

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19590191  
 研究課題名(和文) 脊髄一次求心性線維の標的認識機構に関する新規軸索誘引因子の検索  
 研究課題名(英文) Identification of novel axonal guidance cues in the mouse embryo  
 研究代表者  
 増田 知之 (MASUDA TOMOYUKI)  
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：70372828

## 研究成果の概要：

中枢に向かう脊髄一次求心性線維の軸索は、脊髄背外側部の極めて限局した部位（エントリーゾーン）から脊髄内に侵入する。この現象をもたらす軸索誘引因子の分子実体は未だわかっていない。この分子メカニズムの全容解明を目指し、本研究ではマイクロアレイによる候補遺伝子の検索を実施した。その結果、エントリーゾーンを含む脊髄背側部に特異的な発現を有する遺伝子群の同定に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：神経発生，神経科学，マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

発生初期の脊椎動物胚において、脊髄神経節細胞（DRG）の軸索（脊髄一次求心性線維）は二極性に伸び出し、末梢と中枢の標的組織に向けて伸長することが知られているが、その分子機構はよくわかっていなかった。研究代表者はこれまでに、脊索等の非標的組

織による軸索反発因子がこのガイダンスに重要な役割を果たすこと、およびその分子メカニズムを明らかにしてきた。さらに、最近になって DRG の軸索が脊髄背外側部の中間標的（エントリーゾーン）に向かう現象に、脊髄背側部由来の軸索誘引メカニズムが関与していることを明らかにした

(*Neuroreport* 18, 1645-1649, 2007) .しかしながら , 脊髄背側部由来の軸索誘引因子の分子実体は依然として不明であった .

そこで研究代表者らは , 脊髄背側部から出る軸索誘引因子の実体解明にあたり , レーザーマイクロダイセクション法と cDNA マイクロアレイを用いた領域特異的発現遺伝子のスクリーニング法に着目した . 研究代表者らの検索する軸索誘引因子は , エントリーゾーン近傍の微小領域の細胞によって産生されると予想される . レーザーマイクロダイセクション法を用いれば , エントリーゾーンを含む脊髄背側の細胞群を選択的に切り出すことが可能なため , この領域に特異的な cDNA を得ることが可能となる . 平成 18 年度には , 科学研究費の補助とブレインサイエンス財団の助成を受けて , マウス胚脊髄背側部・蓋板・腹側部から微小切片を回収し , cDNA の調製に成功した . 本研究開始当初の時点では , これらの cDNA を用いて , マイクロアレイによる候補遺伝子のスクリーニングを進める途上であった .

## 2 . 研究の目的

本研究では , 以下の 3 点に焦点を絞り研究を進めた .

(1) すでに調製済みのマウス胚微小領域 (脊髄背側部・蓋板・腹側部) の cDNA を用いて , cDNA マイクロアレイによる解析を行う . 得られたアレイデータを統計解析し , 脊髄背側部における発現量が有意に多い遺伝子を選び出す . ここから得られる知見は本研究を遂行するうえで重要な基盤となる .

(2) 選び出した遺伝子群について , その発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で確認し , エントリーゾーンもしくは脊髄背側部に特異的な発現を有する遺伝子をさらに選抜する . この過程を経ることで , 脊髄背側由来の

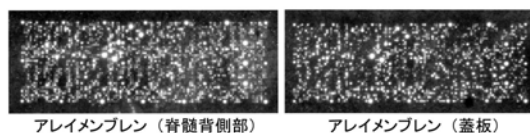
軸索誘引作用に関与する候補遺伝子を絞り込む .

(3) 上記 (2) で選抜した遺伝子群に関して , 興味深いプロフィールと発現様式を有する遺伝子については , 様々な時期と部位におけるその発現様式の詳細な解析を進める .

## 3 . 研究の方法

### (1) cDNA マイクロアレイによる解析

すでに調製済みのマウス胚微小領域の cDNA (脊髄背側・蓋板・腹側の組織由来) を用いて , cDNA マイクロアレイ (かずさ DNA 研究所) による解析を行った . この cDNA マイクロアレイには約 1700 個の未知の長鎖 cDNA クローンが搭載されており , その多くが脳に優位に発現していることから , 脊髄背側部に特異的な発現をもつ未知遺伝子を検索するうえで有用なツールである . 我々は , このアレイによる解析を計 8 回行った (下図参照) .



### (2) アレイデータの統計的解析 得られたデータの選別

アレイ上の全遺伝子について , 領域毎に発現量の平均値を求め , その差を分散分析で検討し , 脊髄背側部における発現量が有意に多い遺伝子を選び出した .

### (3) *in situ* ハイブリダイゼーション法による領域特異的な発現様式の確認

上記 (2) で選抜した遺伝子群について , その発現を胎生 10.5 日のマウス胚脊髄を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法によって確認し , 脊髄背側エントリーゾーン周辺に特異的に発現する未知の遺伝子をさらに絞

り込んだ。

#### (4) 新規遺伝子の発現様式の時間・空間的な解析

興味深いプロフィールと発現様式を有する遺伝子については、マウス胚脊髄および脳におけるその発現様式の推移（胎生 9.5 日から 17.5 日まで）を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって詳細に調べた。

#### 4. 研究成果

マウス胚微小領域の cDNA を用いたマイクロアレイを行い、候補となる遺伝子の絞り込みを行った。さらに、各候補遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で確認し、最終的に脊髄背側部に発現を有する 25 個の新規遺伝子を得た (*Brain Res.* **1249**, 61-67, 2009)。これまで、エントリーゾーンを構成する細胞群に特異的に発現する分子は知られていなかったが、25 個の遺伝子の中にはエントリーゾーンに特異的な発現を有するものもあり、その機能の解明が待たれる。さらに、候補遺伝子の中には遺伝性の神経変性疾患であるハンチントン病に関連した遺伝子 *hip1r* も含まれており、この *hip1r* も含めた 3 つの遺伝子（下図参照）に関しては、マウス胚脊髄および脳における発現様式の推移（胎生 9.5 日から 17.5 日まで）を詳細に調べた。得られた発現様式のデータは、脊髄および DRG の発生メカニズムのみならず、ハンチントン病の詳細な発生機序を調べていくうえでも重要な基礎的知見を与えうると考えられる。



#### 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 5 件)

Tomoyuki Masuda, Nobuyuki Kai, Chie Sakuma, Kazuto Kobayashi, Hisashi Koga, Hiroyuki Yaginuma. Laser capture microdissection and cDNA analysis for identification of mouse KIAA/FLJ genes differentially expressed in the embryonic dorsal spinal cord. *Brain Res.* **1249**, 61-67, 2009. 査読あり.

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Kenta Kobayashi, Kazufumi Kikuchi, Emi Soda, Takashi Shiga, Kazuto Kobayashi, Hiroyuki Yaginuma. Laminin peptide YIGSR and its receptor regulate sensory axonal response to the chemoattractive guidance cue in the chick embryo. *J. Neurosci. Res.* **87**, 353-359, 2009. 査読あり.

Tomoyuki Masuda, Keisuke Watanabe, Chie Sakuma, Kazuhiro Ikenaka, Katsuhiko Ono, Hiroyuki Yaginuma. Netrin-1 acts as a repulsive guidance cue for sensory axonal projection toward the spinal cord. *J. Neurosci.* **28**, 10380-10385, 2008. 査読あり.

Masafumi Kimura, Masahiko Taniguchi, Yoshinori Mikami, Tomoyuki Masuda, Tomoyuki Yoshida, Masayoshi Mishina, Takao Shimizu. Identification and characterization of zebrafish semaphorin 6D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 762-768, 2007. 査読あり.

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Masahiko Taniguchi, Kenta Kobayashi, Kazuto Kobayashi, Takashi Shiga, Hiroyuki Yaginuma. Guidance cues from the embryonic dorsal spinal cord chemoattract dorsal root ganglion axons. *Neuroreport* **18**, 1645-1649, 2007. 査読あり.

〔学会発表〕(計 10 件)

増田知之，渡辺啓介，佐久間千恵，池一中裕，小野勝彦，八木沼洋行．遺伝子欠損マウスと電気穿孔法を用いた脊髄腹側に発現するネトリン-1 の機能解析．第 114 回日本解剖学会全国学術集会，2009 年 3 月 30 日，岡山．

八木沼洋行，西山慶治，増田知之，島田孝子，佐久間千恵．頸髄特異的な早期運動神経細胞死の決定に関与するFoxp1．第 114 回日本解剖学会全国学術集会，2009 年 3 月 30 日，岡山．

増田知之，佐久間千恵，甲斐信行，古閑久佐志，小林和人，八木沼洋行．Laser capture microdissection and cDNA array analysis for identification of mouse KIAA/FLJ genes differentially expressed in the spinal cord. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会，2008 年 12 月 10 日，兵庫．

増田知之，渡辺啓介，佐久間千恵，池一中裕，小野勝彦，八木沼洋行．脊髄腹側の netrin-1 は一次求心性線維に対して軸索反発因子として作用する．日本解剖学会 第 54 回東北・北海道連合支部学術集会，2008 年 9 月 6 日，福島．

増田知之，甲斐信行，佐久間千恵，古閑久佐志，八木沼洋行．レーザーマイクロダイセクション法を用いた，発生初期マウス胚脊髄に発現する分子の検索．第 31 回日本神経科学大会，2008 年 7 月 11 日，東京．

小林憲太，増田知之，高橋将文，宮崎純一，中川匡弘，八木沼洋行，大隅典子，貝淵弘三，小林和人．菱脳運動神経のパターン形成におけるRho/Rho-kinaseシグナル伝達系の役割．第 31 回日本神経科学大会，2008 年 7 月 9 日，東京．

増田知之，佐久間千恵，甲斐信行，古閑

久佐志，八木沼洋行．レーザーマイクロダイセクション法を用いた，発生初期マウス胚脊髄およびその周囲に優位に発現する分子の検索．第 113 回日本解剖学会全国学術集会，2008 年 3 月 29 日，大分．

M. Taniguchi，Y. Mikami，T. Masuda，M. Kimura，T. Yoshida，M. Mishina，T. Shimizu．Identification of a novel semaphoring in zebrafish. 37th Annual Meeting, Society for Neuroscience, 2007 年 11 月 5 日，San Diego, CA, USA.

小林憲太，増田知之，高橋将文，宮崎純一，中川匡弘，八木沼洋行，大隅典子，貝淵弘三，小林和人．菱脳運動神経の回路形成におけるRho/Rho-kinaseシグナル伝達系の役割．第 30 回日本神経科学大会，2007 年 9 月 12 日，神奈川．

谷口雅彦，三上義礼，増田知之，木村昌史，吉田知之，松田尚人，三品昌美，清水孝雄．新規ゼブラフィッシュセマフォリンの同定．第 30 回日本神経科学大会，2007 年 9 月 11 日，神奈川．

〔その他〕

<http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/Profiles/10/000960/profile.html>

本研究は多くの研究支援者によって支えられた．福島県立医科大学医学部神経解剖・発生学講座八木沼洋行教授，同佐久間千恵主任医療技師，同附属生体情報伝達研究所生体機能研究部門小林和人教授には研究全般にわたってご助言とご助力をいただいた．この場を借りて深く御礼申し上げたい．

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

増田 知之 (MASUDA TOMOYUKI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70372828

(2) 研究分担者

甲斐 信行 (KAI NOBUYUKI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50301750

小林 憲太 (KOBAYASHI KENTA)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70315662