

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500414

研究課題名(和文) 発生早期に特定の運動神経に起こる細胞死を決定する転写因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of transcription factors that regulate cell death of a specific subpopulation of motoneurons

研究代表者

八木沼 洋行 (YAGINUMA, HIROYUKI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90230193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で得られたおもな成果は以下の通り。(1) 頸髄上端付近における詳細な観察の結果、FoxP1とHoxC5の発現が細胞死の分布と良く一致していることが確かめられた。因果関係については結論を得るには至らなかった。(2) HoxC6の強制発現によって細胞死が抑制された。生き残った頸髄の運動神経は外側運動神経核様の分化を示した。(3) Bcl2の強制発現によって運動神経を不死化したところ、外側運動神経核様の分化を示した。(4) マウスにおいても発生早期の頸髄でLim3陰性の運動神経に特異的な細胞死が起こる。しかし、Lim3陰性の細胞群は完全には無くならない。

研究成果の概要(英文)：The major results obtained in this study are as follows. (1) Detailed observation in the vicinity of the upper end of the cervical spinal cord revealed that expressions of Foxp1 and HoxC5 well corresponded with the distribution of cell death. However, it was not possible to get a conclusion about the cause-and-effect relationship. (2) Cell death was suppressed by the forced expression of HoxC6. Rescued motor neurons of the cervical spinal cord showed the differentiation similar to the lateral motor column. (3) After forced expression of Bcl2, the cervical motor nerve survived and showed the differentiation similar to the lateral motor column. (4) In mice, early cell death also occurs in Lim3-negative motor neurons in the cervical spinal cord. However, Lim3-negative motor neurons are not completely eliminated by cell death.

研究分野：神経解剖学、神経発生学

キーワード：運動神経 細胞死 頸髄 ホメオボックス 転写因子 ニワトリ胚 マウス胎仔 発生

1. 研究開始当初の背景

発生の比較的早期の鳥類胚の頸髄において、運動神経細胞が同期して細胞死を起こす。細胞死を起こす細胞は、運動神経サブグループのマーカである6つの転写因子 (Isl1, Isl2, Lim3, MNR2, Phox2b, Foxp1) のうち、Lim3とPhox2bの発現が陰性のグループである。このグループは始めPhox2bとFoxp1を除く4つを発現するが、Lim3の発現が低下するとともにFoxp1が発現上昇することによって現れるが、細胞死によって消失してしまう。Lim3発現の低下は、吻尾軸上の他の部位でも見られる現象でありことから、Lim3発現低下以外にもこの細胞死を決定づける分子の働きがあることが予想される。そこで、運動神経の吻尾軸上の分化に関係することが知られているHox遺伝子がこの細胞死に関与するかどうかを明らかにするために *in situ* hybridization 法でHox遺伝子検索したところ、いくつかの候補分子が見つかった。今後、Hox分子に対する特異抗体による、これらの分子の詳細な発現部位の解析と、実験的な手法によって、これらの分子の細胞死への関与を明らかにすること、およびこの細胞死の持つ生物学的な意義を明らかにすることが求められた。

2. 研究の目的

- 1) Hox分子等の発現範囲の詳細な検討のための前提となる、頸髄に存在する運動神経サブグループの分布範囲を含めた同定を行うこと。
- 2) 特異抗体を用いたHox分子および関連分子の発現の詳細な検討(発現する高さ、細胞グループ)と細胞死との相関的な関連を検討する。
- 3) 関連すると思われる分子の機能について実験的に因果関係を明らかにする。
- 4) この細胞死の生物学的な意義を明らかにするために、死ぬ細胞の分化の方向について不死化による解析を行う。
- 5) ニワトリの結果をマウスにおける結果と比較し、この細胞死の普遍性について検討する。

3. 研究の方法

- 1) 運動神経サブグループに特異的な抗体(入手不能の場合は自ら抗体作成をして)を用いた免疫組織化学的手法および順行性及び逆行性の神経標識法を用いて頸髄における運動神経サブグループの構成とその発生を明らかにする。特に、頸髄上端部と下端部(細胞死が起こる吻尾端付近)における詳細な解析を行う。
- 2) 1)の結果に基づき、Hox分子に対する抗体による免疫染色法と細胞死マーカーを用いて、それらの運動神経サブグループにおける分布について同一切片ないし隣接切片を用いて検討する。
- 3) Hox分子の強制発現実験

細胞死が起こる領域の下端部とHoxC6の発現がほぼ一致していることから、HoxC6の発現ベクターを電気穿孔法によって、頸髄の一侧に導入し、HoxC6の強制発現によって細胞死が起こるかどうかが確かめた。

4) 以前の研究から抗アポトーシス作用を持つBcl2の強制発現により、この細胞死は抑制されることが明らかとなっている。生き残った細胞がどのような分化方向に向かうかについて特異的なマーカーを使って検索した。

5) マウスにおける解析

マウスにおいても頸髄の早期の細胞死があることが明らかになっているが、これが鳥類のものと同じであるか否かについては明らかにされていない。本研究ではマウスにおける頸髄細胞死の解析も並行して行った。

4. 研究成果

1) 頸髄における運動神経サブグループの同定

これまでの研究で、頸髄には全長にわたり、後根から軸索を出して僧帽筋を支配し、Phox2bを発現する運動神経(dMN)が存在することが明らかになっている。この運動神経細胞群と頸髄最上部で副神経脊髄根(SAN)を出す運動神経群(SAN-MN)が同じものであるかどうか検討を行った。SAN-MNはC2から延髄の尾側端部にかけて存在し、dMNと同じくPhox2bを発現し、Nkx2.2陽性領域から発生することが明らかとなり、dMNとSAN-MNが同一の運動神経群に属することが明らかとなった。C2領域では、両者が混在して存在するが、C2の後根の発達度合には個体差があり、それに応じて後根を経由するものとSANを経由するものに分かれることが明らかとなった(図1)。

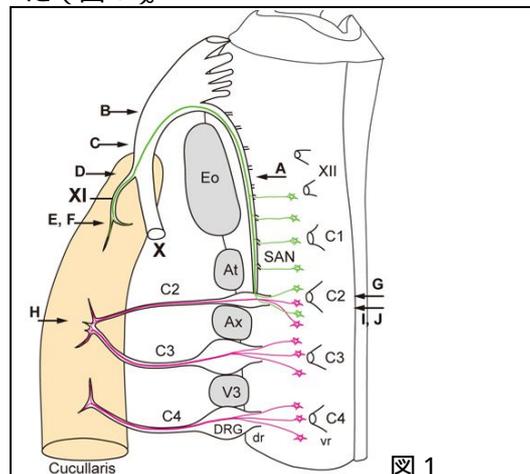


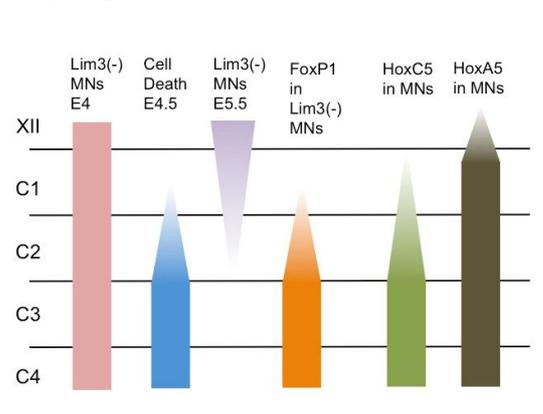
図1 dMN(赤)とSAN-MN(緑)の関係を示す模式図 dMNとSAN-MNは同一の運動神経グループであるが、その経路が異なっている。その境界はC2付近である。

2) 特異抗体作成による hox や関連遺伝子の発現部位と細胞死の分布の厳密な対応の解明。

細胞死が認められる最も吻側端において、細胞死の分布と運動神経サブグループマーカーおよび Hox 分子の特異抗体による免疫組織化学を隣接切片で実施し、対応関係を明らかにした(図2)。

