

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790156

研究課題名 (和文) 脊髄神経節における感覚神経細胞の多様化のしくみ

研究課題名 (英文) Developmental and evolutionary mechanisms of the primary sensory neurons

研究代表者

矢嶋 浩 (YAJIMA HIROSHI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10433583

研究成果の概要：脊椎動物体幹部の感覚を司る脊髄神経節の発生プログラムにおいて、複数の局面で *Six* 遺伝子が重要な役割を担っていることを明らかにした。特に、感覚神経細胞の発生過程において、*Six* 遺伝子を発現できるようになったことが感覚神経の進化・多様化の鍵になっている可能性を示すことが出来た。また、感覚神経細胞の分化機構と脊髄神経節の節という形態の形成・維持機構が互いに密接に関与しあい不可分である可能性も示すことが出来た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：脊髄神経節、知覚神経、神経堤細胞、*Six* 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

脊髄神経節は神経堤細胞由来であり、頭尾軸に沿った繰り返し構造として観察され一見単純である。しかしその中に存在する神経細胞は、担う体性感覚・神経繊維の種類・投射する領域が実に多様であり、唯一つとして同じものが存在するようには見えない。このような脊髄神経節を司る発生プログラムの解明は、生物学的にも基礎医学的にも非常に意義があるものであると考えられる。医学的な要請から、体性感覚の神経回路や受容・伝達のメカニズムが古くから研究の対象となり、特に痛みに関しては神経ブロックなど有効な治療法が開発されてきた。しかし、それら

の研究に比べて、細胞分化、特に神経細胞の多様化機構の解明は非常に後れていた。その原因としては、脊髄神経節において神経細胞の多様化・特異化に異常をきたしたモデル動物が少なかったことが考えられた。また、このような複雑な感覚システムを生物が進化の過程でどの様に獲得し得たのかは鰭・四肢など作動体の獲得と非常に密接に関連すると思われ、生物種間での比較とそれによってもたらされる進化的な考察は非常に興味深いと考えられた。

2. 研究の目的

当研究室で作製された *Six1/Six4* 二重欠損

マウスでは脊髄神経節の形態や構成する細胞種などに異常が認められる。そこでその表現型を詳しく解析することで、脊髄神経節形成の発生機構、脊髄神経細胞の多様化機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Six1/Six4* 二重欠損マウスにおける脊髄神経節の異常の同定

脊髄神経節細胞（神経細胞、グリア細胞など）のマーカータンパク質や細胞集団特異的（proprioceptive, cutaneous など）マーカータンパク質に対する抗体や、投射先を明らかにするためのトレーサーを用いた組織学的方法で、*Six1/Six4* 二重欠損マウスの脊髄神経節の異常を細胞レベルで時間的空間的に明らかにする。これによって、脊髄神経節の発生において、*Six* 遺伝子がどの細胞種の分化にどの様に関与しているのかを明らかにすることが出来る。

(2) 野生型マウスと *Six1/Six4* 二重欠損マウスの脊髄神経節における遺伝子発現プロファイルの比較

DNA マイクロアレイによって、野生型と *Six1/Six4* 二重欠損マウスの同じ体節レベルの脊髄神経節間で発現の異なる遺伝子をプロファイル、実際の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションや免疫組織染色で明らかにする。これによって、*Six* 遺伝子に依存し、*Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいて脊髄神経節の異常に関与する遺伝子を同定する。DNA マイクロアレイを用いることで、既存のマーカーの使用では発見することが出来なかった脊髄神経節の異常も明らかにすることが出来る。

(3) *Six1/Six4* 二重欠損マウスの表現型回復実験

Six 遺伝子は神経堤細胞のみならず間充織や筋肉にも発現が認められる。*Six1/Six4* 二重欠損マウスの脊髄神経節で観察された表現型の原因が、神経堤細胞そのものに発現している *Six* 遺伝子の欠損によるものなのか否かを明らかにするため、神経堤細胞特異的に *cre* を発現する *P0-cre* マウス (Yamauchi *et al.*, 1999) と *CAG-lox-stop-lox-Six1* 導入マウス（当研究室で作製済）を用い、*Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいて神経堤細胞特異的に *Six1* を強制発現させ表現型の回復の有無、程度を観察する。

4. 研究成果

(1) *Six1/Six4* 二重欠損マウスにおける脊髄神経節の異常

Six1/Six4 二重欠損マウス脊髄神経節の組織学的な解析から、以下の様な異常が観察できた。これらの表現型は脊髄神経節の発生プログラムにおいて、複数の局面で *Six* 遺伝子が重要な役割を担っていることを示唆するものである。特に、感覚神経細胞の分化・投射のメカニズムと「神経節構造」を形成・維持するメカニズムが互いに密接に関与しあい、不可分である可能性があることは大変興味深いと考えている。

①脊髄神経節を構成する細胞種の異常

発生中の脊髄神経節においては、神経細胞に分化する前駆細胞は *Isl1/2* を発現し、また、グリア細胞に分化する前駆細胞は *Sox10* を発現している。これら2種類の前駆細胞は特徴的な局在をしており、*Sox10* 陽性細胞が *Isl1/2* 陽性細胞を取り囲む様に分布している（図1、*Six1/4^{+/GFP}*）。しかしこの *Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいては、*Isl1/2*、*Sox10* 陽性細胞の局在が変化し、混じり合い背腹軸に沿って分散して分布する傾向にあった（図1、*Six1/4^{GFP/GFP}*）。また、野生型には存在しない *Isl1/2*、*Sox10* 両陽性の細胞が認められた。

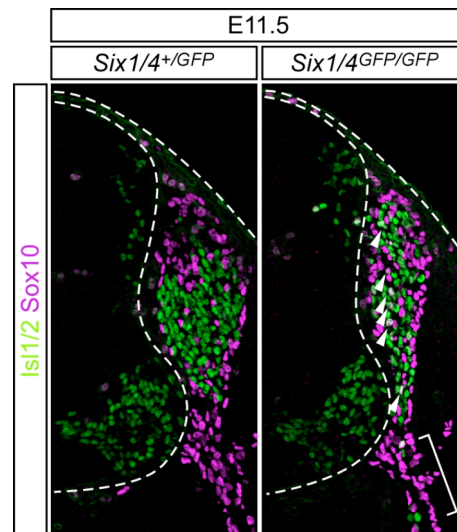


図 1

②祖先型一次知覚神経細胞の出現

ヒトを含めた羊膜類の体幹部で一次知覚を担う神経細胞の細胞体は、神経管の外にある脊髄神経節に納められている。しかし、より原始的な体制とされる無羊膜類の魚類や両生類では、体幹部の一次知覚神経が神経管の中にも存在する。それらの細胞は Rohon-Beard 細胞（以下 RB 細胞）と呼ばれ、神経堤細胞と同じく、神経外胚葉と非神経外胚葉の境界が由来であるとされている。さらに原始的な、神経堤細胞を持たない頭索類ナメジウオの一次知覚神経が RB 細胞と同様の形態を持つことから、その出現は神経堤細胞

胞の獲得以前にさかのぼるとされている。一次知覚の起源型と考えられるこのRB細胞は羊膜類には認められないことから、知覚神経の進化・多様化の過程で「失われた発生プログラム」であると考えられてきた。しかしながら驚くべきことに、*Six1/Six4* 二重欠損マウスでは知覚神経様細胞が神経管の中に存在した(図2、*Six1/4^{GFP/GFP}*)。その細胞は魚類ゼブラフィッシュ・両生類アフリカツメガエルのRB細胞で発現が認められる *Isl1/2*、*TrkC*、*Tlx3*、*Kvl.1* などのマーカーを発現していた。さらに、RB細胞の特徴である神経管外への軸索伸長や細胞死による消失も観察されたことから、この細胞がRB細胞に極めて近い存在であることが示唆された。また、アフリカツメガエルRB細胞では *Six1* の発現が認められなかった。これらの結果は、無羊膜類から羊膜類への進化の過程において、RB細胞の発生プログラムは失われてしまったのではなく、*Six* 遺伝子の機能によって「隠されている」可能性を示すものである。

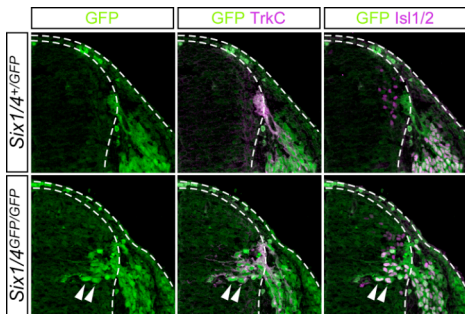


図2

③ 投射の異常

本来各脊髄神経節から感覚受容領域への投射は頭尾軸に沿って秩序立てて行われている。腰部脊髄神経節から後肢への投射を *DiI* を用いて観察したところ、*Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいては複数の感覚受容領域への投射が確認された。

④ 脊髄神経節の形態異常

Six1/Six4 二重欠損マウス腰部脊髄神経節においては、発生初期の神経堤細胞の移動経路などに顕著な変化は見られないものの、発生後期では脊髄神経節の癒合が観察された(図3、*Six1/4^{GFP/GFP}*)。

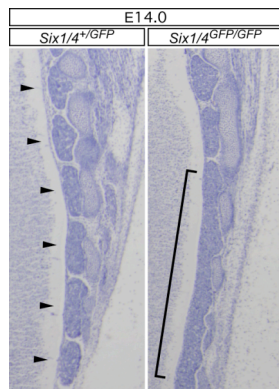


図3

(2) *Six1/Six4* 二重欠損マウス脊髄神経節における遺伝子発現プロファイル

E11.5にて野生型と *Six1/Six4* 二重欠損マウスの脊髄神経節をレーザーマイクロディセクションにより単離し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、有意に発現が異なる複数の遺伝子を捉えることが出来た。現在、*in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色でこれら遺伝子の発現の確認を行っている。今後はこれらの遺伝子がどのように表現型に関与するのかを、ニワトリ胚でエレクトロポレーション法を用いて過剰発現やノックダウン等の発現操作を行い、表現型を再現できるかどうかを検討する。

(3) *cre-lox* システムを用いた *Six1* 強制発現による表現型の回復

神経堤細胞特異的な発現が報告されている *P0-cre* マウスと *CAG-lox-stop-lox-Six1* 導入マウスを用い、*Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいて神経堤細胞特異的に *Six1* を強制発現させた(図4)。その結果、前述した多くの表現型が回復したことから、神経堤細胞自身に発現している *Six* 遺伝子が脊髄神経節の発生プログラムにおいて重要な役割を果たしていると考えられた。

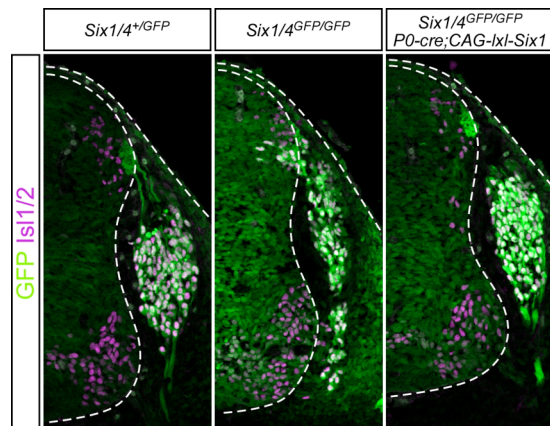


図4

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 Ishihara T., Sato S., Ikeda K., Yajima H. and Kawakami K. Multiple evolutionarily conserved enhancers control expression of *Eya1* *Developmental Dynamics* 237(11): 3142-3156, 2008 査読有

② Ishihara T., Ikeda K., Sato S., Yajima

H. and Kawakami K.
Differential expression of Eya1 and Eya2
during chick early embryonic development.
Gene Expression Patterns 8(5): 357-367,
2008 査読有

③ Barnes N., Shi J., Yajima H.,
Thinakaran G. and Parent A.
Steady-state increase of CREB, Rac and PAK
signaling in Presenilin-deficient
Neurons.
Journal of Neurochemistry 104(6):
1637-1648, 2008 査読有

④ Peng C., Yajima H., Burns C., Zon L.,
Sisodia S., Pfaff S. and Sharma K.
Notch and MAML signaling drives
Sc1-dependent interneuron diversity in
the spinal cord.
Neuron 53(6): 813-827, 2007 査読有

[学会発表] (計4件)

① Hiroshi Yajima, Keiko Ikeda, Shigeru
Sato and Kiyoshi Kawakami
Hidden developmental program of
Rohon-Beard cells in mice
第41回日本発生生物学会, 2008年5月28日,
徳島県郷土文化会館

② Keiko Ikeda, Hiroshi Yajima, Makoto
Yamakado, Kiyoshi Kawakami
Role of Six1 and Six4 in cranial
gangliogenesis
第41回日本発生生物学会, 2008年5月28日,
徳島県郷土文化会館

③ Expression patterns of Eya1 and Eya2 in
chick early development
Tadashi Ishihara, Keiko Ikeda, Shigeru
Sato, Hiroshi Yajima, Kiyoshi Kawakami
第41回日本発生生物学会, 2008年5月28日,
徳島県郷土文化会館

④ Hiroshi Yajima, Shigeru Sato, Keiko
Ikeda, Kaori Miyamoto, Satoru Masuda,
Norio Motohashi, Erika Yada, Yuko Suzuki,
Shin'ichi Takeda, Kiyoshi Kawakami
Roles of Six genes in the proliferation and
differentiation of muscle satellite cells
第40回日本発生生物学会・日本細胞生物学会
合同大会, 2007年5月30日, 福岡国際会
議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢嶋 浩 (YAJIMA HIROSHI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10433583

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし