

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25年 5月 31日現在

機関番号：3 2 6 2 2

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012年度

課題番号：2 2 6 5 9 3 3 4

研究課題名（和文）哺乳類における摂食調節関連神経核とニューロンの発生過程を再現する培養法の開発

研究課題名（英文）Establishment of the culture method to mimic the development of neural nucleus of alimentary center in mammals

研究代表者 今井 元 (IMAI HAJIME)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：9 0 2 9 1 3 4 3

研究成果の概要（和文）：本研究では、まず、3日間のラット全胚培養法と9日間の頭蓋顔面原基の器官培養を組み合わせた培養系を確立した。本培養系における培養胚は、視床下部と下垂体の発生に必要な重要な分子（Lhx1, Foxa2, Isl-1, pitx2, Nkx2.1, NeuroD1, Tpit, Lhx3, Shh, Bmp2, Bmp4, Fgf8）の発現が再現された。さらに、器官培養後の頭蓋顔面原基では、腺下垂体ホルモン（ α subunit, POMC, LH β , TSH β ）発現が再現された。また、本系に前方中軸中内胚葉（前方中軸中内胚葉）の除去実験を適用することによって、前方中軸中内胚葉が Lhx1, Foxa2, isl-1, Shh, Fgf8, Bmp4, Bmp2, Nkx2.1 の産生に不可欠であることを示され、Shh の中和抗体による機能阻害では、視床下部の Nkx2.1 産生細胞が減少したことから、Shh 分泌性の前方中軸中内胚葉が弓状核（摂食中枢）の発生にとって不可欠であるが示唆された。しかしながら、この系では、器官培養系における酸素不足によって、予定弓状核は、NPY-, α MSH-ニューロンに分化しなかった。そこで、弓状核における NPY-, α MSH-ニューロンの発生を再現する為に、さらに長い期間の全胚培養の確立を開始した。これまでの論文の培養条件では、144 時間までに 19/25 の培養胚で心拍動が消失したのに対し、我々が改良した培養条件では、8/12 の培養胚で 6 日間、心拍動が維持されました。現在、培養胚から摘出した弓状核が、NPY-, α MSH-ニューロンに分化する器官培養系を確立している。

研究成果の概要（英文）： In this study, we initially established the 12 day-culture system by the whole rat embryo culture (WEC) for 3 days followed by the organ culture of craniofacial rudiments for 9 days. The embryos in WEC for 3 days could mimic the appearance of crucial molecules, i.e., Lhx1, Foxa2, Isl-1, pitx2, Nkx2.1, NeuroD1, Tpit, Lhx3, Shh, Bmp2, Bmp4, Fgf8, which were necessary for a development of Hypothalamus and adenohypophysis. The craniofacial rudiments following 9 days could mimic the appearance of adenohypophysis hormones, i.e., α subunit, POMC, LH β and TSH β . Moreover, the application of removal experiment of anterior axial mesendoderm (AME) to the culture system showed that AME was essential for the appearance of Lhx1, Foxa2, isl-1, Shh, Fgf8, Bmp4, Bmp2 and Nkx2.1. In addition, the loss-of-function using an anti-Shh antibody in the culture system resulted in the reduction of the cells expressing the Nkx2.1, suggesting that the Shh-secreting AME were essential for the development of arcuate nucleus, the presumptive alimentary center. However, the arcuate nucleus cultured in the 12 day-culture system failed to differentiate into the NPY-neuron and α MSH-neuron due to the oxygen deficiency in the 12day culture system. Therefore, we started to establish the whole rat embryo culture for 6 days in order to mimic the development of neuron in the presumptive arcuate nucleus. The heartbeat were not maintained in 19 of the 25 embryos cultured for 6 days under the previous culture condition, whereas their heartbeat were maintained for 6 days in 8 of the 12 embryos cultured in novel improved condition. At present, we are establishing the organ culture in which the arcuate nucleus in explants differentiates into NPY-neuron and α MSH-neuron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学・口腔解剖学（含組織学・発生学）

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）・摂食中枢

1. 研究開始当初の背景

摂食活動は、摂食調節中枢として働く視床下部の神経核群、及び、そこに局在する神経性ペプチドニューロンの神経回路網を中心に調節されている。これらの『視床下部の神経核群のパターン形成やニューロンの分化には、間脳の内側基底部に局在する頭部中内胚葉(脊索前板と前腸内胚葉)による持続的な誘導作用が必須である』可能性が高い(仮説: 下述参照)。しかしながら、哺乳類において、頭部中内胚葉による誘導、及び、摂食調節関連の神経核とニューロンの発生を連続して再現できる培養法は確立されていない。