細胞死の起こる直前頸髄上部から延髄下部にかけて Lim3⁻ (Isl1⁺, Phox2b⁻) の運動神経が存在しているが、細胞死後は Lim3⁻ の運動神経は C1 付近から C2 にかけて減少し、C3 では認められなくなる。細胞死の分布は、C2 から上部に向かうにつれて少なくなり、C1 ではほとんど認められなくなる。このような細胞死の分布に良く一致していたのは FoxP1 の発現であった。HoxC5 の発現もほぼ一致しているが、ややより吻側まで認められた。HoxA5 の発現は細胞死の分布より吻側から始まっていた。また、頸髄の dMN は HoxA5 を発現するが、HoxC5 を発現しないことが明らかとなり、dMN の発生を考える上で興味深い結果が得られた。以上の所見から細胞死と HoxC5 および FoxP1 の関与が示唆された。

図2 頸髄上部の運動神経核における各種マーカーの分布範囲



これらの結果に基づき、FoxP1 や HoxC5 の発現抑制実験を行ったが、本研究期間内では明白な因果関係を示すデータは得られなかった。今後さらに研究を行う予定である。

3) HoxC6 の強制発現実験

細胞死が起こる領域の下端部と HoxC6 の発現がほぼ一致していることから、HoxC6 の発現が細胞死が起こる下端部を規定している可能性が考えられた。この可能性を確かめるため HoxC6 の強制発現によって細胞死が抑制されるか検討した。

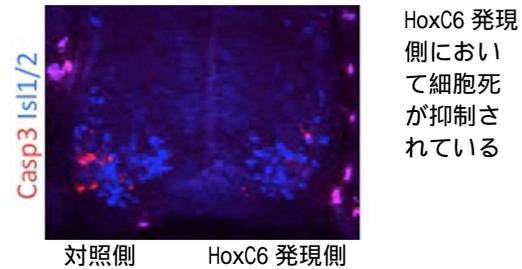
HoxC6 を頸髄中位で強制発現させると、発現した側で細胞死が抑制されていた。これらの細胞は細胞死の時期が過ぎても Lim3⁻ の運動細胞として残っており、FoxP1 の発現も認められた(図3-A)。

HoxC6 は上肢を支配する運動神経である LMC への分化を促すことが知られているので、頸髄の運動神経の LMC への転換が起こってい

るか LMC の分化マーカーの一つである RALDH2 (retinal aldehyde dehydrogenase 2) の発現を調べたところ、HoxC6 を発現して生き残ったと思われる細胞において RALDH2 陽性であることが分かった(図3-B)。この結果は HoxC6 の発現が細胞死を抑制することを示しており、HoxC6 の発現が細胞死の起こる領域の下端を規定していることを示唆する。しかし、その作用が LMC への誘導によって運動神経の分化の方向性が変わったためなのか、細胞死の実行機序の遮断によるものなのかについては今後の検討が必要である。

図3-A

HoxC6 の強制発現の影響



HoxC6 発現側において細胞死が抑制されている

図3-B

St27(細胞死終了後)のRALDH2(赤)と FoxP1(緑)の発現



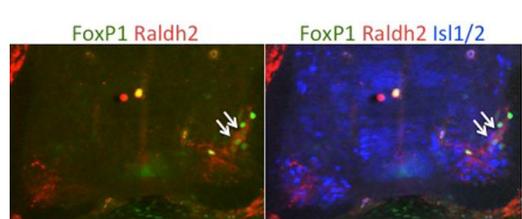
HoxC6 発現側において RALDH2 (赤) FoxP1 (緑) が発現している。

4) Bcl2 による不死化によるその後の分化

以前の研究から抗アポトーシス作用を持つ Bcl2 の強制発現により、この細胞死は抑制されることが明らかとなっているが、生き残った細胞がどのような分化方向に向かうかについては解析されていない。そこで、Bcl2 の強制発現後の分化について特異的なマーカーを使って検索した。

図4

Bcl2 発現による細胞死抑制後のマーカー発現



対照側 Bcl2 発現側 対照側 Bcl2 発現側
Bcl2 発現側において、Foxp1 と RALDH2 陽性の細胞の出現が認められた。

Bcl2 の導入を行った側では、細胞死が終わった時期においても FoxP1 陽性の細胞群が認

められた。それらの細胞には LMC の分化マーカーである RALDH2 が発現していた。これは死ぬ細胞は LMC への分化傾向を示すことを示唆するものである。今後、他の LMC 分化マーカーによって確認する予定としている。

5) マウスにおける解析

本研究ではマウスにおける頸髄細胞死の解析も並行して行った。マウスにおける頸髄の早期細胞死は E10.5 から E12.5 の間に起こる。これが鳥類のものと同じであるか否かについては明らかにされていない。

細胞死を起こす細胞における運動神経サブグループ特異マーカーの発現を見たところ、マウスにおいても死ぬ細胞は Lim3 陰性のサブグループであることが明らかとなった(図 5-A)。これは鳥類における早期頸髄の細胞死と同じ結果であった。しかし、この細胞死が終了した時点においても Lim3-のサブグループは消失してしまうことは無く、相当数の Lim3-の運動神経が認められた(図 5-B)。この運動神経群がどの筋群を支配するものであるかはあきらかではないが、マウスを含む哺乳類の頸髄上部には体軸筋(Lim3+の運動神経で支配される)以外にも舌骨下筋群や横隔膜を支配する運動神経群が存在する。これらの筋群を支配する運動神経は鳥類の頸髄の大部分には認められない。このような違いが Lim3 陰性の運動神経群の存在の理由であると考えられた。

図 5-A マウスにおける頸髄の早期運動神経細胞死は Lim3-の細胞群に起こっている

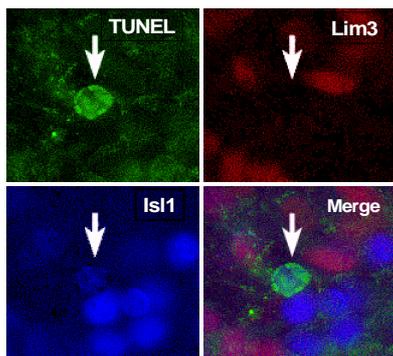
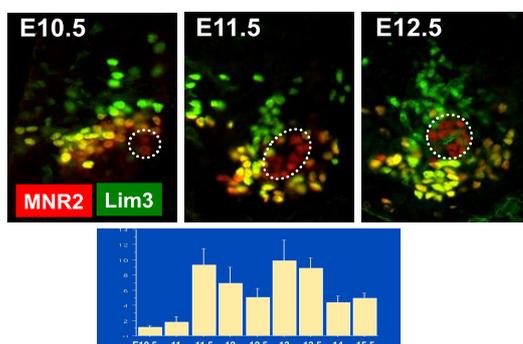


図 5-B 細胞死が終わっても Lim3-の細胞群は残っている



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 11 件)

MASUDA, T; SAKUMA, C; YAGINUMA, H; TANIGUCHI, M, Attractive and permissive activities of semaphorin 5A toward dorsal root ganglion axons in higher vertebrate embryos, *Cell Adhesion & Migration*, 8/ 6, 603-606, 査読有, 2014.

doi: 10.4161/19336918.2014.972770

MASUDA, T; SAKUMA, C; NAGAOKA, A; YAMAGISHI, T; UEDA, S; NAGASE, T; YAGINUMA, H, Follistatin-like 5 is expressed in restricted areas of the adult mouse brain: Implications for its function in the olfactory system, *Congenit Anom(Kyoto)*, 54/ 1, 63-66, 査読有, 2014.

doi: 10.1111/cga.12022

WATANABE, Y; SAKUMA, C; YAGINUMA, H, NRP1-mediated Sema3A signals coordinate laminar formation in the developing chick optic tectum, *Development*, 141/ 18, 3572-3582, 査読有, 2014.

