

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：31602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670782

研究課題名(和文) 摂食中枢とネットワークを形成する成長/生殖調節神経の発生を再現できる培養系の開発

研究課題名(英文) Establishment of the culture system to be able to maintain the development of growth / reproduction nervous system.

研究代表者

今井 元 (Hajime, Imai)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：90291343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、胎齢9.5日のラット胚の長期全胚培養法を確立し、以下の実験を行った。前方中軸中内胚葉(AME)の除去実験では、AMEが鼻上皮の発生関連遺伝子(Fgf8やBmp2等)の発現に関与し、SHHの中和抗体(5E1)の適応では、SHHが鼻上皮の神経発生関連転写因子(Nkx2.1等)の発現に関与することが明らかになった。対照的に、Gli3のK.O.マウスでは、GnRHニューロンは鼻上皮由来の鋤鼻器中で分化していたが、摂食中枢近傍の視索前野への移動が阻害されていた。これらの結果からAMEはShh-Gli3カスケードを介して、GnRH-ニューロンの移動の場の形成に関与すること明らかになった。

研究成果の概要(英文)：GnRH-neurons originates from nasal epithelium and forms a network of feeding center. The aim of this study is to elucidate the inductive potencies of anterior axial mesendoderm (AME) for the determination of migratory pathway for GnRH neuron. We performed the loss of function with both surgical ablation of AME and a neutralizing antibody of Shh (5E1) in E9.5 rat embryos. The embryos were cultured for 72-96 hours in the whole embryo culture (WEC). The surgical ablation resulted in the lack of transcripts of down-stream genes, such as Fgf-8 and Bmp-2, in nasal epithelium (NP). Moreover, the application of 5E1 reduced the detection levels of transcription factors relating with neurogenesis, e.g. Nkx2.1. Furthermore, we demonstrated the appearance of the immunoreactive cells against anti-GnRH antibody only in NP-derived vomeronasal organ. Shh contributes to the migration of GnRH-neuron through Gli3. These results suggest that Shh signaling is related to migration of GnRH-neuron.

研究分野：発生生物学

キーワード：長期全胚培養法 GnRHニューロン 摂食中枢 視索前野 鼻上皮 移動 前方中軸中内胚葉 SHH

1. 研究開始当初の背景

(1) 摂食活動は、末梢の受容器から自律神経を介して送られる神経性情報と、末梢の消化器から血流を介して送られる内分泌物質(レプチン・グレリン)や血糖などの液性情報が、視床下部や大脳辺縁系に局在する神経核の神経回路網によって統合され、調節されている。脳室周囲領域のSRIF(ソマトスタチン)ニューロンは、GHRHとグレリンの両方の分泌を抑制する。また、LHRH(GnRH)ニューロンは、レプチン受容体をもつ弓状核からの投射を受ける視索前野に局在するが、LHRHニューロンの活性は、絶食によって低下し、レプチンの投与によって回復する。

(2) 鳥類において、SRIF/LHRH(GnRH)ニューロンは、鼻板から嗅球に移動し視床下部に到達し、摂食中枢とネットワークを形成すること、また、頭部の神経内分泌器官の発生には、頭部中内胚葉(AME: 前方中軸中内胚葉)からの誘導(Shh シグナリング)が必須であることが示されている。そこで、『SRIF/LHRH(GnRH)ニューロンの分化運命の決定・移動・最終分化においても頭部中内胚葉の存在と誘導作用が必須である』という仮説の着想に至った。しかしながら、哺乳類においてSRIF/LHRH(GnRH)ニューロンの鼻板における決定から視床下部におけるネットワーク形成までの発生機構を網羅的に解明できる培養系は存在していなかった。そこで、本研究では以下の2項を目的とした。

2. 研究の目的

(1) GnRHニューロンの決定・移動・分化を網羅的に再現できるラット頭部培養法を確立すること。

(2) 本系を用いてGnRHニューロンの発生機構を解明すること。

3. 研究の方法

(1) GnRHニューロンの移動・決定・分化を再現できるラット頭部培養法を確立する。

(2) 確立した系を用いて、GnRHニューロンの起源と移動様式を解明する。

(3) 実験発生学的な研究とGli3 K.O.マウスの解析と比較して、その分子機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 側方前神経褶と前方中軸中内胚葉の鼻板への寄与

