

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07028

研究課題名(和文)最終標的細胞への軸索誘導と特異的な樹状突起部位の認識過程

研究課題名(英文) The process of target recognition within motor columns revealed by in vivo analysis of the behavior of collateral branches arising from the post-crossing segment of dl1-class commissural axons

研究代表者

白崎 竜一 (SHIRASAKI, Ryuichi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：40423149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄のdl1型交連ニューロン軸索による脊髄運動ニューロンの認識は、正中交差後の軸索先端の主成長円錐によってではなく軸索側枝からの終末分枝によってなされ、運動ニューロン樹状突起の細胞体近位部においてシナプスが形成されることが示された。また、dl1型交連ニューロンの軸索側枝による終末分枝形成は体幹筋を支配する運動ニューロン(MMC運動ニューロン)に特異的であることが示された。さらに、運動ニューロンを特異的に欠損している遺伝子改変マウスの解析から、MMC運動ニューロンに特異的に発現している短距離作動性分子がdl1型交連ニューロンの軸索側枝から生じる終末分枝の形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究から、脊髄dl1型交連ニューロンの軸索は解剖学的に脊髄小脳路を構成し小脳虫部に投射していることが知られていたが、脊髄運動ニューロンとの関わりは不明であった。本研究により、脊髄の体幹筋を支配する運動ニューロンもdl1型交連ニューロン軸索の標的細胞であることが示され、dl1型交連ニューロンが小脳虫部と体幹筋を支配する運動ニューロンを回路として結びつける役割を担っていることが明らかとなった。一方で脊髄小脳変性症においては、脊髄小脳路系にも病変が認められる型があることから、本研究の結果はdl1型交連ニューロンの障害でも脊髄小脳変性症に特徴的な運動失調が引き起こされる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We examined the behavior of post-crossing dl1-class commissural axons in mice, using the Atoh1 enhancer-based conditional gene expression system that enables selective and sparse labeling of individual dl1 axons in vivo. For precise identification of spinal motor neurons (MNs), we combined this approach with Hb9 and ChAT immunohistochemistry, together with MN-selective genetic labeling. We found that dl1 commissural neurons developed axonal projection to spinal MNs via collateral branches arising later from the post-crossing segment of these axons. We also found that these collateral branches further gave rise to multiple secondary branches in the region of MNs that specifically innervate axial muscles. Moreover, these axonal branches formed presynaptic terminals on the proximal portion of the MN dendrites. Our findings thus reveal a previously unrecognized projection of dl1 commissural axons that contribute to the ventral spinocerebellar tract in the mammalian central nervous system.

研究分野：発生神経生物学

キーワード：神経回路形成 軸索ガイダンス 標的認識 交連ニューロン 運動ニューロン 軸索側枝 脊髄 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経回路の形成機構を解明しようとする研究領域においては、神経細胞の運命決定から始まる回路形成の初期過程や特異的なシナプス結合に代表される回路形成の最終局面の分子レベルでの理解が大きく進展してきている。しかしながら、その最終局面に至る直前の過程、すなわち軸索が「最終標的領域」に到達してから次に「最終標的細胞」を特異的に認識する過程については、未だにそのほとんどが不明である。本研究課題では、マウスの脊髄交連ニューロンの軸索投射発達をモデルとして、最終標的細胞認識の過程を細胞・分子レベルで明らかにする。

脊髄の交連ニューロンについては、これまでの齧歯類の成熟動物における生理学的・解剖学的な研究により、細胞体の位置や投射先が異なる複数のクラスが知られている。さらに、運動ニューロンの樹状突起上の細胞体近部位には、対側の交連ニューロンからの単シナプス性の結合が存在することが報告されているが、遺伝学的にどのクラスの交連ニューロンに由来しているのかは不明である。一方で胎生期においては、脊髄背側の交連ニューロンの系は軸索ガイダンスの分子・細胞レベルでの理解を牽引してきた主要な回路の一つでもある。このクラスの交連ニューロンは脊髄背側で転写調節因子 *Atoh1* を選択的に発現する神経前駆細胞から生み出されることが知られ、遺伝学的には *d11* 型クラスの交連ニューロンと定義されている。*d11* 型交連ニューロンの回路形成については、特に腹側正中部の底板での軸索の正中交差について、その分子機構の解明が最も進んでいる。正中交差後の過程については、軸索は伸長方向をそれまでの背腹軸から吻尾軸方向へと急激に転換して、底板と運動ニューロンカラムの間の挟まれた領域を吻側へと伸長していくことが知られる。この過程では、軸索は正中部の底板と運動ニューロンの両方から分泌されている *Slit* や *Semaphorin* などの反発分子によって反発を受けていることが知られており、交差後の軸索は運動ニューロンカラム内に侵入できない状態であることが示唆されていた。そのために、正中交差後の *d11* 型交連ニューロンの軸索が、その後の過程で運動ニューロンへと最終的に投射するようになるのかについては、全く不明であった。