doi: 10.1242/dev.110205

HIRANO, M; KOBAYASHI K; OKADA, T; YAGINUMA, H; KOBAYASHI K, Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by a lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein, *PLoS One*, Sep 24;8(9):e75896, 査読有, 2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0075896.

eCollection 2013

MASUDA, T; SAKUMA, C; UENO, T; YAMADA, Y; OHMOMO, H; UEDA, S; YAMAGISHI, T; YAGINUMA, H, Spatiotemporal patterns of the Huntingtin-interacting protein 1-related gene in the mouse head, *Congenit Anom(Kyoto)*, 53/ 4, 141-148, 査読有, 2013. doi: 10.1111/cga.12023

MASUDA, T; TANIGUCHI, M; SAKUMA, C; YAMAGISHI, T; UEDA, S; KAWAGUCHI, M; YAGINUMA, H, Development of the dorsal ramus of the spinal nerve in the mouse embryo: involvement of semaphorin 3A in dorsal muscle innervation., *Congenitak Anomalies*, 53/ 3, 122-126, 査読有, 2013. doi: 10.1111/cga.12019

KOBAYASHI, N; HOMMA, S; OKADA, T; MASUDA, T; SATO, N; NISHIYAMA, K; SAKUMA, C; SHIMADA, T; YAGINUMA, H, Elucidation of target muscle and detailed development of dosal motor neurons in chick embryo spinal cord., *J.Comp.Neurol.*, 521/ 13, 2987-3002, 査読有, 2013.

doi: 10.1002/cne.23326

SHIMADA, T; YAGINUMA, H; SATO, N; HOMMA, S, Neurogenin2 expression together with

NeuroM regulates GDNF family neurotrophic factor receptor 1(GFR 1)expression in the embryonic spinal cord., Dev.Biol., 370(2), 250-263, 査読有, 2012.

doi: 10.1016/j.ydbio.2012.08.002

MASUDA, T; SAKUMA, C; TANIGUCHI, M; KANEMOTO, A; YOSHIKAWA, M; SATOMI, K; TANAKA, H; TAKEUCHI, K; UEDA, S; YAGINUMA, H; SHIGA, T, Development of the dorsal ramus of the spinal nerve in the chick embryo:A close relationship between development and expression of guidance cues, Brain Research, 1480, 30-40, 査読有, 2012.

doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.055

〔学会発表〕(計 25 件)

向笠勝貴, Transcription factor FoxP1 is involved in the induction of apoptosis specific to the cervical spinal cord of chick embryo,第 120 回日本解剖学会 全国学術集会,2015/3/22 神戸市

向笠勝貴, ニワトリ胚発生早期に見られる頸髄運動神経のアポトーシスに対する転写因子 FoxP1 の関与,第 119 回日本解剖学会 全国学術集会,2014/3/27 下野市

八木沼洋行, Elucidation of the target and detailed development of dorsal motor neurons in the chick embryo spinal cord, International Symposium on Morphological Sciences 2013,2013/9/10 新潟市

八木沼洋行, Early programmed cell death in the vertebrate cervical spinal cord occurs in a specific subpopulation of motoneurons, International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 2013, 2013/8/28 仙台市

岡田知明, 頸髄の運動神経を特徴づける Hox 分子の局在解析, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013/3/28 高松市

八木沼洋行, 鳥の僧帽筋を支配する運動神経細胞の同定と軸索経路および発生について, 研究連携セミナー ポスター発表会 2012,2012/12/18 福島市

八木沼洋行, Identification of motor neurons innervating the cucullaris muscle in the chick embryo, 第 35 回日本神経科学大会, 2012/9/11 京都市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/cms/anatomy1/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

八木沼 洋行(YAGINUMA HIROYUKI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号:90230193

(2)研究分担者

西山 慶治(NISHIYAMA KEIJI)

郡山女子大学・家政学部・教授

研究者番号:10106354

本間 俊作 (HOMMA SHUNSAKU)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号:20261795

(3)連携研究者

なし