GnRHニューロンを形成する鼻板の起源は、両生類、鳥類、マウスでは、側方の前神経褶といわれている(図1)。また、前神経褶正中

には、前方中軸中内胚葉が存在する(図1)。

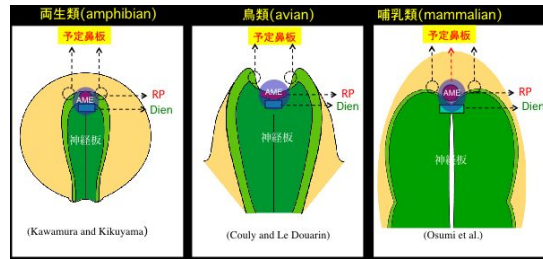


図1. 前神経褶の正中には、前方中軸中内胚葉は存在する。

そこで、胎齢9.5日のラット胚に鼻板の近傍にどのような細胞が移動するのかを確かめるために、前神経褶の側方DiI標識(図2)し、全胚培養で発生を維持し、鼻板に寄与するかどうかを明らかにする実験を行った。

その結果、5~6体節期で側方の前神経褶を標識した場合は、30-体節期の鼻板に寄与していた。

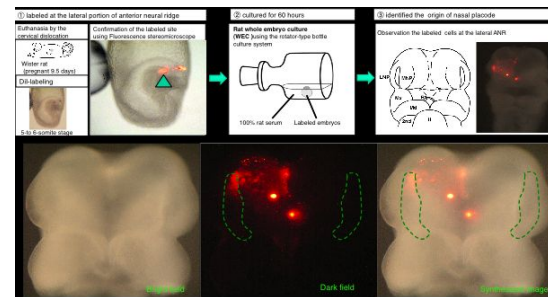


図2. ラット胚の前神経褶の側方は、鼻板に寄与する。

さらに、同様の目的で前方中軸中内胚葉をDiI標識し(図3)、鼻板の近傍に寄与するかを明らかにした。

その結果、後期頭褶期(LHF)までにAMEを標識した場合は、30-体節期の鼻板の内側に移動していた。

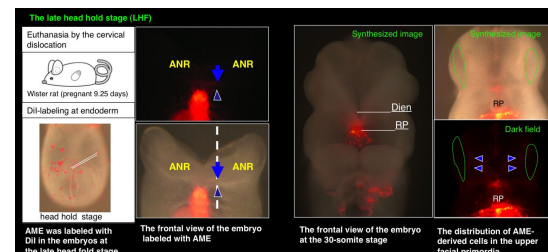


図3. 前方中軸中内胚葉は、鼻板に内側に寄与する。

これらの結果は、前方中軸中内胚(AME)が、鼻板におけるGnRHニューロンの発生や移動に参与することを示唆している。

(2) 摂食中枢とネットワークを形成する成長/生殖調節神経(GnRH-neuron)の初期発生と移動経路の決定における分子生物学的解析: 前方中軸中内胚葉のGnRH-ニューロンの移動の場の形成への寄与

次に、前方中軸中内胚葉(AME)の除去法と中和抗体(5E1)の適用法を確立した。本系を用いて、1. AMEの除去実験 2. Shhの中和抗体(5E1)による生体抗体染色及び3. 阻害実験を行い、全胚培養系を用いて6~92時間の培養を行った。

その結果、1. AMEは、NEにおけるFgf-8やBmp-2などの下流の遺伝子発現に重要であること、さらに、2. Shhの中和抗体(5E1)は、全胚培養下でAMEに接着し、また、3. 鼻上皮におけるなど神経発生に関わる転写因子(Nkx2.1やNeuroD1など)の転写因子の産生を減少させることが明らかになった(図4)。

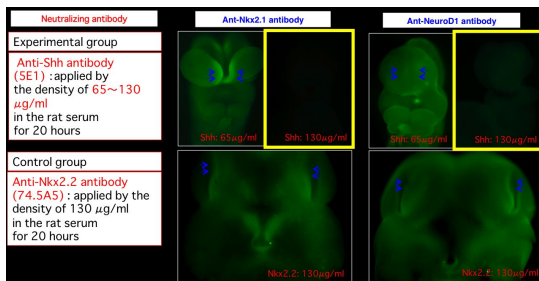


図4. Shhの中和抗体130 µg/ml加えた場合、Nkx2.1やNeuroD1の産生が消失する。

これらの結果と対照的に、Shhの下流の転写因子であるGli1, Gli2のダブルK.O.マウスではGnRHニューロンは視索前核で観察される。4. また、成果(3)のGli3のK.O.マウスの解析においても、GnRHニューロンは間脳の視索前野への移動が阻害されていたが、鼻上皮由来の鋤鼻器中で分化していた。したがって、AMEは、Shh-Gli3のカスケードを介して、GnRH-ニューロンの移動の場の形成に関与していることを示唆している。

(3) マウス胚におけるGnRH-ニューロンの移動に非依存的な性腺刺激ホルモン分泌細胞の出現

本研究では、嗅球が欠損するGli3のK.O.マウス(-/-)のホモ変異体と(+/-)の野生型の視床下部及び下垂体におけるGnRHニューロンとLH産生細胞の分布を解析した。

その結果、GnRHニューロンは、嗅神経(鼻板由来)の周囲では検出できたが(図5a, 6a)、嗅球が欠損しており(図5b, 6b)、前脳前端から脳内に侵入する細胞(図5c, 6c)及び第三脳室前壁(図5d, 6d)や視床下部基底部分(図5e,

6e)に移動する細胞は検出できなかった。

また、正中隆起の近傍や腺性下垂体の近傍において、抗GnRH抗体に対する免疫陽性の細胞は、軸索すら検出できなかった(図5f, 6f)。

また、第三脳室前壁でGnRHニューロンの移動と定着、および、正中隆起でのGnRH分泌が観察されないにも関わらず、腺性下垂体においてLH産生細胞が出現することを明らかになった。

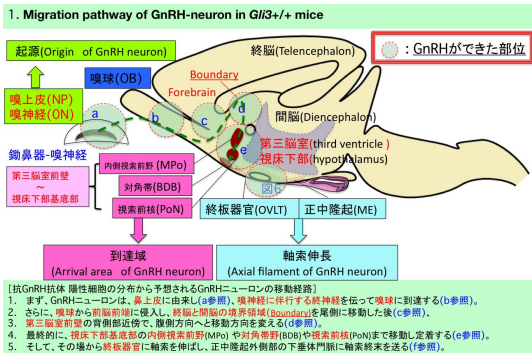


図5. Gli3のK.O.マウス(+/-)のGnRHニューロンの移動経路

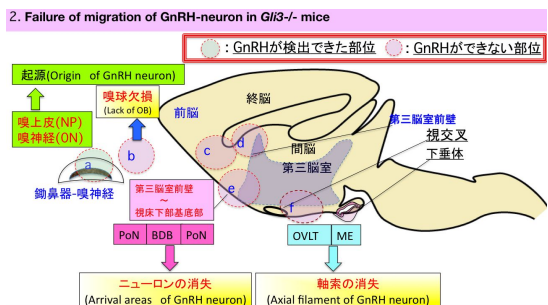


図6. Gli3のK.O.マウス(-/-)のGnRHニューロンの移動経路

これらの結果は、GnRHニューロンが、鼻上皮から嗅神経に沿って前脳に侵入しなかった場合には、視床下部にGnRHニューロンは出現しないことを示しており、哺乳類のGnRHニューロンは鼻板のみに由来するという仮説を支持していた。また、Gli3(-/-)マウスにおいてLH産生細胞が出現したことは、LHなどの腺性下垂体のホルモン産生細胞の発生は、GnRH-ニューロンの移動に非依存的な分化過程であることを示していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

今井 元 (発表者), 馬場麻人、摂食中枢とネットワークを形成する成長/生殖調節神経(GnRH-neuron)の初期発生と移動経路の決定における分子生物学的解析: Elucidation for the molecular mechanism of the inductive activity in the early development and migration of GnRH-neuron in rat embryos. 第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月13日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟市)

鈴木礼子(発表者), 今井 元、破骨細胞は、骨基質を吸収するだけではなく、核数が多くなると骨細胞も吸収する～破骨細胞は核数依存的に異なった機能を発現するのか?～ Osteoclasts with large nuclear number can not only resorb bone matrix but also osteocytes 第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月13日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟市)

今井 元(発表者)、馬場 麻人、マウス胚における GnRH-ニューロンの移動に非依存的な性腺刺激ホルモン分泌細胞の出現. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会、平成 26 年 9 月 27 日、福岡国際会議場(福岡)

〔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(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者 今井 元 (IMAI, Hajime)
奥羽大学・歯学部・准教授
研究者番号：90291341