2. 研究の目的

- (1) 長期のラット全胚培養の後、引き続き、視床下部培養を行う長期器官培養法を確立すること
- (2) 上記の培養脳をニッシュとして用いて、摂食調節ニューロンを再生する方法を開発すること

3. 研究の方法

- (1) まず、ラット胚(神経板期～頭褶期)の頭部中内胚葉を DiI や adenovirus で標識・可視化し、次に、全胚培養(72時間)を行うことにより、頭部中内胚葉の移動と誘導能、および、視床下部の神経核のパターン形成を維持し、引き続き、視床下部(頭蓋顔面)培養を行うことによって、弓状核の神経性ペプチドニューロンの分化を再現できる系を確立する。
- (2) 頭褶期の頭部中内胚葉を DiI 標識後に除去し、上記(1)と同様に培養して、摂食調節関連神経核のパターン形成とニューロンの分化における頭部中内胚葉の役割を明らかにする。
- (3) 誘導因子の機能阻害や決定因子の機能亢進を行い、その作用本体の分子を同定する。
- (4) 最後に、ラット胚(神経板期～頭褶期)の

頭部中内胚葉を DiI で標識・可視化し、次に、全胚培養(144時間)を行うことにより、頭部中内胚葉の移動と誘導能、および、視床下部の摂食中枢の分化を維持し、引き続き、視床下部を行うことによって、弓状核の神経性ペプチドニューロンの分化を再現できる系を確立する。

4. 研究成果

(1) 本研究では、まず、前方中軸中内胚葉(AME)を DiI や adenovirus で標識し、3日間のラット全胚培養法後に、9日間の頭蓋顔面原基の器官培養を行う系を確立した。本培養系における培養胚は、視床下部と下垂体の発生に必要な重要な分子(Lhx1, Foxa2, Isl-1, pitx2, Nkx2.1, NeuroD1, Tpit, Lhx3, Shh, Bmp2, Bmp4, Fgf8)の発現が再現された。さらに、器官培養後の頭蓋顔面原基では、腺下垂体ホルモン(α subunit, POMC-MSH- β -ACTH, LH β , TSH β)発現が再現された(図5参照)。(2) また、本系に前方中軸中内胚葉(AME)の除去実験を適用することによって、前方中軸中内胚葉が Lhx1, Foxa2, Isl-1, Shh, Fgf8, Bmp4, Bmp2, Nkx2.1 の産生に不可欠であることを示された。以下にここまでを簡潔にまとめた。

① 移動する AME における Foxa2 の産生(図1) AME を GFP 発現 adenovirus で標識し、抗 GFP 抗体(緑)と抗 Fox-a2 抗体(赤)を用いて蛍光抗体をで検出したものである。

② 移動する AME における Isl1 の産生(図2) 同様に標識した胚を抗 GFP 抗体(緑)と抗 Isl1 抗体(赤)を用いて蛍光抗体染色を行ったものである。すなわち、GFP で標識された AME は、前脳腹側や前脳腹側に侵入し、それらは、Shh と Bmp2 を発現の維持に関係する Isl1 を発現している。

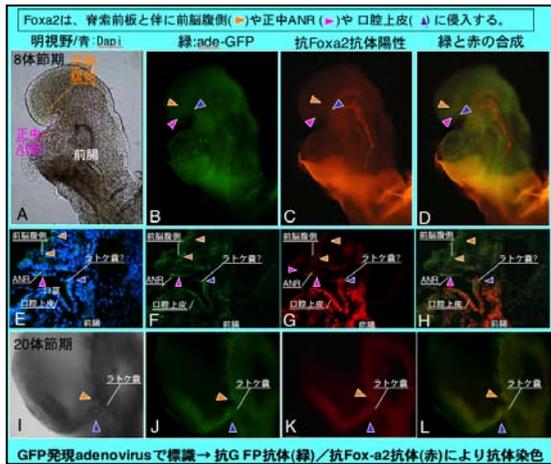


図1. 標識された AME における Foxa2 の分布
 上段 A, B, C, D: 8 体節期の whole mount 抗体染色 | 中段 E, F, G, H: 上段の矢状断切片 | 下段: 20 体節期の whole mount 抗体染色, 正中で2分し, 正中から観察したもの。すなわち, GFP で標識された脊索前板は, 前脳腹側(予定視床下部)や正中 ANR(予定腺性下垂体)に Foxa2 (Shh の転写因子)を発現したまま侵入している。



図2. 標識された AME における Is1-1 の分布

③ AME を除去実験による内側基底核や弓状核の発生に重要な因子の発現の変化の解明
 前方中軸中内胚葉が、視床下部(摂食中枢)・下垂体にどのように関与しているのか?