そこで本申請者は、この問題に取り組むために *d11* 型交連ニューロンを選択的に分化の初期から可視化させることで、その軸索挙動や形態発達の詳細を回路形成の初期から後期までの長期間に渡り、マウスの個体レベルで捉えることができる実験系を確立させた。これにより我々は最近、*d11* 型交連ニューロンの軸索が正中交差後に吻側に伸長している過程で、軸索の主成長円錐によってではなく、交差後の軸索コンパートメントから軸索側枝を伸長させることで、運動ニューロンカラム内へと軸索側枝を侵入させている現象を見出した(金山ら、2013年、日本神経科学大会)。しかしながら、*d11* 型交連ニューロンの選択的な可視化だけでは、その軸索側枝がどのように運動ニューロンを最終標的細胞として認識しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、マウスの脊髄 *d11* 型交連ニューロンの軸索が正中交差後に、対側の運動ニューロンを最終標的細胞として特異的に認識するようになるのかを明らかにする。そのために、脊髄交連ニューロンだけでなく、運動ニューロンについても *in vivo* で選択的に可視化させる遺伝子発現システムを構築し、その両方を同一個体で同時に運用することで、*d11* 型交連ニューロンの軸索がどのような過程をへて、運動ニューロンカラム内に侵入し最終的に運動ニューロンを認識するのかを明らかにする。さらに、運動ニューロンを特異的に欠損する遺伝子改変マウスを導入することで、運動ニューロンに依存した交連ニューロンの回路形成過程を明らかにし、交連ニューロン軸索による特異的な運動ニューロン認識に関与する分子を探索する。

3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、*Atoh1* を選択的に発現する神経前駆細胞から生み出される脊髄背側の *d11* 型クラスの交連ニューロンに着目しているが、その選択的な可視化には申請者が既に確立させている *Atoh1* の発現制御領域(エンハンサー)と *Cre/LoxP* の遺伝子組換えシステムを組み合わせた遺伝子発現系 (Hara et al., *J. Comp. Neurol.* 2015) を導入する。一方で今回、運動ニューロンを選択的に可視化させる遺伝子発現系を構築するために、脊髄運動ニューロン特異的にその分化の初期から発現する転写調節因子 *Hb9* に着目する。ここでは、運動ニューロンに選択的な発現制御を担う *Hb9* エンハンサーをマウスのゲノムより単離し、*Hb9* エンハンサーの制御下で *Cre* を発現させるベクター (*Hb9::Cre*) を構築し、運動ニューロンを選択的に分化の初期から可視化する。尚、マウスの脊髄交連ニューロンと運動ニューロンを可視化するために、これらの神経細胞が生まれる胎生10日 (E10)~E11.5に子宮内電気穿孔法により遺伝子導入を行う。運動ニューロン選択的な遺伝子発現システムの *in vivo* での有効性は、*GFP* を発現する神経細胞と *Hb9* 抗体を用いた免疫組織化学染色による共発現を指標に評価する。

(2) 交連ニューロンと運動ニューロンの両方を同時に選択的に可視化させるシステムを構築するために、本研究では *Cre/LoxP* などの既存の部位特異的組換えシステムと相互にクロス反応を起こさない部位特異的組換えシステム *VCre/VLoxP* (Suzuki & Nakayama, *Nucleic Acids Res.* 2011) を導入する。具体的には、運動ニューロンの選択的可視化のために、*Hb9* エンハンサーにより運動ニューロン選択的に *VCre* を発現させ、次にこの *VCre* が *VLoxP* の組換えを引き起こすことで、運動ニューロン選択的に蛍光タンパク質が発現されるシステム (*Hb9::VCre/VLoxP-DsRed2*) を構築する。すなわち今回、*Cre/LoxP* と *VCre/VLoxP* の併用により、

