkel cell-neurite complex in an organ culture will contribute to understanding the regulatory mechanisms of the coordination between trigeminal nerves and whisker follicles.

研究分野：発生生物学

キーワード：上皮・間葉相互作用 器官培養 頬ひげ原基 三叉神経節 器官形成 Merkel細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) げっ歯類の頬ひげは、外部環境を認識するための重要な感覚器官である。頬ひげに接続した感覚神経は、三叉神経節、脳幹、視床を経由して大脳皮質一次体性感覚野 (S1) の第4層に到達し、個々の頬ひげに対応して脳の領域がバレル (樽) 状に区画化されたバレル野を形成する。マウスの大脳S1の半分はバレル野に充てられており、体性感覚における頬ひげの重要性が反映されている。この神経回路網は、生後5日頃に成立するS1でのバレル型軸索分布パターンと、胎齢12日頃に開始する頬ひげの位置パターンが対応することから whisker-barrel pathway (頬ひげ-バレル回路) と呼ばれる。異所性頬ひげ移植によるバレルの増加、頬ひげ欠損による対応バレルの消失、隣接の頬ひげを結びつけることによるバレルの融合などの知見から、発生期において頬ひげ-神経のパターン形成の可塑性が極めて高いことが知られている。上記の現象は、外胚葉性皮膚付属器官のパターン形成と中枢神経系のパターン形成の密接な関連が示された稀有な事例であり、体表面で受容した外界刺激を中枢へ伝達し認識する高次機能の成立のメカニズムの解析に適しているとともに、異なる組織間のパターン形成の連携の意味を探るための優れたシステムだと考えられる。

(2) 頬ひげは、頬の上皮細胞と間葉細胞の相互作用によって誘導される頬ひげ原基から発生し、目側から鼻側に向かって一方向的かつ連続的に誘導される頬ひげ群が5列の並列パターンを形成する。頬ひげ原基の予定誘導領域の皮下には小規模の神経集網が形成されており、頬ひげの発生に伴って分岐伸長した神経細胞がそれぞれに接続すると考えられるが、その現象は直接観察されておらず分子機構も未解明である。頬ひげ-神経系の連携システムの解明には、中枢神経系形成からと頬ひげ原基形成からの双方向のアプローチが必要だと考えられるものの、出生後の、頬ひげの位置パターンが確定した後に構築される神経パターン形成解析が主流である。胎仔期マウスの頬ひげ原基誘導と神経形成の相互関係に関する研究報告が少ない原因は、子宮内で進行する頬ひげ原基誘導を生体から切り離して解析できる実験手法の開発が困難なためと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、胎仔期マウスの頬ひげの器官原基誘導と神経線維の侵入・接続を生体外培養系で再現する手法を開発し、感覚器官としての頬ひげが中枢神経と連携する仕組みの解析を目的とした。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するため、以下に記載する方法で研究を遂行した。

(1) 頬ひげ原基の誘導と三叉神経の接続に関する基本情報の収集

頬ひげが機械的刺激を感知するための要は、機械的刺激感知細胞であるメルケル細胞と、感覚神経である三叉神経からなる Merkel cell-neurite complex と呼ばれる構造である。胎性期の頬ひげ原基の発生過程でこの構造が形成される時期を特定するため、メルケル細胞と神経線維のマーカータンパク質を標的とした免疫染色を行なった。

(2) 頬ひげ原基誘導場としての頬の皮膚の器官培養方法の開発

母胎内で進行する頬ひげ原基誘導を生体から切り出し、生体外で解析できる実験手法を開発するため、頬ひげ原基の誘導が起こる時期である胎齢12日目のマウス胎仔から頬の皮膚を摘出し、器官培養を試みた。

(3) 感覚神経線維を供給する三叉神経節の器官培養方法の開発

器官培養で形成した頬ひげのメルケル細胞周辺には三叉神経やシュワン細胞が観察されなかったため、三叉神経節との器官共培養の必要性が考えられた。三叉神経節の培養条件を決めるため、各種神経栄養因子の受容体の発現を解析した。

(4) 頬ひげ原基と三叉神経の接続の器官培養での再構築

(2)と(3)で開発した頬皮膚と三叉神経節の器官培養を組み合わせることにより、Merkel cell-neurite complex を *in vitro* で形成可能かを検討した。

