

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790193

研究課題名（和文）：三叉神経プラコードの特異性決定機構の新規アプローチと誘導に関する分子機構の解明

研究課題名（英文）：A new approach to determine a mechanism of trigeminal placode specificity and analysis of molecular mechanism of the placode induction.

研究代表者

重谷 安代（YASUYO SHIGETANI）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431773

研究成果の概要（和文）：

ニワトリ神経板の外植片培養によって作製された上皮様細胞群は、神経板境界決定因子 Dlx5 を特徴的に発現する胚性外胚葉と考えられ、Dlx5 は神経堤や前プラコード外胚葉の分子マーカーの発現を非細胞自立的に制御することが知られている。この上皮様細胞群は BMP4 と FGF2 を培養液に加えた場合にのみ形成されることが分かり、この新規神経板外植片培養法はプラコードの段階的形成機構の解明の一助になると考えている。

研究成果の概要（英文）：

Epiderm-like cells that are made from a chicken neural plate explant are the embryonic ectoderm characteristically expressing a neural plate border specifier Dlx5, which non-cell autonomously controls the border of the neural crest and the pre-placodal ectoderm. The epiderm-like cells can be formed only when BMP4 and FGF2 are added into the medium of the explant, and this neural plate explant culture system would help to elucidate a stepwise induction and differentiation mechanism of the placode in the embryo.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：プラコード形成

## 1. 研究開始当初の背景

三叉神経は、顔面の知覚と顎の咀嚼運動を司り、脊椎動物全般の頭部において重要な機能を果たす。三叉神経は二つの独立した神経葉である眼神経と上下顎神経によって成立し、共に感覚神経プラコードと神経堤細胞に由来する細胞群から構成される。三叉神経の初期形成に関する研究はニワトリ胚について最も良く解析されており、頭部外胚葉上の肥厚として認められる三叉神経眼プラコードの誘導には、それが隣接する神経管に由来する分泌因子を必要とすることが示された。その後10年間余、分子の実体を解明するべく研究がなされてきたが、真実を現すような報告はされてこなかった。

最も初期に発現する三叉神経プラコードの特異的分子マーカーとして *Brn3a* と *Pax3* が知られている。予備的実験からニワトリ胚における三叉神経プラコードを標識する *Brn3a* 発現は異所性 FGF8 によって抑制され、それは FGF8 経路の抑制因子である *Sprouty2* の優性阻害型によっても同様の結果を導いた (未発表)。一方で、プラコードは早期の段階で神経板と表皮外胚葉の移行部分に形成される前プラコード外胚葉 (Pre-Placodal Ectoderm: PPE) を起源とするという新しい概念が打ち出された。しかし、下垂体 (h)・鼻 (n)・眼 (l)・三叉神経 (t)・耳 (o)・上鰓 (e) の各プラコードの特異性は PPE において既に決定しているかどうかは定かではない。これに関連し、*in vitro* 実験で神経板から PPE 様構造に分化させるには FGF2 が必要条件とされ、神経板外植片に BMP4 と FGF2 を作用させると形態学的な単層扁平上皮構造と、それに続く *Pitx2* (h+n+l)、*Pax6* (n+l)、*Msx1/2* (n+l)、*Pax3* (t) 発現を引き起こす (BMP4 単独だと神経堤を誘導し、FGF2 単独だと耳と上鰓プラコード特異的分子マーカー *Pax2* や *Gbx2* を発現する) (東北大・若松、私信)。これは外植片培養による PPE 構造が下垂体・鼻・眼・三叉神経に分化するコンピテンスを持っていることを示唆している。これに先述の FGF8 の *Brn3a* に対する作用を合わせて考えると、PPE 形成過程において「FGF2 があり FGF8 がない」状態が三叉神経プラコードの特異性決定に必要なのではないかと想像される。

中枢神経系に発現する FGF2 と FGF8 が PPE の領域特異性に関わっていると、頭部外胚葉上に起こる三叉神経プラコードの誘導には、中枢神経系に由来する何らかの分泌因子が依然として必要であり (Stark et al, 1997)、その分子機構を見いだすために頭部外胚葉の全長 cDNA ライブラリーを用いて受容体型の未知関連遺伝子の同定を