交連ニューロンを *Atoh1::Cre/LoxP-GFP* で、運動ニューロンを *Hb9::VCre/VLoxP-DsRed2* (又は *mCherry*) で選択的に可視化させる。交連ニューロンの軸索側枝による運動ニューロン認識の詳細な解析は実験標本を透明化した後に共焦点レーザー走査型顕微鏡により行うが、遺伝子導入された脊髄の実験標本には、交連ニューロンの軸索全長と運動ニューロンの樹状突起を断片化することなく連続的に完全に把握できる2次元展開標本 (Shirasaki et al., Neuron 1995) を用いる。また、運動ニューロンの同定は運動ニューロンに特異的な分子マーカーとして知られる ChAT (Choline Acetyltransferase) や Hb9 の抗体を用いた免疫組織化学染色によっても行う。以上により、交連ニューロンの軸索側枝が運動ニューロンカラム内で、どのような過程をへて、運動ニューロンを最終標的細胞として特異的に認識するのかを明らかにする。

(3) 脊髄交連ニューロンの軸索側枝形成や終末分枝形成における運動ニューロンの役割を直接的に検討するために、運動ニューロンを特異的に欠損する遺伝子改変マウスである *Olig2* ノックアウトマウス (*Olig2* KO マウス) を導入する (Takebayashi et al., Curr. Biol. 2002; Ono et al., Development 2014) (研究協力者の京都府立医科大学の小野勝彦教授より供与)。ここでは、*Olig2* KO マウス胎仔に対して、電気穿孔法により *Atoh1::Cre/LoxP-GFP* システムを遺伝子導入することで交連ニューロンを選択的に長期可視化して、運動ニューロンの欠損が交連ニューロンの軸索側枝形成などにどのような影響を与えるかを解析する。同様の解析は蛍光レーザーの *DiI* で交連ニューロン軸索をラベルした実験標本に対しても行う。また、運動ニューロンへの軸索側枝形成が盛んになるのは E17.5 (金山ら、2013 年、日本神経科学大会) であることから、E17.5 における *Olig2* KO マウスと野生型マウスの脊髄において、DNA マイクロアレイ (affymetrix 社より最近開発された次世代型超高密度マイクロアレイ「*Clariom D Array*」を導入) による網羅的な遺伝子発現解析を行い、*Olig2* KO マウスで発現が消失または減少する分泌性分子あるいは接着性膜分子を、軸索側枝形成や運動ニューロン認識に関与する分子の候補とする。候補分子をスクリーニングする過程において、E17.5 の脊髄で *in situ hybridization* または免疫染色を行い、実際に候補分子が運動ニューロンに発現しているかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) Hb9 エンハンサーと *Cre/LoxP* 遺伝子組換えシステムを組み合わせた遺伝子発現系を構築し、それを電気穿孔法により遺伝子導入することで、脊髄運動ニューロンを選択的に可視化してその形態発達の詳細を解析できる実験系を確立した。この実験系を導入して、脊髄 *dI1* 型交連ニューロンの軸索が正中交差後に吻側に伸長し始める時期から運動ニューロンカラム内で軸索側枝を発達させる時期において、運動ニューロンの樹状突起発達を調べた。その結果、運動ニューロンは樹状突起を最初に背腹軸方向に双極性に発達させ、交連ニューロンの軸索が運動ニューロンへ軸索側枝を伸長させる時期には、腹側へ伸びた樹状突起は正中部の底板付近にまで伸長している様子が観察された。また、交連ニューロンの軸索側枝が運動ニューロンカラム内で盛んに終末分枝を形成させている時期には、運動ニューロンは背腹軸方向だけでなく吻尾軸方向に対しても複雑に発達した樹状突起を有していることが明らかとなった。これらの結果は、これまでに知られていなかった脊髄運動ニューロンの樹状突起発達の初期過程を世界に先駆けて捉えたものであり、今後の回路形成研究での礎となる独自性の高い成果となった (白崎ら、2019 年、第 42 回 日本神経科学大会)。