4. 研究成果

(1) 頬ひげ原基の誘導と三叉神経の接続に関する基本情報の収集

3(1)の実験の結果、胎齢16日の頬ひげ原基において、メルケル細胞と三叉神経の接触が観察された。興味深いことに、これらの細

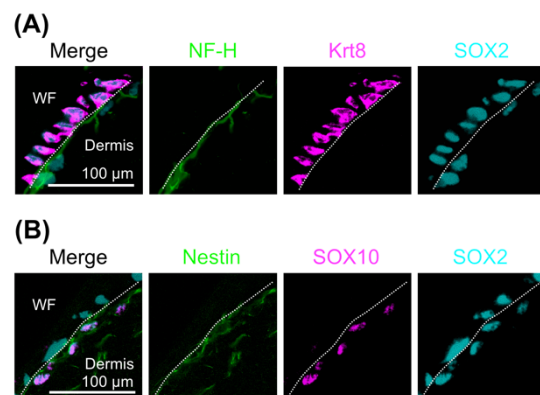


図1 胎齢16日マウスの頬ひげ原基のMerkel cell-neurite complexにおけるマーカー発現解析 (A) 頬ひげ原基 (WF) の上皮組織にcytokeratin 8 (Krt8)とSOX2陽性のメルケル細胞が観察され、隣接する真皮 (Dermis)にneurofilament-H (NF-H)陽性の三叉神経が観察された。(B) SOX2陽性のメルケル細胞の近傍の真皮にNestin、SOX10、SOX2陽性のシュワン前駆細胞が観察された。

胞の周囲にはシュワン前駆細胞の存在が観察された。以上の結果から、頬ひげ原基のMerkel cell-neurite complexは、メルケル細胞、三叉神経、シュワン前駆細胞の3者で構成されていることが示された(図1)。

(2) 頬ひげ原基誘導場としての頬の皮膚の器官培養方法の開発

3(2)の実験の結果、培養7日目までに、複数本の毛包形成が観察された。また、毛包形成の順番・長さの相対的な関係は正常発生と同様であることが明らかとなった(図2)。さらに、形成した毛包上皮にメルケル細胞集団の出現が観察された。一方、三叉神経線維とシュワン前駆細胞は観察されなかった。

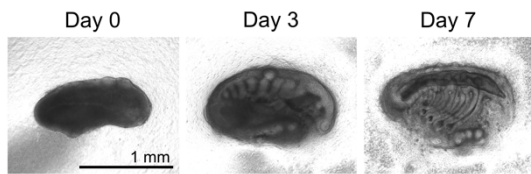


図2 胎齢12日マウスの頬の皮膚を外科的に摘出し、器官培養した。培養3日目までに頬ひげ原基の陥入が観察され、7日後には毛乳頭を含む頬ひげ毛胞の形態を形成した。

(3) 感覚神経線維を供給する三叉神経節の器官培養方法の開発

3(3)の解析の結果、Nerve Growth Factor (NGF)の受容体であるTrkAを発現している細胞が最も多いことが判明した(図3A)。そこで、NGF存在下で三叉神経節を器官培養したところ、TrkA発現細胞が生存し、放射状に神経線維を伸長することが明らかとなった(図3B)。

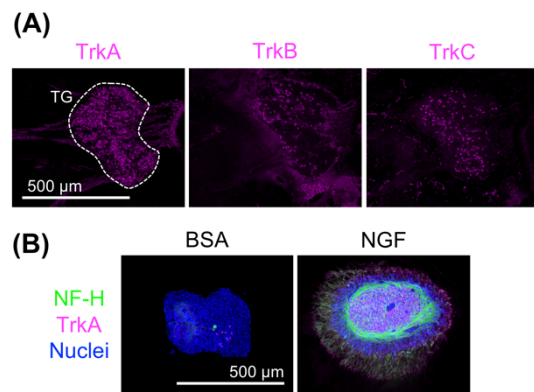


図3 三叉神経節の器官培養法の開発 (A) 胎齢12日マウスの三叉神経節の細胞体(TG)における各種神経栄養因子の受容体の発現を解析した。TrkB (BDNFとNT-4/5の受容体)やTrkC (NT-3受容体)と比較して、TrkA (NGF受容体)の発現細胞数が多いことが明らかとなった。(B) 摘出した三叉神経節をNGF存在下で器官培養したところ、TrkA発現細胞の生存とNF-H陽性の放射状神経線維の伸長が観察された。

(4) 頬ひげ原基と三叉神経の接続の器官培養での再構築

3(4)の方法で、頬皮膚と三叉神経節をNGF存在下で器官共培養したところ、頬ひげ原基

の形成と三叉神経線維の伸長が観察された(図4A)。形成した頬ひげ原基におけるメルケル細胞、神経線維、シュワン前駆細胞のマーカータンパク質の発現を解析した結果、正常発生(図1参照)と同様に、頬ひげ上皮のメルケル細胞、三叉神経線維、シュワン前駆細胞の3者で構成されるMerkel cell-neurite complex形成が観察された(図4B)。

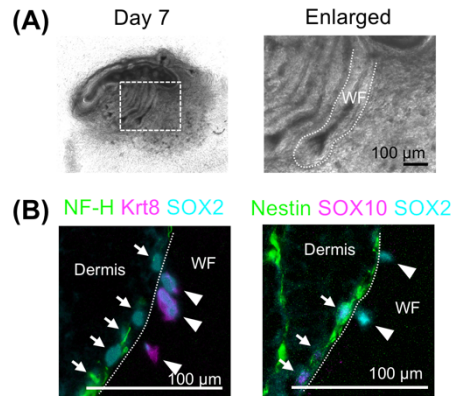


図4 *in vitro*でのMerkel cell-neurite complexの形成 (A) 胎齢12日の頬の皮膚と三叉神経節を器官共培養した。頬ひげ原基(WF)を形成し、周辺に三叉神経節由来の神経線維が観察された。(B) 器官共培養により形成した頬ひげ原基の周辺における神経線維マーカー、メルケル細胞マーカー、シュワン細胞マーカーの発現を解析した。頬ひげ原基のメルケル細胞(矢頭)の出現と、近接する真皮(Dermis)に神経線維とシュワン前駆細胞(矢印)が観察された。

以上の結果から、胎仔期マウスの頬ひげの器官原基誘導と神経線維の侵入・接続を生体外器官共培養系で再現する独自の手法を開発した。その過程で、感覚器官としての頬ひげが中枢神経と連携する仕組みの要であるMerkel cell-neurite complexが、胎齢16日の時点でメルケル細胞・三叉神経・シュワン前駆細胞の3者で構成されている(Merkel cell-neurite-Schwann cell complex)ことを明らかにした。また、器官培養方法の開発の過程で、頬ひげ原基におけるメルケル細胞の分化は三叉神経やシュワン細胞によらず自律的であることを示した。また、神経堤に由来するシュワン細胞のメルケル細胞付近への動員には、同じく神経堤由来である三叉神経が何らか形で関与していることが示唆された。本研究で得られた知見や培養実験方法は、感覚器官としての頬ひげの成立と三叉神経との接続・連携の仕組みの解明に貢献するものと期待される。

なお、以上の研究成果は「*In vitro* formation of the Merkel cell-neurite complex in embryonic mouse whiskers using organotypic co-cultures」として論文にまとめて、学術雑誌に投稿中である。

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 6 件)

- ① Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui
Role of the boundary in feather bud formation on one-dimensional bioengineered skin
APL Bioengineering 2, 016107, 2018 査読有 (DOI: 10.1063/1.4989414)
- ② Yuta Kato, Naoto Sakashita, Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui
Gate voltage controlled threading DNA into transistor nanopores
The Journal of Physical Chemistry B 122(2), 827-833, 2018 査読有 (DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b06932)
- ③ Ryoji Takagi, Junko Ishimaru, Ayaka Sugawara, Koh-ei Toyoshima, Kentaro Ishida, Miho Ogawa, Kei Sakakibara, Kyosuke Asakawa, Akitoshi Kashiwakura, Masamitsu Oshima, Ryohei Minamide, Akio Sato, Toshihiro Yoshitake, Akira Takeda, Hiroshi Egusa & Takashi Tsuji
Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an *in vivo* transplantation model
Science Advances 2(4), e1500887, 2016 査読有 (DOI: 10.1126/sciadv.1500887)
- ④ Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui
Generation of bioengineered feather buds on a reconstructed chick skin from dissociated epithelial and mesenchymal cells
Development, Growth & Differentiation 58(3), 303-314, 2016 査読有 (DOI: 10.1111/dgd.12275)
- ⑤ Naomi Yamamoto, Masamitsu Oshima, Chie Tanaka, Miho Ogawa, Kei Nakajima, Kentaro Ishida, Keiji Moriyama & Takashi Tsuji
Functional tooth restoration utilising split germs through re-regionalisation of the tooth-forming field
Scientific Reports 5, 18393, 2015 査読有 (DOI: 10.1038/srep18393)
- ⑥ Manabu Sugimoto, Yuta Kato, Kentaro Ishida, Changbae Hyun, Jiali Li & Toshiyuki Mitsui
DNA motion induced by electrokinetic flow near an Au coated nanopore surface as voltage controlled gate
Nanotechnology 26(6), 065502, 2015 査読有 (DOI: 10.1088/0957-4484/26/6/065502)

[学会発表] (計 38 件)

- ① Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui, Feather bud formation on limited domain of reconstituted artificial skin, 18th International Congress of Developmental Biology, University Cultural Centre, National University of Singapore, 18th - 22nd June 2017
- ② Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui, Feather bud formation on limited domain of reassembled artificial skin, 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tower Hall Funabori, Tokyo, 10 May 2017
- ③ Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui, Wnt/ β -catenin signaling involved in the induction and spacing of feather buds, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド, 2015 年 12 月 1 日
- ④ Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui, Wnt/ β -catenin and FGF/ERK signaling are involved in the feather bud formation and patterning of reconstructed skin, 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学, 石川, 2015 年 9 月 15 日
- ⑤ Kentaro Ishida & Toshiyuki Mitsui, A feedback loop involving Wnt/ β -catenin, FGF/ERK and SOSTDC1 modulates the self-patterning of bioengineered feather buds in a developmental timing-dependent manner, 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, 3 June 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 研太郎 (ISHIDA, Kentaro)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20707898

(2) 研究協力者

三井 敏之 (MITSUI, Toshiyuki)
青山学院大学・理工学部・教授
研究者番号：40406814