するのである。

## 2. 研究の目的

- ① 前プラコード外胚葉 (PPE) における FGF8 シグナル経路の三叉神経プラコード特異性決定における役割
- ② 頭部外胚葉由来の全長 cDNA ライブラリーを用いた受容体型未知関連遺伝子の同定とその機能

## 3. 研究の方法

胚体外実験を用いた PPE における FGF8 シグナルの検証には、抑制効果として FGF8 に対する antisense morpholino oligonucleotide を神経板に電気穿孔法で導入し、あるいは過剰効果として FGF8 リコンビナントタンパク質を作用させ、プラコード特異的分子マーカーの発現を調べる。これら手法によって作製した PPE を胚体内の予定三叉神経プラコードと交換移植し、特異性決定に関する検証をする。さらには胚体内起源の外科的除去によって FGF8 シグナルの PPE に対する効果を確認する。未知関連遺伝子を同定するためには、ニワトリ神経胚の頭部外胚葉由来の全長 cDNA ライブラリーから受容体型遺伝子を選出し、発現解析によるスクリーニングと、三叉神経において GFP を産生するトランスジェニックゼブラフィッシュ胚を用いた機能欠失によるスクリーニングを実施する。選別された遺伝子は、ニワトリ胚において改めて機能欠失を行う。

### ① 三叉神経プラコード特異性決定における FGF8 の役割の検証

形態学的ニワトリ三叉神経プラコードは後期神経胚のステージ 11 で観察され、直後に脱上皮化を開始する。この時期の三叉神経プラコード特異的分子マーカー *Brn3a* と *Pax3* 発現は、中脳近傍の頭部外胚葉に観察される。この発現について発生を遡って観察すると、ステージ 9 で前脳後方から後脳に至る PPE に到達する。この発現は、前神経隆起に発現する *Fgf8* や、後脳前方に発現する *Fgf8* や *Fgf3* と前後軸上で相補的なパターンとして観察される (未発表)。FGF8 が *Brn3a* に標識される三叉神経プラコードの形成に対して抑制的に働くのであれば、PPE における三叉神経プラコードとしての特異性が FGF8 によって定められている可能性がある。そこで、神経板を用いた外植片培養を用いて FGF8 の三叉神経プラコード形成に関わる影響を調べる。既にステージ 6-7 の頭部神経板の medial plate を外科的に採取して BMP4 と FGF2 で処理を

すると、*Pax3* 陽性のPPE様構造が得られることが分かっているため、**1) PPE様構造が三叉神経プラコード特異的分子マーカー***Brn3a*、*Ngn2* を発現することを確認する。**2) FGF8** の抑制効果を見るために、*Fgf8* に対する antisense morpholino oligonucleotide (MO) を予め神経板に電気穿孔法により導入しておく<sup>\*1</sup>、各種分子マーカーの発現を確認する。**3) 過剰効果を見るために、FGF8** リコンビナントタンパク質を培地に入れ作用させてその影響を調べる。<sup>\*1</sup>MOがうまく働かない場合は siRNAに変更する。

### **②【胚体内】三叉神経プラコード特異性決定におけるFGF8の役割の検証**

計画①項の作用を胚体内で確かめる実験として、**1) 作製したウズラPPE様構造の外植片**をニワトリ神経胚の頭部外胚葉に異所性に移植し、三叉神経の構造を観察する。ウズラ特異的抗体QCPN、三叉神経感覚成分を染色する抗体parvalbumin、神経細糸関連タンパク質抗体 3A10 等を使用する。**2) 作製したウズラPPE様構造にFGF8** を抑制/過剰発現させたものをニワトリ胚の予定三叉神経プラコード領域の頭部外胚葉へ交換移植する<sup>\*2</sup>。あるいは他の予定プラコード領域へも試み、プラコードの特異性が確定的であるかどうかについて検証する。**3) 内在性PPE形成**に関与するFGF8、FGF2の胚体内起源の探索を行う。それぞれに対するMOをステージ6-7の神経板に電気穿孔法で導入する、あるいはそれらが発現する領域の外科的除去を行い、その後の三叉神経プラコードへの影響を調べる。<sup>\*2</sup>交換移植がうまくいかない場合は、既に成功している外胚葉下への異所性移植を行う（東北大・若松、私信）。

### **③三叉神経プラコード誘導に関わる候補遺伝子プロファイルの作製**

ニワトリ神経胚の三叉神経プラコードが形成される領域の頭部外胚葉を用いて作製した全長cDNAクローンのアノテーション作業の（現時点での）結果、神経もしくは表皮外胚葉に発現する遺伝子（*tubulin-a1*、*ELAV*、*Keratin19* など）、形態形成関連と思われる遺伝子（*Crx*、*embryonic ectoderm development*、*zinc finger* など）、疾患関連遺伝子（Bardet-Biedl 症候群、Sjögren 症候群、Sprit hand/foot malformation type 1 など）、既知のESTクローン以外に相同性のない未知遺伝子、これらが全体の30%を占めており、この中から三叉神経プラコード形成に関わる遺伝子を探す。方法は、配列から膜貫通型受容体候補遺伝子を選出し、かつ *in situ* hybridization 法により発現解析を行って PPE や三叉神経プラコードに発現を持つ遺伝子の選別作業を行う。

### **④三叉神経プラコード誘導に関わる遺伝子の機能スクリーニング**

*HuC-GFP*および $\alpha$ -actin GFP系統のトランスジェニックゼブラフィッシュ胚（1細胞期）に計画③項の候補遺伝子の合成 antisense RNAを注入し<sup>\*3</sup>、14-24時間後に三叉神経（プラコード）における影響を観察して、機能スクリーニングを実施する。 $\alpha$ -actin GFP系統では三叉神経プラコード細胞においてGFP蛍光タンパク質が産生されるため、三叉神経プラコード形成における候補遺伝子の影響を調べることができる。一方で*HuC-GFP*系統では原始神経細胞がGFP陽性となるため、インターナルコントロールとして他の頭部神経における影響を排除する目的で使用する。機能スクリーニングのポジティブコントロールとしてはニワトリ*Pax3*、*Brn3a*、*Ngn2* 遺伝子を用いる。ニワトリ遺伝子の機能スクリーニングにゼブラフィッシュ胚を用いることで、ニワトリのみを用いた場合よりも実験効率を上げることができる。またゼブラフィッシュのみを用いた実験と比べても少ない倍数体の遺伝子が対象となるため扱う遺伝子の数を増やさずに済む。

<sup>\*3</sup>遺伝子ソースの代替として、ゼブラフィッシュ胚の「感覚神経」遺伝子カタログ、ヒトゲノムデータベースの「分泌因子」と「神経胚」に共通な遺伝子カタログの利用が控えている。

### **⑤三叉神経プラコード誘導に関わる遺伝子の機能欠失**

計画③項の候補遺伝子プロファイル作製と④項の機能スクリーニングを継続しつつ、目的遺伝子が同定できたら、順次ニワトリ胚においてMOあるいはsiRNAを用いた機能欠失実験を行い、遺伝子機能について検討する。

## 4. 研究成果

脊椎動物の頭部外胚葉上に形成される三叉神経プラコードには独特な誘導機構が存在すると考えられている。当研究は関与の示唆される既知FGF8シグナル経路の役割についての解析と未知関連遺伝子の同定を試み、未踏分野である三叉神経プラコードの誘導機構の解明を目指す。

ニワトリ三叉神経プラコード誘導におけるFGF8経路の効果を以下の3つの方法によって検証した。

- 1) FGF8リコンビナントビーズの移植実験
- 2) *Sprouty2*の優性阻害型コンストラクトの電気穿孔法による導入実験
- 3) 中脳峡部isthmusの除去実験
- 4) 神経板外植片培養法を用いた実験

まず、FGF8リコンビナントタンパク質をしみ込ませたビーズをニワトリ胚頭部外胚葉直下へ異所性に移植すると、感覚神経細胞は三叉神経プラコード特異的分子マーカー

*Brn3a*によって標識されるのだが、ビーズ周辺における*Brn3a*発現は抑制された。これについてFGF8シグナル抑制因子Sprouty2の優性阻害型コンストラクトを用いて細胞自立的作用を確認しても同様の結果が得られた。一方でFGF8の供給源となっている峡 isthmus の除去実験を行うと、頭部外胚葉上の*Brn3a*と*Pax3*発現は増強された。つまり峡に発現するFGF8が頭部外胚葉上に発生する三叉神経プラコードの誘導と分化に抑制的に働くことが示唆された。

峡でFGF8発現が始まる胚発生段階は、頭部外胚葉上に形態学的三叉神経プラコードが観察される時期や*Brn3a*が発現し始める時期よりも早く、予定プラコード外胚葉(PPE)の形成時期よりも遅い。つまりプラコードの特異性決定はPPE形成の後に起こることが想定された。そこで神経板外植片培養法を用いて三叉神経プラコードの特異性形成に関わるFGF8の効果について調べることに時間的矛盾はないと思われた。まず神経板にBMP4とFGF2を作用させて培養すると、上皮細胞形態を示し、頭部前方に特徴的な遺伝子群を発現する(*Six1*, *Pax3*, *Pax6*, *Pitx2*ほか)。BMP4とFGF2に加えFGF8を作用させても、BMP4とFGF2を作用させた場合と比較して、形態的に大きな変化は見られず、FGF8を加えた場合にのみ若干の線維芽細胞様の細胞が混在している様子が観察された。なお、BMP4とFGF8を作用させた場合には、線維芽細胞様の細胞が生じるため、上記細胞の混在はその効果を見ているものと思われた。

次に、BMP4とFGF2とFGF8を作用させた神経板外植片由来の上皮様細胞群における三叉神経プラコード特異的遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより調べたところ、*Pax3*発現に関しては、N2サプリメントのみを培養液に加えたコントロールと比較し、BMP4とFGF2を加えた細胞群では1/4に減少し、BMP4とFGF2とFGF8を加えた細胞群ではその1.5倍に増加(N2コントロールと比較して1/2.4に減少)する結果となった。さらに*Brn3a*発現に関しては、N2コントロールと比較してBMP4とFGF2を加えた細胞群では2倍に増加し、さらにBMP4とFGF2とFGF8を加えた細胞群ではその1.5倍(N2コントロールに比して3倍)に増加する結果となった。

さらに中枢神経系でFGF8の上流に存在し、かつ三叉神経プラコード形成に共働作用するらしいという報告のある古典的Wnt経路(Canning et al, 2008)の阻害を、*Axin*遺伝子の発現獲得実験により試みた。その結果、古典的Wnt経路を阻害してBMP4とFGF2を

用させた神経板外植片は、古典的Wnt経路を阻害しないでBMP4とFGF2を作用させた神経板外植片と比較して、三叉神経プラコードマーカー*Pax3*と*Brn3a*の1/2の発現量減少が認められた。

以上のように、三叉神経プラコード形成におけるFGF8シグナル経路の働きを調べるために、頭部外胚葉上においてFGF8シグナルを促進させると三叉神経プラコード分子マーカー*Pax3*および*Brn3a*の発現は抑制された。しかしながら、神経板を用いたFGF8シグナル経路を調べると逆で、むしろ促進された。なお同システムで古典的Wntシグナル経路も正方向に関わっているらしいことから、三叉神経プラコード特異性形成において、中枢神経系に対してはFGF8シグナル経路も古典的Wntシグナル経路も正方向に働くことが考えられた。しかし個々の作用は小さいため、同時に働く必要があるのかも知れない。そして頭部外胚葉上のFGF8シグナル経路の作用は、中枢神経系のそれとはまた別の機構に基づくものなのかも知れない。

なお、神経板外植片培養によって作製された上皮様細胞群において、三叉神経プラコードマーカーに加え、神経板外縁に発現する分子マーカー*Dlx5*, *Six1*, *Eya2*の発現を調べたところ、N2コントロールと比較し、*Dlx5*の10倍の増加、*Six1*/*Eya2*の数倍の発現量の増加が観察された。最近の知見では、*Six1*は*Eya2*と複合体を形成し、*Six1*エンハンサー領域に*Dlx5*結合部位の存在することが示されており、また胚体内の神経板—頭部外胚葉境界における*Dlx5*は最初に発現することが分かっている(重谷、私見)。従って、神経板外植片培養により作製した上皮様細胞群は、前プラコード外胚葉(PPE)そのものというよりはむしろ、その上流で*Dlx5*を特徴的に発現する頭部外胚葉の特徴を備えていると考えられた。

それではこの上皮様細胞群において*Dlx5*に応答する下流遺伝子群の発現はどうなっているのだろうか。本来ならば*Dlx5*は神経板境界の胚性外胚葉に発現しており、非細胞自立的に神経板境界遺伝子群の発現を制御する(McLarren et al, 2003)。*Dlx5*を発現する胚性外胚葉は神経板マーカー*Sox2*を抑制し、自身は頭部では部分的にPPEが形成され、やがては表皮になる運命のはずである。

実際st7胚の神経板外植片由来の上皮様細胞群では、神経板境界決定因子*Dlx5*の19倍の増加が認められた上に、胚性外胚葉マーカー*GATA3*の7倍の増加、初期表皮マーカー*keratin19*の3倍の増加、神経堤マーカー*Slug*の7倍の増加、神経板マーカー*Sox2*

の 1/7 の減少、が認められた。Dlx5 が神経板境界決定因子として、神経堤と頭部外胚葉、そして神経板のこれらの境界を位置付けていること (McLarren et al, 2003) を考えると、神経板から上皮様細胞への形態的变化に伴い Dlx5 発現が増加され、その下流の頭部外胚葉マーカーの発現量の増加、同じく下流で神経板マーカーの発現量の減少は理にかなう結果となった。また前出の PPE マーカー遺伝子群も間接的に発現促進されているものと考えられた。なお、胚体内では神経堤マーカー *Slug* が抑制されたにも関わらず (McLarren et al, 2003)、本研究の上皮様細胞群では発現量が増加したことに関しては、幾らかの heterogeneity が生じていることに起因すると考えている。

以上、神経板外植片培養によって作製された上皮様細胞群は、神経板境界決定因子 Dlx5 を特徴的に発現する胚性外胚葉であると結論付けた。この神経板培養法を利用することで、神経堤—PPE 前駆体形成がどのような環境で誘導されるのか、そして段階的なプラコード形成機構の解明の一助になると考えている。

そして、本研究によって新たに頭部プラコード領域に発現の確認された *Sprit hand/foot malformation type 1* や *embryonic ectoderm development* などの遺伝子群は、今後の頭部プラコード研究において特異的分子マーカーとして有用であるばかりでなく、初期発生における機能の解析を行うことで新たな研究領域が開拓される可能性を秘めている。

#### 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 2 件)

- ① Yasuyo Shigetani, Masataka Okabe. Development of a new culture method for a precursor to the neural crest and pre-placodal ectoderm. *Neurosci Res* 査読無、71 巻、2011、e124.
- ② Yasuyo Shigetani. Mechanisms of ganglion formation involving trigeminal crest cells. *Neurosci Res* 査読無、61 巻、2008、S84.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 重谷 安代、岡部正隆. 新規培養法による神経堤細胞と前プラコード外胚葉に共通する前駆体の誘導. 第 117 回 日本解剖

学総会・全国学術集会、2012 年 3 月 25 日、甲府

- ② Yasuyo Shigetani, Masataka Okabe. Development of a new culture method for a precursor to the neural crest and pre-placodal ectoderm. 第 34 回 日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜

- ③ 重谷 安代. 新規アプローチによる三叉神経プラコードの誘導機構に関する分子機構の解明. 第 88 回 日本生理学会大会 / 第 116 回 日本解剖学会総会・全国学術集会、2011 年 3 月 28 日、横浜

- ④ 重谷 安代. ヘテロトピーと顎の進化発生学、東京大学海洋研究所 共同利用シンポジウム「水生生物の異時性に関する研究。現状の把握と今後の展望」、2009 年 11 月 9 日、東京

[図書] (計 1 件)

- ① 重谷 安代、他、朝倉書店、生命科学概論 -環境・エネルギーから医療まで-、2012、52-60.

[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  
<http://www.okabelab.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重谷 安代 (SHIGETANI YASUYO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431773

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者