(2) 本研究で確立させた Hb9 エンハンサーと *Cre/LoxP* による運動ニューロン選択的な可視化技術を、*VCre/VLoxP* システムに導入した遺伝子発現系を構築した。これにより交連ニューロンの軸索側と運動ニューロンの樹状突起側の両方をそれぞれ別々の蛍光タンパク質で選択的に同時に可視化させて解析可能な実験系を確立させることに成功した。この実験系を用いることで、交連ニューロン軸索が正中交差後に運動ニューロンを標的細胞として認識する過程を個体レベルで詳細に解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。交連ニューロンの軸索は正中交差後のしばらくは、軸索の主成長円錐が底板と運動ニューロンカラムの間に挟まれた領域を吻側に伸長しているが、主成長円錐が吻側で運動ニューロンカラム内に侵入すると同期して、尾側の軸索コンパートメントから軸索側枝が運動ニューロンカラム側に出現しカラム内に侵入する。軸索側枝が出現する時、運動ニューロンの樹状突起が交連ニューロンの正中交差後の軸索コンパートメントと相互作用する状況となっている。運動ニューロン内に侵入した軸索側枝は、運動ニューロンカラム内で外側に伸長を続けるが、その軸索側枝の先端は運動ニューロンカラム内に留まる。運動ニューロンカラム内では、体幹筋を支配する運動ニューロン (MMC 運動ニューロン) がある領域選択的に2次的な軸索側枝がさらに出現し、そこで終末分枝を発達させる。その終末分枝は MMC 運動ニューロンの細胞体近傍で機能的なシナプスを形成する (*Synaptophysin* のドット状発現の局在箇所を評価)。運動ニューロンの細胞体近傍での終末分枝形成は、その初期段階から細胞体近傍の樹状突起部位で特異的に進行する。運動ニューロンの細胞体近傍での終末分枝は、胎生期に一過的ではなく、生後動物においても維持させられている。以上により、*dI1* 型交連ニューロンの軸索が運動ニューロンを最終標的細胞として認識してシナプスを形成するまでの過程の詳細を捉えることに成功した。本研究により得られた結果はこれまでになされた多くの研究からは全く予想されてこなかったものであり、回路形成の新たな局面を見出すことにつながった新規性の高い成果となった (金山ら、2017

年、第40回 日本神経科学大会; Kaneyama & Shirasaki, J. Comp. Neurol. 2018)。

(3) d11 型交連ニューロンの回路形成における運動ニューロンの役割を直接的に検討するために、運動ニューロンを特異的に欠損している遺伝子改変マウス (Olig2 KO マウス) を用いて交連ニューロン軸索の挙動を詳細に解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。運動ニューロンが存在しなくても、交連ニューロン軸索の底板での正中交差は形成される。運動ニューロンが存在しなくても、交連ニューロン軸索の正中交差後の軸索側枝が形成される。交連ニューロンの腹側への細胞移動は、運動ニューロンが存在しなくても正常に進行する。MMC 運動ニューロンが存在する領域で生じる軸索側枝からの2次的な側枝(軸索終末分枝)は、Olig2 KO マウスにおいては劇的に減少する。以上の結果から体幹筋を支配する MMC 運動ニューロンは、交連ニューロンの正中交差後に生じる軸索側枝に対して終末分枝形成を誘導する特異的な分子を発現している可能性が示唆された(白崎ら、2019年、第42回 日本神経科学大会)。

(4) 交連ニューロンの軸索側枝による運動ニューロン認識に関わる分子を探索するために、Olig2 KO マウスを用いた DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。本研究では、交連ニューロンの軸索側枝が運動ニューロン認識を進行させている時期である E17.5 において解析を行った。その結果、候補分子として運動ニューロンに特異的に発現している短距離作動性の分泌性分子や膜結合性分子が見出された。現在、これらの分子が交連ニューロンの軸索側枝に対して終末分枝形成を誘導できるかどうかを様々な機能的アッセイ系を導入することにより検討している。今後、Cre/LoxP と VCre/VLoxP システムの併用により交連ニューロンと運動ニューロンの両方を in vivo で可視化させつつ候補分子の機能阻害実験や異所的発現実験を行い、候補分子の役割を個体レベルで明らかにしていく予定である。以上により、d11 型交連ニューロンの軸索側枝による特異的な運動ニューロン認識の分子機構解明を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Takeshi Kaneyama & Ryuichi Shirasaki*. (2018). Post-crossing segment of d11 commissural axons forms collateral branches to motor neurons in the developing spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 526, 1943-1961. [* Corresponding author] (査読有)
DOI: 10.1002/cne.24464

[学会発表](計3件)

白崎竜一、金山武司、竹林浩秀、小野勝彦：脊髄交連ニューロンの軸索ガイダンスにおける運動ニューロンの役割。第42回 日本神経科学大会、2019年。

金山武司、乙部亮介、白崎竜一：脊髄交連ニューロン軸索の正中交差後に生じる軸索側枝による運動ニューロンの認識過程。第40回 日本神経科学大会、2017年。

乙部亮介、金山武司、白崎竜一：小脳核ニューロンの樹状突起発達の初期過程。第39回 日本神経科学大会、2016年。

[その他]

ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/shirasaki/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：金山 武司

ローマ字氏名：(KANEYAMA, takeshi)

研究協力者氏名：乙部 亮介

ローマ字氏名：(OTOBE, ryosuke)

研究協力者氏名：小野 勝彦

ローマ字氏名：(ONO, katsuhiko)

研究協力者氏名：竹林 浩秀

ローマ字氏名：(TAKEBAYASHI, hirohide)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。