

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570215

研究課題名（和文） プラコード分化制御の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Molecular basis for the regulation of placode differentiation

研究代表者

若松 義雄（WAKAMATSU YOSHIO）

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60311560

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物の頭部感覚器の原基であるプラコードの個性決定をつかさどる分子メカニズムについて研究をおこなった。その結果、培養実験系を用いて FGF や BMP シグナルの関与について示したのに加え、鳥類胚において Pax3 遺伝子と Pax6 遺伝子の相互発現抑制機構が三叉神経節プラコードの正常な発生に必要な事であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Molecular mechanisms of placode fate determination in vertebrates were studied. The involvement of FGF and BMP signalings were shown in cultured tissues. Furthermore, the requirement of mutual repression between Pax3 and Pax6 genes in trigeminal placode development were also revealed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成、感覚器、神経、細胞分化、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の主要な感覚器官は、発生過程において前プラコード領域と呼ばれる外胚葉性組織に由来するプラコードから形成される。例えば、鼻の臭覚受容組織である嗅上皮や目の水晶体、内耳が各感覚器組織に対応したプラコードから作られる。また、これらの

感覚器官から得られた情報を伝達する頭部感覚神経節ニューロンの多くがプラコードに由来する。したがって、プラコードの形成や分化は脊椎動物の頭部発生について極めて重要であると考えられる。しかし、これらの各プラコードが固有の性質を獲得するための分化制御メカニズムや、各プラコードの形成位置を決定する分子メカニズムについて

ては、わかっていないことが多い状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、それぞれのプラコードの個性がどのようにして決定されるのか、また、頭部におけるプラコードの形成位置の制御について、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのために鳥類胚とそれに由来する培養組織断片を用いた実験を計画した。

3. 研究の方法

(1) 鳥類胚より取り出した神経板を繊維芽細胞増殖因子 (FGF2) 存在下で培養し、プラコード様の組織に分化させた。さらに、骨形成因子 (BMP4) やソニックヘッジホッグタンパク質、血小板由来増殖因子 (PDGF-D) などの様々な因子を培養液に添加することにより、異なる培養条件下でどのようなプラコードに分化するかを、各プラコードに対応して発現する特異的分化マーカーを用いて調べた。また、長期間の培養によりニューロンが分化してくるかどうかにについても解析をおこなった。

(2) 鳥類胚で各プラコード特異的分化マーカーの発現を調べた。その結果、鼻や耳プラコードで発現することが知られていた Pax6 遺伝子が予定三叉神経節領域の細胞で一過的に発現していることがわかった。また、発生が進むにつれて Pax6 遺伝子の発現が低下し、それと同時に Pax3 遺伝子が発現開始して Pax6 遺伝子の発現と置き換わるように広がって行くことがわかった。この観察結果から Pax3 遺伝子と Pax6 遺伝子が三叉神経節の形成に関与している可能性が考えられた。そこで、それらの遺伝子の活性を変化させた場合の三叉神経節の発生について解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 図 1 に示すように、培養神経板を FGF2 単独で培養した場合には、Pax2 遺伝子などを発現する後方のプラコードへの形質転換が認められた。また、FGF2 と BMP4 を両方加えた場合には、Pax6 遺伝子を発現するより前方のプラコードへの形質転換が認められた。またこの条件での長期培養によって、ニューロンの分化が認められた。しかし、それ以上にさまざまな因子を加えても Pax6 遺伝子から Pax3 遺伝子への発現の転換が再現性良くおこらず、培養下で完全な三叉神経節プラコードを作ることはできなかったと考えられた。

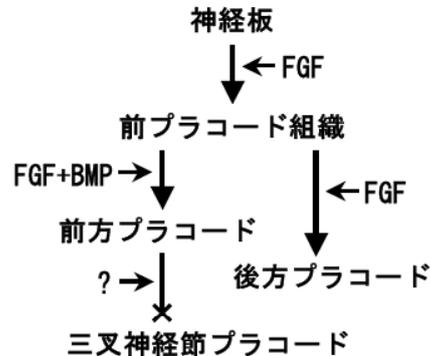


図 1 : 培養神経板からのプラコード組織の分化

(2) ニワトリ胚の抗体染色によって、三叉神経節プラコードの形成過程において、Pax6 遺伝子の発現が徐々に低下していくのと同時期に Pax3 遺伝子の発現が上昇することや、Pax6 遺伝子と Pax3 遺伝子の発現境界部分から三叉神経節ニューロンが分化してくることがわかった (図 2)。そこでニワトリ胚の予定三叉神経節プラコード領域への遺伝子導入による解析をおこなった。Pax6 遺伝子の強制発現は Pax3 遺伝子の発現を抑制し、その後の三叉神経節の発生を抑制した。一方 Pax3 遺伝子の強制発現は Pax6 遺伝子の発現を抑制した。これらのことから、Pax3 遺伝子の発現上昇が三叉神経節ニューロンの形成に必要であることが明らかとなったとともに、Pax6 遺伝子は Pax3 遺伝子の発現を、Pax3 遺伝子は Pax6 遺伝子の発現を相互に抑制することによって三叉神経節の位置決定に関与することがわかった。さらに、Pax6 タンパク質が常に活性化された状態にした場合、予定三叉神経節領域が水晶体に分化転換することがわかった。

これまで、三叉神経節プラコードの形成に Pax6 遺伝子に関与しているという報告は無く、全く新しい知見が得られた。また、Pax3 遺伝子の発現領域の決定やそれに続く三叉神経節プラコードの位置決定についてはほとんど報告が無かったが、この問題について重要な情報が得られた。これらの結果により、プラコードの形成と分化制御メカニズムの一端が明らかになった。また、iPS 細胞から人工的に感覚器官を作るなどの再生医療には、各種器官の正常発生の制御メカニズムについての理解が不可欠であるが、今回の培養実験から得られた成果は、そのような再生医療のための基礎的知見として、今後の応用に役立つと考えられた。

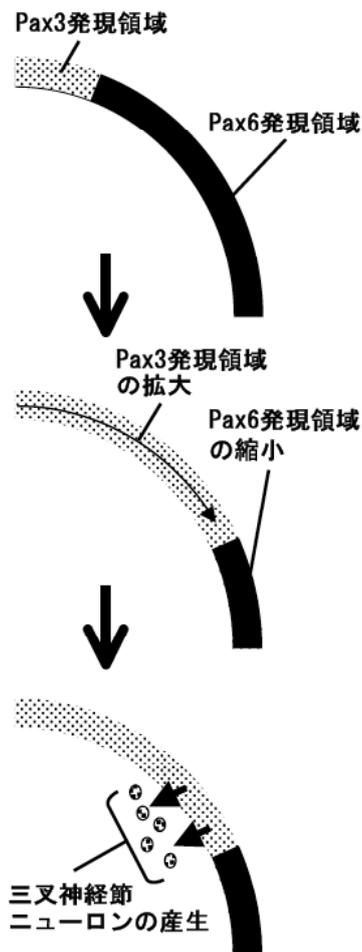


図2 : Pax3/6と三叉神経節ニューロンの発生

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) Wakamatsu Y. Mutual repression between Pax3 and Pax6 is involved in the positioning of ophthalmic trigeminal placode in avian embryo. *Development Growth and Differentiation* 53, 994-1003, 2011. (査読有り)

(2) Noro M, Yuguchi H, Tsuihiji T, Yonei-Tanura S, Yokoyama H, Wakamatsu Y., Tamura K. Role of paraxial mesoderm in limb/flank regionalization of the trunk lateral plate. *Developmental Dynamics* 240, 1639-1649, 2011. (査読有り)

(3) Wakamatsu Y., Sakai D, Suzuki T, Osumi N. FilaminB is required for the directed localization of cell-cell adhesion molecules in embryonic epithelial development. *Developmental Dynamics* 240, 149-161, 2011. (査読有り)

(4) Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Stabilization of ATF4 protein is required for the regulation of epithelial-mesenchymal transition of the avian neural crest. *Developmental Biology* 344, 658-668, 2010. (査読有り)

(5) Nonomura K, Takahashi M, Wakamatsu Y., Takano-Yamamoto T, Osumi N. Dynamic expression of Six family genes in the dental mesenchyme and the epithelial ameloblast stem/progenitor cells during murine tooth development. *Journal of Anatomy* 216, 80-91, 2010. (査読有り)

(6) Wakamatsu Y. Overlapped and differential expression of PKA-inhibitor isoforms during avian organogenesis period. *Development Growth and Differentiation* 51, 707-714, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計8件)

(1) 若松義雄 プラコード個性決定の制御機構の解明、日本分子生物学会第10回春季シンポジウム、2010年6月7日、松島

(2) 若松義雄 培養神経板のプラコードへの形質転換実験系を用いたプラコードサブタイプの決定メカニズムの解析、日本発生生物学会第43回大会、2010年6月22日、京都

(3) Wakamatsu Y., Suzuki T, Osumi N. Stability control of ATF4 protein is involved in the promotion of neural crest EMT. 2010 SDB-JSDB Joint Meeting, 2010年8月7日、アルバカーキ、USA

(4) Wakamatsu Y. Regulatory roles of protein degradation in the neural crest epithelial-mesenchymal transition. Neuro2010、2010年9月3日、神戸

(5) Wakamatsu Y. Osumi N, Suzuki K. Molecular basis for the heterochronic development of marsupial cranial neural crest. 日本発生生物学会第44回大会、2011年5月19日、沖縄

(6) Tashiro R, Sakayori N, Matsumata M, Owada Y, Wakamatsu Y, Osumi N. Fatty acid binding protein (Fabp7) is involved in the maintenance of neural stem/progenitor cells, survival of neurons and maturation of astrocytes. 第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、横浜

(7) Wakamatsu Y. Mutual repression of Pax3 and Pax6 determines the lateral border of the trigeminal placode. 第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜

(8) Hatakeyama J, Wakamatsu Y, Shigemoto R, Shimamura K. The adherens junction serves as a switch for neurogenesis by facilitating Notch-delta interaction in vertebrate. 第34回日本神経科学大会、2011年9月15日、横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 義雄 (WAKAMATSU YOSHIO)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 60311560

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :