

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25711015

研究課題名(和文) 交感神経系の成立機構と交感神経-血管とのインターフェース

研究課題名(英文) Sympatho-adrenal morphogenesis and interaction with blood vessels

研究代表者

齋藤 大介 (Saito, Daisuke)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：90403360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物成体において自律神経系および内分泌器官は体内恒常性維持を担う中心ユニットとして認識されている。しかし、これらの機能ユニットが発生時期にどのように作られるのかに関する理解は進んでいない。代表者はこれまでの独自先行研究をもとに、発生期における交感神経(自律神経)と副腎髄質(内分泌組織)の運命分岐機構、副腎皮質と生殖腺の細胞起源の問題、生殖腺形成機構の解明に取り組み、交感神経と副腎髄質の運命分岐にCv-2遺伝子が関わること、副腎皮質と生殖腺の起源が異なること、さらに、生殖腺形成のトリガーがShh遺伝子によって担われることを見出し、それぞれの成果は論文報告済み、あるいは論文投稿済みの状態である。

研究成果の概要(英文)：In adult animals, the autonomic nervous system and endocrine organs act as the major units to maintain homeostasis. However, it remains elusive how these functional units are formed during embryonic development. In this research, I have worked in order to reveal the mechanism underlying lineage segregation of sympathetic neurons (autonomic nervous system) and adrenal medulla (endocrine tissue), the cell lineages of adrenal cortex and gonad, and the mechanism underlying the formation of gonad. I have found that Cv-2 gene is involved in the lineage segregation of sympathetic neurons and adrenal medulla, the adrenal cortex and gonad are derived from the different origins, and Shh gene act as the trigger to promote gonadogenesis. I have already published two works and submitted one as research papers.

研究分野：発生生物学

キーワード：副腎 副腎皮質 副腎髄質 生殖腺 血管 ニワトリ胚

1. 研究開始当初の背景

動物成体において自律神経系および内分泌器官は体内恒常性維持を担う中心ユニットとして認識されている。これらの機能ユニットが発生時期にどのように作られるのかに関しては、機能ユニット成立基盤の理解につながるのみならず、先天性疾患の解明にも直結するため重要である。しかしながら、これら機能ユニットの発生メカニズムの解明は立ち遅れていた。代表者はこれまでに、自律神経である交感神経と内分泌器官である副腎髄質が共通前駆細胞から生じ、次に BMP シグナルのインプット差によってこれら2つの細胞種へと分岐することを明らかにしていた(引用文献1)。また、内分泌器官である生殖腺形成に Shh シグナルが関与する可能性を先行研究において見出していた。

2. 研究の目的

ゆえに本研究では代表者の先行研究の知見をさらに発展させるかたちで自律神経系と内分泌器官の発生機構の解明を目的とした。具体的な研究目的として以下の2つを設定した。交感神経(自律神経)と副腎髄質(内分泌組織)の運命分岐に関わる BMP シグナルのスイッチングの仕組みを明らかにすること、および副腎皮質と生殖腺(どちらも内分泌組織・器官)の形成機構と生殖腺形成における Shh シグナル作用機序を解明することである。

3. 研究の方法

交感神経と副腎髄質の運命分岐における BMP スwitchングの調節機構

交感神経と副腎髄質の共通前駆細胞は神経堤細胞であるが、この細胞集団内において BMP シグナルの差(交感神経系譜において BMP シグナル低、副腎髄質系譜において BMP シグナル高)が明らかとなる発生段階において、BMP シグナルを制御することが報告されている因子の発現解析(in situ ハイブリダイゼーション法)を、ニワトリ胚で行った。また、神経堤細胞の集団内にて差次的な発現を示した因子については、その機能を解析するために、神経堤細胞へ強制発現ベクターあるいは RNAi 発現ベクターを、in ovo エレクトロポレーション法を用いた。

副腎皮質と生殖腺形成機構の解明と、生殖腺形成における Shh シグナルの作用機序について

副腎皮質と生殖腺の起源を明らかにするために、蛍光色素(PKH)による細胞ラベリングをニワトリ胚で行うとともに、副腎皮質あるいは生殖腺のマーカー遺伝子の発現を in situ ハイブリダイゼーション法により検出した。生殖腺形成と Shh シグナルの関わりを調べる実験においては、Shh シグナル因子群のニワトリ胚内における発現を in situ ハイブリダイゼーション法により検出した。また、Shh シグナルの機能を解析する目的で、ニワトリ胚内にて Shh、HIP、Noggin、BMP4 などの発現ベクターを、in ovo エレクトロポ

レーション法を用いて導入した。

4. 研究成果

交感神経と副腎髄質の運命分岐における BMP スwitchングの調節機構

神経堤細胞集団内において、細胞外分泌因子として BMP リガンドと結合する Crossveinless-2 (Cv2) 遺伝子が、交感神経系譜においては高発現、一方で副腎髄質系譜においては低発現であることを明らかにした。さらに、Cv2 を神経堤細胞において強制発現すると、強制発現細胞が有意に交感神経へと分化することを見出した。この成果は発表論文5で報告している。

副腎皮質と生殖腺形成機構の解明と、生殖腺形成における Shh シグナルの作用機序について

これまでの知見では、生殖腺と副腎皮質は共通の起源細胞(体腔上皮細胞)から生じるとの仮説が、それぞれのマーカー遺伝子の発現をもとに提唱されていた。代表者ははじめに、体腔上皮細胞の構造を詳細に観察したところ、発生の早い時期から体腔上皮が一層ではなく、二層の多層上皮構造を為していることを発見した。これら二層の細胞を別々の蛍光色素にて染め分けることにも成功し、それぞれの細胞集団から由来する組織を調べたところ、頂端側の細胞層(体腔側)からは生殖腺が生じ、一方で基底側(毛細血管側)からは副腎皮質が生じることを発見した。この結果から、生殖腺と副腎皮質の起源となる細胞は、はじめ非常に近接してはいるものの、同一ではないことが初めて示された。副腎皮質と生殖腺の形成機構についての重要な発見であるとともに、これら器官の進化的な成り立ちを推察する上でも重要な発見となった。本研究内容は現在論文投稿中である。

生殖腺形成は、はじめ未分化生殖腺として作られ、その後、オス型、メス型の生殖腺へと性分化することが知られている。性分化機構に関する知見は豊富であるものの、そもそも「生殖腺はどこからどのようにできてくるのか」についてほとんど分かっていなかった。代表者は、生殖腺が由来する体腔上皮細胞の周辺に着目し、体腔上皮に近接する内胚葉(のちに内蔵となる組織)において、分泌型シグナル分子である Shh が発現していることを明らかにした。その作用範囲を特定すべく、Shh シグナルのマーカーである Patched1 の発現を調べると、生殖腺が由来する体腔上皮においてシグナルが認められた。これすなわち、内胚葉から分泌された Shh を体腔上皮が受容していることを意味する。次に Shh の機能を検証すべく、Shh の強制発現(異所的)および Shh の阻害因子である分泌型 HIP の強制発現(同所的)を行ったところ、Shh による異所的な生殖腺形成、HIP による生殖腺の不形成が認められた。この一連の解析から、生殖腺形成における Shh シグナルの必要十分性が示された。また、Shh の下流においては BMP4 シグナルが仲介していることまで明らかに

した。本研究成果は生殖腺形成（誘導）における最初のトリガー機構を初めて明らかにしたものであり、発表論文3にて報告した。

<引用文献>

1. **Saito, D.**, Takase, Y., Murai, H. and Takahashi, Y.: The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. *Science*, 336: 1578-1581, 2012. 査読有 doi: 10.1126/science.1222369. <http://science.sciencemag.org/content/336/6088/1578.long>
5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 7 件)
1. Matsubara, H., **Saito, D.**, Abe, G., Yokoyama, H., Suzuki T., and Tamura, K. Upstream regulation for initiation of restricted Shh expression in the chick limb bud. *Developmental Dynamics* 246: 417-430, 2017. 査読有 doi: 10.1002/dvdy.24493. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.24493/abstract;jsessionid=8F80D3E3A1DF0CB5431992E4AD99B889.f02t02>
2. Seki, R., Li, C., Fang, Q., Hayashi, S., Egawa, S., Hu, J., Xu, L., Pan, H., Kondo, M., Sato, T., Matsubara, H., Kamiyama, N., Kitajima, K., **Saito, D.**, Liu, Y., Gilbert, M.T.P., Zhou, Q., Xu, X., Shiroishi, T., Irie, N., Tamura, K., and Zhang, G. Functional roles of Aves class-specific cis-regulatory elements on macroevolution of bird-specific features. *Nat. Commun.* 8: 14229, 2017. 査読有 doi: 10.1038/ncomms14229. <https://www.nature.com/articles/ncomms14229>
3. Yoshino, T., Murai, H., and **Saito, D.**: Hedgehog-BMP signalling establishes dorsoventral patterning in lateral plate mesoderm to trigger gonadogenesis in

- chicken embryos. *Nat. Commun.* 7: 12561, 2016. 査読有 doi: 10.1038/ncomms12561. <https://www.nature.com/articles/ncomms12561>
4. Seki, R., Kitajima, K., Matsubara, H., Suzuki, T., **Saito, D.**, Yokoyama, H. and Tamura, K.: AP-2 β is a transcriptional regulator for determination of digit length in tetrapods. *Dev. Biol.* 407: 75-89, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2015.08.006. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160615301135>
 5. **Saito, D.** and Takahashi, Y.: Sympatho-adrenal morphogenesis regulated by the dorsal aorta. *Mechanism of Development* S0925-4773(15)30013-30017, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.mod.2015.07.011. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477315300137>
 6. Takahashi, T., Takase, Y., Yoshino, T., **Saito, D.**, Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: Angiogenesis in the developing spinal cord: Blood vessel exclusion from neural progenitor region is mediated by VEGF and its Antagonists. *PLoS One* 10: e0116119, 2015. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0116119. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116119>
 7. Yoshino, T., **Saito, D.**, Atsuta, Y., Uchiyama, C., Ueda, S., Sekiguchi, K. and Takahashi, Y.: Interepithelial signaling with nephric duct is required for the formation of overlying coelomic epithelial cell sheet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 6660-6665, 2014. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1316728111.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. **Saito, D.** Avian primordial germ cell migration in the blood stream. 13th International conference on flow dynamics, Sendai, Japan 10-12, October, 2016. (Invited)
2. **Saito, D.** Avian primordial germ cell migration in the blood stream. "Cell- and tissue communication in organogenesis: cutting edge approaches" The Fondation des Treilles, Les Arcs-Dranguignan, France 21-26, September, 2015. (Invited)
3. **Saito, D.**, Takahashi, Y. Gonad and adrenal cortex derive from different origins within the coelom. 日本発生生物学会第48回大会 (2015年6月2-5日・つくば市)
4. **Saito, D.**, Kidokoro, H., Tamura, K., Takahashi, Y. Avian PGC migration and cell stiffness. 日本動物学会第85回大会 (2014年9月11-13日・仙台市) (口頭発表)

〔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
 齋藤大介 (SAITO, Daisuke)
 東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教
 研究者番号：90403360
- (2)研究分担者
 ()
 研究者番号：
- (3)連携研究者
 ()
 研究者番号：
- (4)研究協力者
 ()