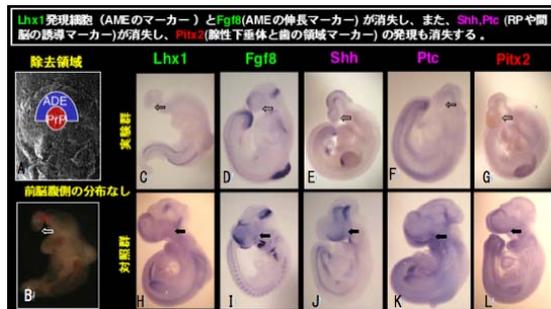


図3. AME 除去後の DiI 陽性 AME 由来細胞と *Lhx1*, *Fgf8*, *Shh*, *Ptc*, *Pitx2* の m-RNA の消失. A: 除去領域 B: DiI 陽性細胞の消失(⇒) C, D, E, F, G: AME 除去後の胎児において in situ ハイブリダーゼーションを行ったもの。前脳側(間脳)腹側・口腔上皮(ラトケ囊)背側における *Lhx1*, *Fgf8*, *Shh*, *Ptc*, *Pitx2* の m-RNA の分布は検出

限界以下になっている(⇒)。H, I, J, K, L: 標識のみの胎児において in situ ハイブリダーゼーションを行ったもの。間脳腹側・ラトケ囊/口腔外胚葉における *Lhx1*, *Fgf8*, *Shh*, *Ptc*, *Pitx2* の m-RNA の分布が検出される(⇒)。 *Lhx1* は AME に発現しており, *Fgf8* は AME に伸長に関係している。また, *Ptc* は *Shh* の受容体であると同時に *Shh* 蛋白により誘導され, *Shh* の最初の下流の分子である。 *Pitx2* は、腺性下垂体と歯の初期マーカーである。

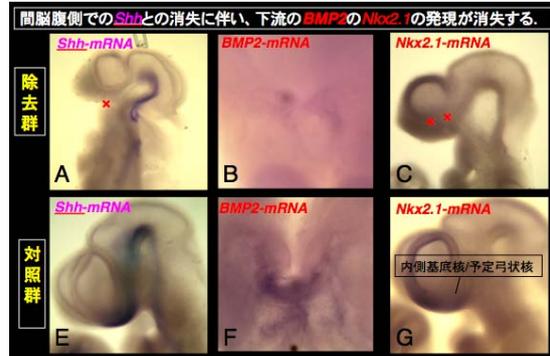


図4. AME 除去後の *Shh* の消失と連動する *Bmp-2*, *Nkx2.1* の m-RNA の消失. A, B, C は, AME 除去胚における *Shh*, *Bmp-2*, *Nkx2.1* の発現を示している。D, E, F は, AME 除去してない胚における *Bmp-2*, *Nkx2.1* の発現を示している。

④ ホルモン産生細胞の分化に AME は、どのように寄与するのか?
 AME 除去したラット胚と除去してないラット胚を用いて長期培養を行った。

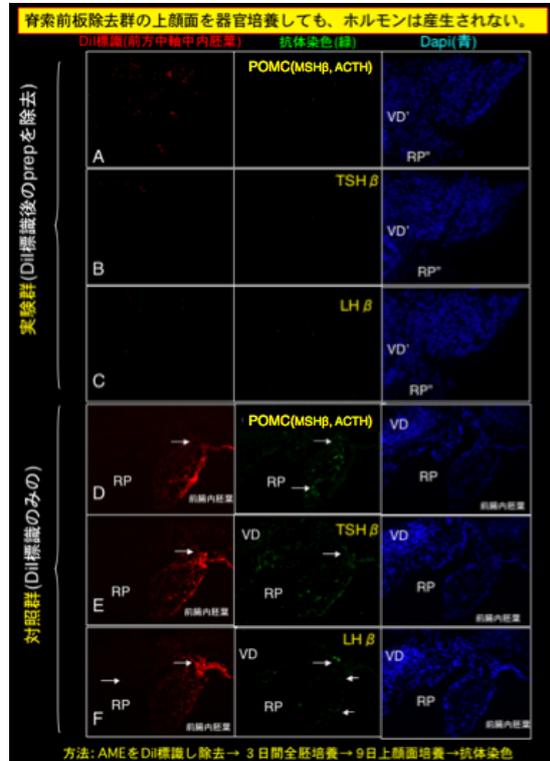


図5. AME を除去後の DiI 陽性 AME 細胞と ACTH と LHβ と TSHβ の抗体陽性細胞の分布。

A, B, C ; AME(脊索前板)を除去した実験群. D, F, C ; 標識のみを行った対照群. RP;ラトケ囊, RP'' ;ラトケ囊相当部位, VD;間脳腹側(予定摂食中枢) 対照群では、標識胚から11/12でACTH、7/12でTSH β 、6/12でLH β の抗体陽性細胞が観察されたのに対し、実験群は、いずれも検出されなかった(0/12)。これらのことから、AMEを除去した場合、誘導能(Foxa2, Shh, isl1)をもつ細胞が移動しなかった為と考えられる。

(3) Shhの中和抗体による機能阻害

さらに、Shhの中和抗体による機能阻害では、視床下部のNkx2.1産生細胞が減少したことから、Shh分泌性の前方中軸中内胚葉が弓状核(摂食中枢)の発生にとって不可欠であるが示唆された。

① Shhの中和抗体は、AMEの間脳への侵入を阻害するのか?



図6. AMEをDiI標識(赤)後、抗-shh抗体(5E1:緑)に暴露(A, 緑)しつつ72時間全胚培養を行った胎児。

AMEの間脳への侵入は阻害しない。

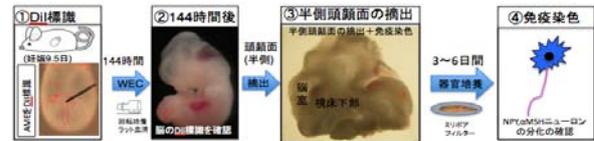


図7. AMEを標識後、anti-Nkx2.2抗体(74.5A5)とanti-shh抗体(5E1)に暴露しながら72時間全胚培養を行った胎児の正面像. a, b, c ; 対照群で、間脳腹側(VD')ラトケ囊(RP')には、Nkx2.1、neuroD1、Lhx3の抗体陽性細胞が癌

札される. d, e, f ; AMEにshhの中和抗体を65 μ g/ml暴露した胎児. g, h, i ; AMEにshhの中和抗体を130 μ g/ml暴露した胎児. ラトケ囊相当部位(RP')と間脳腹側(VD')に濃度依存的に奇形を生じており、また、130 μ g/ml暴露した胎児の間脳腹が輪は、内側基底核(MGE)のマーカであるNkx2.1発現細胞が消失している。

これらのことから、AMEを除去した場合、間脳腹側のAMEの誘導作用(Shh)が阻害されたと為と考えられる。

(4) しかしながら、この系では、器官培養系における酸素不足によって、予定弓状核は、NPY-, α MSH-ニューロンに分化しなかった。そこで、弓状核におけるNPY-, α MSH-ニューロンの発生を再現する為、さらに長い期間の全胚培養の確立を開始した。これまでの論文で紹介されている培養条件では、80%(21/25)の培養胚では、120時間までは、心拍動維持されたけれども、144時間までに19/25の培養胚で心拍動が消失した。我々が改良した培養条件では、8/12の培養胚で6日間、心拍動が維持された。現在、144時間全胚培養を行った胚から摘出した視床下部の予定弓状核が、NPY-, α MSH-ニューロンに分化する器官培養系を確立している。



E9のRat → 8/12生存 → 器官培養の確立へ

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2件)

(1) 服部敦彦, 今井元, 舟橋久視床下部室傍核の4型メラノコルチン受容体発現ニューロンによる食欲調節東京医科歯科大学教養部研究紀要42号, 37-46, 2011

(2) 今井元 : 鳥類胚のメッケル軟骨に対する中脳後脳境界域と頬咽頭膜の重要性について口腔病学会誌79巻, 26-33, 2011

〔学会発表〕(計1件)

(1) ラット胚の下垂体発生において誘導と分化にかかわる組織の移動と分布の重要性について

今井元, 塩田清二 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012.3.26 山梨

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 元 (IMAI HAJIME)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90291343

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし