

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07267

研究課題名(和文) 交感神経に随伴するシュワン前駆細胞の他種細胞分化の検証とその分子基盤

研究課題名(英文) Analysis of multipotency and its underlying molecular mechanisms of sympathetic nerve-associated Schwann cell precursors

研究代表者

伊藤 圭祐 (Ito, Keisuke)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：10575468

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)：シュワン細胞の前駆細胞(Schwann cell precursor; SCP)は、発生期にシュワン細胞だけでなく自律神経細胞を含めた様々な細胞種に分化することが示されている。しかしその全身における分布や分子基盤は明らかになっていない。本研究で我々は四肢に投射する神経や横隔神経で、交感神経節細胞から派生したSCPが自律神経様細胞になる事を発見した。また一遺伝子の遺伝子量減少により、これら自律神経様細胞が劇的に増加する事も発見した。神経芽腫誘導変異下においては、更なる細胞増加が認められ、SCP由来神経新生が遺伝子量の変化や腫瘍誘導変異に高い感受性を示す事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長い解剖学・組織学の歴史において、四肢動物の肢芽に自律神経の細胞体が存在する事を記載した例はない。本研究はその歴史を塗り替え、肢芽内に自律神経様の細胞体が確かに存在し、これらが交感神経節から派生したSCPを起源とするという、全く新しい知見を創出した。また一遺伝子量の減少という普遍的現象が、肢芽内自律神経様細胞を劇的に増加させることも発見した。神経芽腫モデルマウスにおいては更なる増加を認め、SCP由来神経新生が遺伝子量の変化や腫瘍誘導変異と密接に関連することを証明した。この肢芽内自律神経様細胞が異常産生される仕組みを解明することで、神経芽腫新規治療法の確立に波及することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：During development, Schwann cell precursors (SCPs) can differentiate into not only Schwann cells but also multiple cell types including autonomic neurons. However, overall distribution of SCP-derived neurogenesis and its underlying molecular mechanism remains unclear. In this study, we found that sympathetic ganglia-derived SCPs differentiate into autonomic neuron-like cells along various nerves projecting to the limb buds and diaphragm. We also found that a reduction of one gene dose can cause a dramatic enhancement of SCP-derived neurogenesis. These SCP-derived neurons were further enhanced by a neuroblastoma driver mutation, indicating that SCP-derived neurogenesis is highly sensitive to an alteration in a gene dose and an oncogenic driver mutation

研究分野：神経発生学

キーワード：シュワン前駆細胞 自律神経系 Phox2B 神経芽腫 交感神経系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞は正常発生や傷害時の修復など、生体組織の恒常性維持に必須の役割を持つ。近年、末梢神経系に随伴して全身に分布するシュワン細胞の前駆細胞 (Schwann cell precursor; SCP) が、発生期に色素細胞や間葉細胞、自律神経細胞など、様々な細胞種に分化して組織構築に寄与する幹細胞性を内包していることが証明されている。我々は研究開始当初、培養系において交感神経軸索に特異的に付随して、幹細胞性および自律神経分化能を内包する SCP の集団を発見した(図1)。そして生体内において、これらが枝芽に存在する未知の自律神経様細胞群を形成している可能性を発見した(図2)。しかしこれら細胞の発生様式は当初不明で、また交感神経随伴 SCP に由来する他の組織構築への関与や、SCP から他種細胞への分化を支える分子基盤についても未解明であった。さらに SCP からの多細胞種分化が疾患病理にどのように関与するのかについても不明であった。

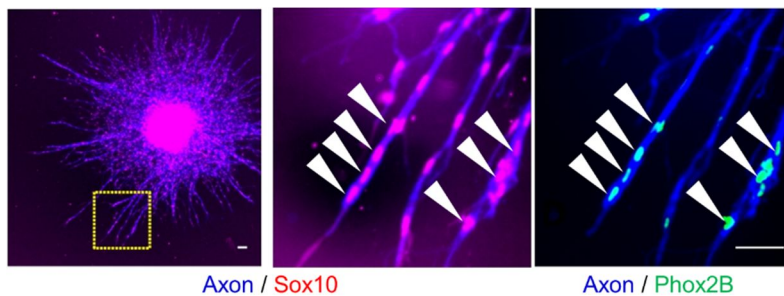


図1 培養交感神経節において、交感神経軸索に付随する SCP (Sox10 陽性・矢頭) は自律神経細胞分化の指標である Phox2B を発現した。

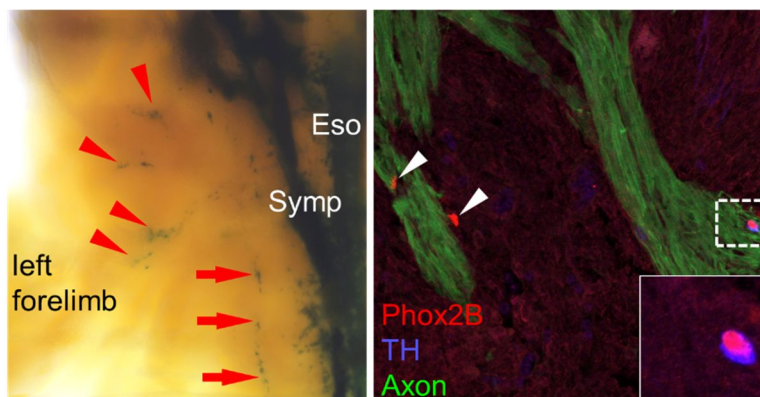


図2 (左) 胎生 12.5 日の Phox2b-LacZ マウス胚。前肢および横隔神経に多くの Phox2b 陽性細胞が認められた。(右) 胎生 12.5 日の野生型胚。Phox2B 陽性細胞は前肢の神経軸索に付随し、一部は交感神経節ニューロンのマーカーである TH を発現していた(右下拡大図)。Eso: 食道、Symp: 交感神経節

2. 研究の目的

本研究は我々が独自に発見した交感神経随伴 SCP に着目し、遺伝学的標識法及び免疫組織化学法により、これら細胞が枝芽内の自律神経様細胞に分化するのかどうかを解析した。さらに交感神経随伴 SCP が他の組織構築にも貢献するのか、また他の細胞種にも分化できるのかなど、その基礎的な特性の解析を試みた。さらに交感神経随伴 SCP の分化を制御する分子基盤の解明を目指し、様々な遺伝子変異を誘導させた際の枝芽内自律神経様細胞の表現型を解析した。また疾患病理と交感神経随伴 SCP からの他細胞種分化の関与についても解析を行った。

3. 研究の方法

(1) Phox2b-Cre; Rcl-tdTomato マウスによる遺伝学的標識

自律神経細胞の分化・生存維持に必須の転写因子である Phox2B は、これまでの研究で自律神経分化能を示す SCP で発現する事が知られている。また交感神経節の発生において、交感神経節由来のグリア系譜細胞は、Phox2B を発現する前駆細胞から派生する事が知られている。そこでゲノム編集により Phox2b-Cre ノックインマウスを作成し、Rcl-tdTomato (Rosa-lox-stop-lox-tdTomato) マウスと掛け合わせ、胎児期における tdTomato 陽性細胞の体内分布を解析する事により、交感神経随伴 SCP が枝芽や他の部位に存在するかどうかを確認した。

(2) Plp::CreERT; Rcl-tdTomato マウスによる遺伝学的標識

グリア細胞系譜に特異的な Cre ドライバーである Plp::CreERT マウスを使用し、(1)と同様に Rcl-tdTomato マウスと掛け合わせ、タモキシフェンを胎生 11.5 日目に投与した。交感神経節におけるグリア細胞は胎生 11 日目には全て前駆細胞からの分化を終えているため、胎生 11.5 日目のタモキシフェン投与により、交感神経節においてグリアに分化した細胞を特異的に標識する事が可能になる。24 時間後の tdTomato 陽性細胞の分布と、それら細胞が Phox2B を発現するのかどうかを解析した。二重陽性細胞は SCP 由来の神経新生が起きている指標となる。

(3) SCP 由来神経細胞の形成に影響を与える遺伝的要因の探索

Phox2b-LacZ マウスにゲノム編集による遺伝子変異挿入、または各種遺伝子破壊マウスを掛け合わせる事により、体内の各所に分布する Phox2b 陽性細胞のパターンに、乱れが生じるかどうかを探索した。異常を示すマウスに関しては詳細な表現型解析を行った。

(4) 神経芽腫モデルマウスにおける SCP 由来神経細胞の表現型解析

Phox2b-LacZ マウスを神経芽腫モデルマウスと掛け合わせ、Phox2b 陽性細胞のパターンに異常が生じるかどうかを解析した。

4. 研究成果

(1) Phox2b-Cre; Rcl-tdTomato マウスによる遺伝学的標識

胎生 12.5 日目胚を tdTomato 抗体および軸索マーカーでホルマウント染色したところ、肢芽内において多数の tdTomato 陽性細胞を認め、これらは全て肢芽を支配する神経線維に付随する事が分かった(図3左)。この事から、確かに交感神経随伴 SCP が、軸索に付随しながら肢芽内へ移動する事を発見した。また体内の様々な領域に tdTomato 陽性細胞が分布し、全て神経線維に付随する事も発見した。

胎生 12.5 日目胚の凍結切片で Phox2B 抗体および SCP マーカーの Sox10 抗体で二重染色を行ったところ、多くの tdTomato 陽性細胞は Sox10 陽性の SCP に分化していたが、一部の tdTomato 陽性細胞は Phox2B のみ発現しており、神経細胞へ分化していることが分かった(図3右)。この事から、肢芽内の自律神経様細胞が交感神経随伴 SCP に由来する可能性が示唆された。

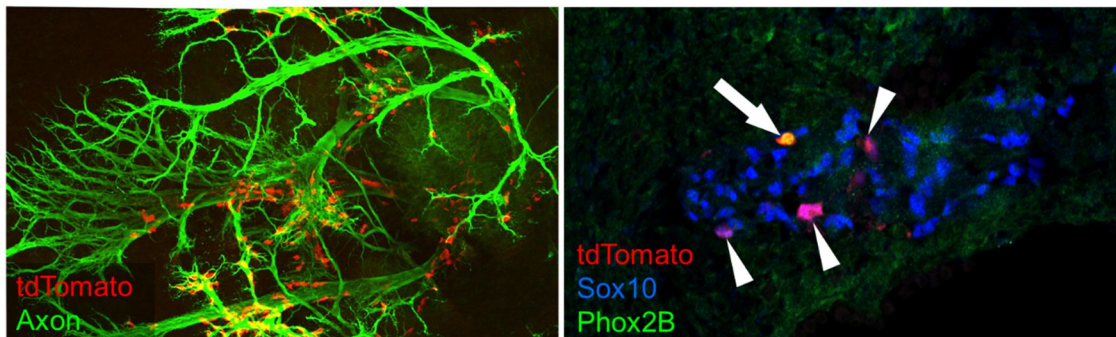


図3 (左) 胎生 12.5 日の Phox2b-Cre; Rcl-tdTomato マウス胚前肢を、tdTomato 抗体でホルマウント染色した。全ての tdTomato 陽性細胞が軸索に付随している。(右) 胎生 11.5 日の Phox2b-Cre; Rcl-tdTomato マウス胚前肢切片。多くの tdTomato 陽性細胞は Sox10 陽性の SCP に分化するが(矢頭)、一部の tdTomato 陽性細胞は Phox2B を発現した(矢印)。

(2) Plp::CreERT; Rcl-tdTomato マウスによる遺伝学的標識

胎生 11.5 日目までタモキシフェンを投与し、交感神経節由来のグリア系譜細胞を標識した。まず交感神経節内を観察したところ、外套細胞が tdTomato で標識される一方、神経細胞は tdTomato で標識されなかったため(図4左)、前駆細胞からグリア系譜と神経系譜への振り分けが神経節内で完全に終わっていることが確認された。この条件において肢芽を観察すると、Phox2B 陽性細胞が tdTomato で標識されることを発見した(図4右)。このため、肢芽内の自律神経様細胞は交感神経随伴 SCP に由来することが証明された。

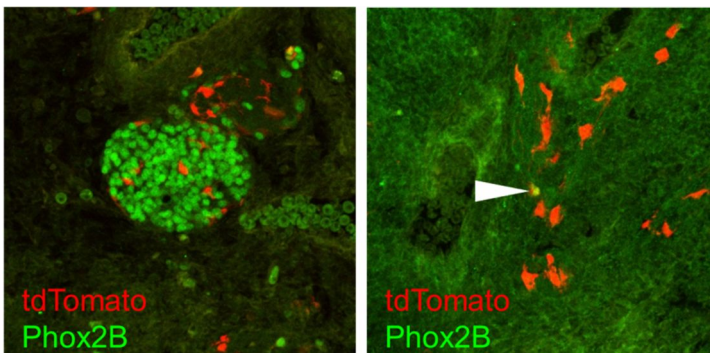


図4 Plp::CreERT; Rcl-tdTomato マウスによる遺伝学的標識。胎生 11.5 日目にタモキシフェンを投与し、12.5 日目に解析した。(左) 交感神経節内では、tdTomato は外套細胞にのみ発現し、Phox2B 陽性細胞にはほとんど発現しなかった。(右) 前肢内においてはいくつかの Phox2B 陽性細胞が tdTomato を発現していた(矢頭)。

(3) SCP 由来神経細胞の形成に影響を与える遺伝的要因の探索

交感神経節前駆細胞からのグリア系譜・神経系譜への振り分けの過程に破綻を加えることで、異所的な SCP 由来神経新生が増加する事が考えられる。そこで Notch シグナルによる神経形成の側方抑制システムに着目し、Notch の下流で働く Rbpj を機能破壊するため、Rbpj-flox マウスを導入し、Plp::CreERT マウスと掛け合わせて SCP における Notch シグナルの破壊を試みた。

しかし肢芽内神経様細胞の表現型に変化はなかった。

さらに Phox2b の mRNA には miR204 が結合し、Phox2B の発現を減少させることが知られるため、この発現部位をゲノム編集により欠損させ、Phox2B の発現制御ができない変異も挿入したが、肢芽内神経様細胞の数は変わらなかった。

そこで Phox2B と拮抗的に作用すると予測される遺伝子（論文発表前のため、"GeneX" とする）のヘテロ接合体を調べたところ、驚くことに極めて多くの肢芽内神経様細胞が誘導されることを発見した（図5 矢頭）。これに加え、横隔神経に付随する神経様細胞の数も劇的に増加した（図5 矢印）。Plp::CreERT マウスと GeneX ヘテロマウスを掛け合わせたところ、SCP 由来神経新生の数は野生型マウスに比較して増加することも明らかになった。このため GeneX の遺伝子量の半減というわずかな変化が、SCP の運命を劇的に変化させることが判明した。

GeneX の遺伝子量半減により、SCP 内の分子基盤にどのような変化が生じたのかを調べるため、Plp::CreERT; Rcl-tdTomato に GeneX ヘテロマウスを掛け合わせ、肢芽内全 SCP を FACS で単離し、これを 10X chromium Controller でシングルセル化して cDNA ライブラリーを作成した。現在次世代シーケンサーによる解析を進めている。

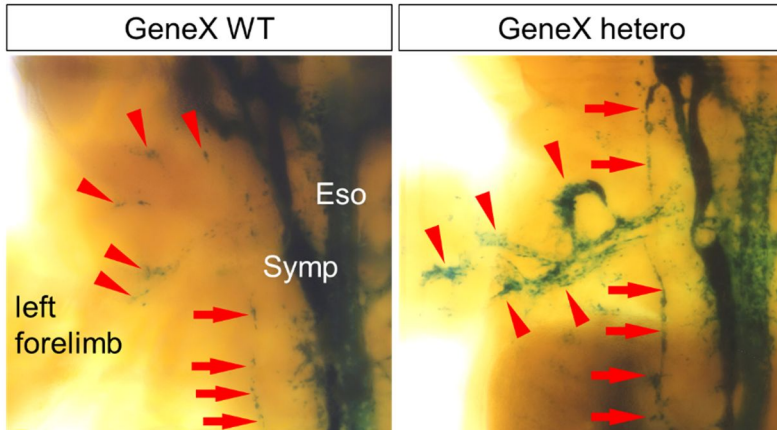


図 5 GeneX ヘテロマウスを Phox2b-LacZ マウスと掛け合わせたところ、肢芽内の Phox2b 陽性細胞や（矢頭）横隔神経に付随する Phox2b 陽性細胞が劇的に増加した（矢印）。

(4) 神経芽腫モデルマウスにおける SCP 由来神経細胞の表現型解析

神経芽腫は副腎交感神経堤細胞を発生起源とすることが示唆されており、近年 SCP もその発症に寄与することが知られている。そこで GeneX ヘテロマウスに神経芽腫モデルマウスを掛け合わせたところ、肢芽内神経様細胞の数がさらに劇的に増加する事を発見した（図6）。EdU 取り込み実験により、これら神経様細胞の増殖能が増加する事も発見し、神経芽腫関連変異が、SCP の運命決定に影響を与えることが示唆された。このため肢芽内自律神経様細胞の発生メカニズムは、神経芽腫発症と密接な関連を持つことが本研究で明らかとなり、その分子基盤の解明は新たな神経芽腫治療戦略に貢献することが期待される。今後このマウス系統についてもシングルセル RNA シーケンスを進め、肢芽内自律神経様細胞形成メカニズムの解明を進める。

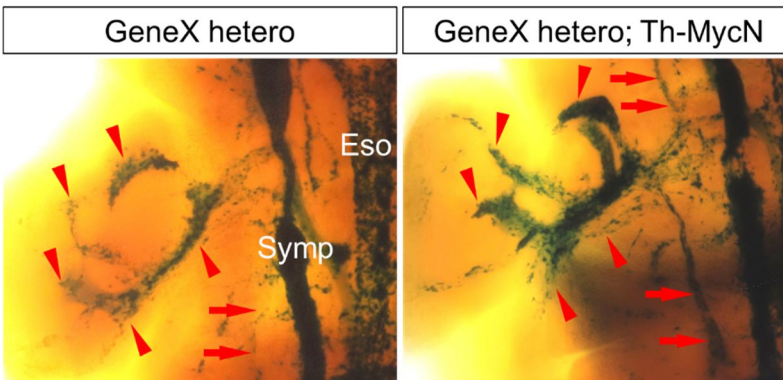


図 6 GeneX ヘテロマウスを Phox2b-LacZ マウスおよび神経芽腫モデルマウスである Th-MycN マウスと掛け合わせたところ、GeneX ヘテロマウス単独と比較して、肢芽内の Phox2b 陽性細胞や（矢頭）横隔神経に付随する Phox2b 陽性細胞がさらに増加した（矢印）。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamoto Mitsumasa, Uesaka Toshihiro, Ito Keisuke, Enomoto Hideki	4. 巻 8
2. 論文標題 Increased RET Activity Coupled with a Reduction in the <i>RET</i> Gene Dosage Causes Intestinal Aganglionosis in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0534 ~ 20. 2021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0534-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sunardi Mukhamad, Ito Keisuke, Enomoto Hideki	4. 巻 63
2. 論文標題 Live visualization of a functional RET EGFP chimeric receptor in homozygous knock in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 285 ~ 294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12740	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keisuke Ito
2. 発表標題 Differentiation plasticity of Schwann cell precursors causes ectopic neurogenesis and tumor pathogenesis
3. 学会等名 CREST多細胞領域 第12回Rising Star Webinar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideki Enomoto, Keisuke Ito, Toshihiro Uesaka
2. 発表標題 FUNCTION OF SCHWANN CELL PRECURSORS AS THE AUTONOMIC NEURAL STEM CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------