

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08454

研究課題名(和文) 初期嗅覚回路形成における嗅ブラコード由来移動細胞の役割

研究課題名(英文) Early migratory neurons from the olfactory placode are putative guidepost cells in the initial formation of the olfactory nerve tract

研究代表者

村上 志津子 (MURAKAMI, Shizuko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤助教

研究者番号：20255649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：嗅ブラコード上皮から初期に移動する未熟ニューロンと嗅神経路形成との関係を調べた。ニワトリ3日胚では嗅ブラコード由来移動細胞が上皮と終脳をつなぐ細胞索を形成する。初期細胞索の物理的破壊は嗅神経路形成を阻害した。蛍光トレーサーなどを用いたブラコード上皮標識実験では、2.5日胚標識細胞は4.5-6日胚の嗅神経と終脳の結合部に集合したが、3.5日胚標識細胞は集合しなかった。初期に移動する嗅ブラコード由来細胞は嗅神経路形成のガイドポストとして機能す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

嗅神経伸長前に嗅ブラコード上皮から細胞が終脳に向かって移動し、細胞塊を形成する現象は多くの動物で観察されているが、その役割は明らかでない。本研究によって、初期の嗅ブラコード由来移動細胞は嗅神経路形成に必須の細胞構造を形成することが判明し、さらに嗅神経と終脳の結合を決めるガイドポストとして機能する可能性が示された。これらは、嗅覚発生における新規の知見であり、初期の嗅覚回路形成機構における新しい概念を提示している。

研究成果の概要(英文)：The early developing olfactory placode (OP) generates the olfactory sensory neurons (OSN), as well as other neuronal cells, which migrate from the OP into the mesenchyme. In chick embryos, the early migrating cells from the OP which express polysialic acid, an immature neuron marker, form the cellular cord extending from the placode to the telencephalon at embryonic day (E) 3. The physical destruction of the cellular cord induced a lack of OSN axon innervation of the olfactory bulb and the entry of the GnRH neurons into the forebrain. Dil application or GFP electroporation into the OP at E2.5 revealed that the OP-derived early migratory cells accumulated in the region close to the olfactory nerve-olfactory bulb junction at E4.5-6. In contrast, the cells labeled at E3.5 did not form a cluster in this region. These results suggest that the OP-derived early migratory neurons may act as guidepost for the initial formation of the olfactory nerve tract.

研究分野：神経発生学

キーワード：嗅ブラコード 嗅神経 嗅覚回路 ニューロン移動 ガイドポスト細胞 GnRHニューロン ニワトリ胚

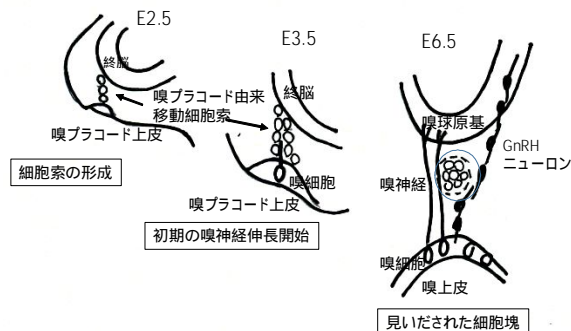
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

におい情報の受容と情報処理に関わる嗅覚神経路は、嗅上皮に分布する嗅細胞の軸索である嗅神経が終脳先端部の嗅球とシナプスを形成する神経回路からはじまる。発生過程において、嗅神経の投射が損なわれると嗅球の構造は形成されない。嗅球に投射した嗅神経と嗅球ニューロンとの神経回路形成については、誘引性・反発性の軸索ガイダンス分子の作用など多くの研究があるが、初期の嗅神経がどのようにして終脳の嗅球原基と結合するのか、その過程と投射メカニズムはわかっていない。

嗅細胞は表皮外胚葉の肥厚である嗅プラコード(鼻プラコード)から発生する。嗅プラコード上皮は嗅細胞だけでなく、間葉組織中へ移動する多くの細胞を生み出すことが知られており、その一部は視床下部へ移動し生殖機能を司る GnRH ニューロンとなる。ニワトリ胚では GnRH ニューロン移動が開始される以前に、嗅プラコード上皮から未熟ニューロンマーカーのポリシアール酸 (PSA) を発現する移動細胞が上皮と終脳間に細胞索を形成することが報告されていた (Miyakawa et al., 1997)。一方、GnRH ニューロンの移動現象をニワトリ胚で調べる過程で、6 日胚の嗅球原基近くに神経線維のマーカー蛋白抗体に染まらない細胞塊を見いだした。移動中の GnRH ニューロンは細胞塊を避けて内側に向かい、伸長中の嗅神経も細胞塊の中には進入しない(図 1、未発表)。その空間的位置関係から、発生初期に形成される細胞索の一部である可能性を考えた。嗅神経路にあることから、この細胞群は嗅神経の投射や GnRH ニューロン移動におけるガイドポスト細胞として機能するという仮説を想定した。

図1 ニワトリ胚における鼻と脳の発生過程



2. 研究の目的

発生初期に嗅プラコード上皮から移動する細胞は、初期の嗅神経投射や GnRH ニューロン移動と脳への進入におけるガイドポストとして機能するという仮説の検証を行うために、上皮と終脳間に形成される細胞索の組織学的観察、初期細胞索の構造破壊実験による嗅神経伸長への影響およびプラコード上皮細胞の標識と追跡による移動動態と予定運命の解析を行う。これらによって、初期嗅覚回路形成における嗅プラコード由来移動細胞の役割解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚における初期嗅プラコード由来移動細胞の形態学的解析

嗅プラコード上皮と終脳間に形成される嗅プラコード由来移動細胞索の三次元像

発生初期において嗅プラコード上皮と終脳は近接しているが、発生進行に伴って両者の相対的位置関係は著しく変化する。プラコード上皮と終脳間で形成される PSA 陽性細胞索の全体構造を理解するために、ホルマウント標本の三次元像による観察を行った。2.5 日胚から 3.5 日胚までの頭部ホルマウント標本による蛍光多重免疫組織化学染色の後、透明化処理を施し、ライトシート顕微鏡による三次元像を観察した。細胞索は PSA 抗体で、プラコード上皮と細胞索および細胞索と終脳の境界は基底膜マーカーのラミン抗体で検出した。

初期細胞索と嗅神経軸索構造との関係

電子顕微鏡レベルでニワトリ 4.5 日胚に嗅神経の軸索構造が観察されることから (Mendoza et al., 1982)、3 日胚のプラコード上皮と終脳をつなぐ細胞索は、移動細胞とその突起で構成されていると考えられる。一方で、神経線維マーカーの発現パターンから、3 日胚の細胞索構造を嗅神経とした報告もある (Drapkin and Silverman, 1999)。発生期の嗅神経特異的マーカーはなく、神経線維マーカーでは未熟ニューロンである移動細胞の神経突起との区別はつかない。初期細胞索は初期の嗅神経伸長に先立って形成される構造なのかどうかを確認するために、初期細胞索を電子顕微鏡で観察した。

(2) 初期細胞索の物理的破壊実験

嗅神経の終脳投射に初期細胞索が重要な役割を果たしている可能性を調べるために、3 日胚の嗅プラコード由来移動細胞索の破壊実験を行い、6-6.5 日胚で嗅神経伸長や GnRH ニューロン移動に対する影響を免疫組織化学的に調べた。嗅プラコード上皮と終脳の間を埋める間葉組織に先端の細いガラス管を挿入し、間葉組織を終脳方向へと押し進めて細胞索構造の物理的破壊を行った。

(3) 初期の嗅プラコード由来移動細胞の標識と追跡実験

蛍光トレーサー Dil 標識による解析

嗅プラコード上皮からの細胞移動は 2.5 日胚から 7 日胚にかけて連続的に生じる。初期細胞索形成に関与する 2.5 日胚のプラコード上皮に脂溶性蛍光トレーサー Dil の結晶を静置し、移動

細胞の動態を経時的に6日胚まで追跡した。標識された移動細胞の配置を三次元的に調べるために、透明化処理を施した頭部ホルマウント標本をライトシート顕微鏡で観察した。DiI 結晶投与は上皮細胞の累積標識になる可能性があることから、3.5日胚のプラコード上皮標識を行い、標識細胞の移動動態を2.5日胚投与群と比較した。

GFP 遺伝子導入による標識と解析

6-6.5日胚で観察された嗅球原基近傍の神経マーカーに染まらない細胞塊と初期の嗅プラコード由来移動細胞との関連性を調べるために、エレクトロポレーション法を用いてGFP発現ベクターを嗅プラコード上皮に導入した。2.5日胚のプラコード上皮を標識し、経時的に6日胚までGFP発現細胞の分布を調べた。さらに、3.5日胚のプラコード上皮を標識し、6日胚の嗅球原基近傍におけるGFP発現細胞の分布について、2.5日胚標識群と比較した。

チミジンアナログ投与による標識と解析

最終分裂した細胞を強く標識するチミジンアナログのプロモデオキシウリジン (BrdU) や EdU による誕生日時細胞標識は標識細胞を長期にわたって追跡できる。プラコード上皮からの細胞移動開始前後の2.5日胚でEdUを投与し、6日胚および嗅球の糸球体構造が明瞭となる11.5日胚で、EdU標識細胞の分布を比較し、早期誕生の嗅プラコード由来移動細胞が嗅神経路の特定部位に配置し、定着する可能性について調べた。

4. 研究成果

(1) 嗅プラコード由来移動細胞索の三次元像

透明化処理を施したホルマウント標本のライトシート顕微鏡による観察から、ニワトリ胚のHH15(HH; Hamburger and Hamilton stage)において嗅プラコード上皮(OP)直下の間葉組織中に少数のPSA陽性細胞が認められた(図2A、矢印)。HH17になるとプラコード上皮から移動したPSA陽性細胞が小塊を形成した(図2B、矢印)。HH18ではPSA陽性細胞の小塊は近接する終脳(TEL)を包むように広がり、終脳先端方向に細胞集団が帯状に伸びていき(図2C、矢印)、その先端ではPSA陽性線維が盛んに伸長していた(図2C、矢頭)。これらの神経突起の一部はすでに終脳と接触している。発生進行と共にプラコード上皮と終脳間の距離は離れ、それに伴って細胞索も長く伸び、嗅神経束に近似した形態を示した(図2D、矢印)。細胞索先端では、PSA陽性線維の突起が終脳表面に網目状に広がり、PSA陽性細胞が分散していた。細胞索と終脳との接触領域は後の嗅神経投射領域に相当すると考えられる。

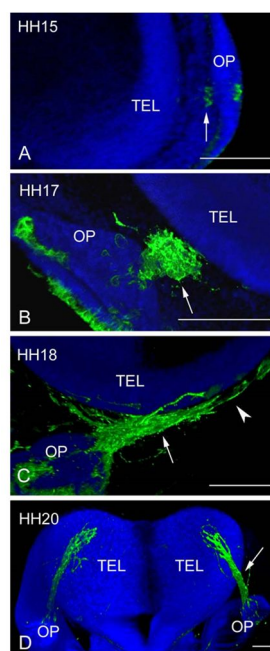


図2 プラコード上皮と終脳をつなぐPSA陽性細胞索の形成過程
スケール 200µm

(2) 初期細胞索の電子顕微鏡による観察

未熟ニューロンで構成されるプラコード上皮と終脳間の細胞索について、HH18、HH21、HH25の各時期に電子顕微鏡で観察した結果、HH18細胞索の細胞間には未熟な微小管とリボソームを含む細胞突起構造が1から2本程度観察された。また、細胞索先端には成長円錐が観察された。HH21になると、細胞間の線維構造の数は増加し、細胞同士の間隔が広がった。線維の内部構造はHH18と同様に未熟な微小管やリボソームを含んでいた。一方、この時期、分泌顆粒を含む線維構造もしばしば認められた。HH25になると、Mendozaらの知見と一致して、微小管とニューロフィラメントを持つ軸索の束が移動細胞に付随して観察された。基底膜から出て行く軸索の束も認められた。以上の結果から、嗅神経の軸索構造は少なくともHH25から観察されることから、HH18における初期細胞索の形成は初期嗅神経の伸長に先立つことが示された。

(3) 初期細胞索の物理的破壊による嗅神経路形成の障害

極細ガラス管を用いてHH18の右側細胞索の破壊を行ない、3日後で調べると、細胞索破壊側において嗅上皮(OE)は正常であるが、伸長した嗅神経(ON)や移動中のGnRHニューロン(図3、茶色の細胞)は間葉組織中に集塊を形成し、前脳(FB)に到達していなかった(図3、矢印)。プラコード上皮と終脳をつなぐ初期の嗅プラコード由来細胞索は嗅神経路形成とGnRHニューロンの脳内進入に必須の構造であることを示す結果であり、細胞索を形成する初期の

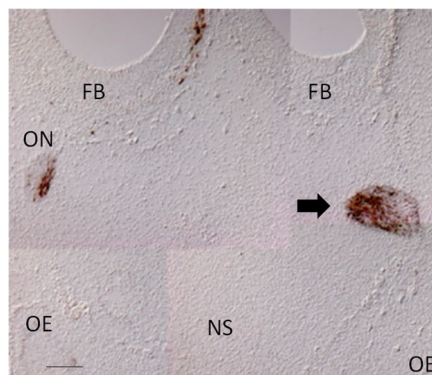


図3 初期細胞索を物理的に破壊された6日胚の嗅覚-前脳領域
スケール100µm

嗅ブラコード由来移動細胞の重要性が確認された。

(4) 初期の嗅ブラコード由来移動細胞は細胞索と終脳の接点で集塊を形成する

初期の細胞索構造が嗅神経路形成に必須であることが判明したが、構成要素である初期の嗅ブラコード由来移動細胞の動態は明らかでない。HH13 に DiI 蛍光トレーサーでブラコード上皮を標識し 24 時間後の HH17 に観察すると、ブラコード上皮直下の PSA 陽性細胞索に標識細胞を認めた。HH16-17 で標識し、18 時間後の HH19 で観察すると、ブラコード上皮から移動した DiI 標識細胞の小塊と、その細胞集団から離れて終脳方向へ移動する少数の標識細胞が確認された。嗅ブラコード上皮からの初期の細胞移動は、上皮細胞が間葉組織へ転移し小塊となって移動する神経堤細胞の集団の細胞移動に似ている。

2.5 日胚 (HH14-16) での DiI 標識細胞を経時的に追跡すると、3.5 日胚 (HH23) では細胞索に小塊状の半連続的なつながりとして分布し、4.5 日胚 (HH25) になるとまばらな小塊の連なりと共に終脳近傍に集塊が形成された (図 4A、矢印)。一方、3.5 日胚 (HH21) でのブラコード上皮標識では、4.5 日胚 (HH25) において DiI 標識細胞は列状に分布し、終脳近傍に集塊は認められなかった (図 4B、矢頭)。6 日胚 (HH28) で解析した場合も同様の結果であった。HH25 は電子顕微鏡レベルで嗅神経の軸索構造が観察される時期であり、同時期に形成される初期ブラコード由来移動細胞の集塊は、初期嗅神経の終脳投射に関与する可能性が考えられる。

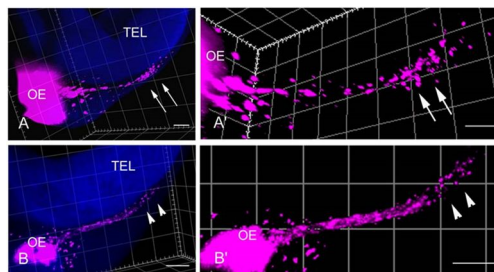


図4 DiI標識された嗅ブラコード由来移動細胞の4.5日胚における分布
A-A' : HH14/15標識、B-B' : HH21標識 スケール200µm

GFP 遺伝子導入で標識された初期ブラコード由来細胞の移動動態は、ホールマウント標本で調べた DiI 標識実験と同じ結果であった。HH15 で標識し 24 時間後の HH19-20 において、上皮近傍に GFP 標識細胞の集団と、そこから離れて移動する少数の GFP 標識細胞が観察された。一部はすでに細胞索と終脳の接点まで移動していた。HH15-17 で標識し 48 時間後の 4.5 日胚 (HH25) では、ブラコード上皮からの移動経路上に標識細胞の小集団が半連続的に観察され、細胞索と終脳の結合部では標識細胞の集塊が観察された。

上皮と終脳をつなぐ細胞索は 6-6.5 日胚になると、嗅神経 (ON) とその内側に GnRH ニューロンの移動経路が合体した構造となり、前脳 (FB) との結合部は塊状の膨らみとなる。結合部における GFP 標識細胞の分布を調べると、2.5 日胚の GFP 標識細胞は結合部全体に分布したが (図 5A)、3.5 日胚の GFP 標識細胞は GnRH ニューロンの移動経路である内側に偏在した (図 5C)。また、嗅神経路の断面では、2.5 日胚標識細胞は全体に分布する傾向を示したが (図 5B)、3.5 日胚標識細胞は嗅神経路ではなく、主に GnRH ニューロンの移動経路に分布していた (図 5D)。最近、HH11 で GFP 標識されたブラコード由来細胞が HH24 の終脳近傍に集塊を形成することが報告された (Palaniappan et al., 2019)。初期の嗅ブラコード由来移動細胞は細胞索と終脳の接点に、移動開始時期依存的に順番に配置する可能性があるかもしれない。早期に移動する嗅ブラコード由来細胞の配置は嗅神経路と密接な関係を示しており、特に終脳との接点に配置したブラコード由来細胞は嗅神経投射のガイドポストとして関与する可能性が示唆された。

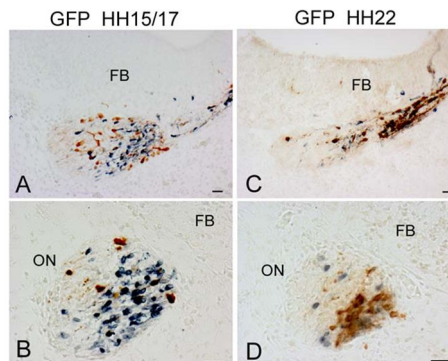


図5 GFP標識された嗅ブラコード由来移動細胞の6日胚における分布
GFP標識細胞(茶色), GnRHニューロン(青)スケール20µm

(5) 早期誕生の嗅ブラコード由来移動細胞は嗅神経路に成熟ニューロンとして配置する

2.5 日胚にチミジンアナログのひとつである EdU を投与し、6 日胚の嗅神経と嗅球との結合部位近傍を調べると、EdU 標識細胞の集塊が観察された。さらに嗅球の糸球体構造が明瞭となる 11.5 日胚で EdU 標識細胞の分布を調べると、嗅上皮から出た嗅神経小束の合流部位、鼻中隔の嗅神経束および嗅神経束が小束に分散し嗅球との結合を開始する領域に EdU 標識細胞の集塊が観察された。その一部は成熟ニューロンマーカーのカルピンジン 28 を発現していた。嗅神経路上における早期誕生の嗅ブラコード由来細胞の配置について、特に嗅神経と嗅球との結合部近傍の配置は、初期の移動細胞索の残存構造である可能性を示す。これらの結果も初期嗅ブラコード由来移動細胞が嗅神経伸長の道標として機能する可能性を示唆する。

(6) 嗅神経伸長前の嗅ブラコード上皮から移動した未熟ニューロンが形成するブラコード上皮と終脳をつなぐ細胞索は、嗅神経路形成の足がかりとして必須の構造であることが明らかと

なった。さらに、初期の嗅ブラコード由来移動細胞は、細胞索と終脳の結合部に配置することが判明し、嗅神経の終脳投射のガイドポストとして機能する可能性が示された。しかしながら、脳との結合部に配置した標識細胞の細胞特性は不明であり、6日胚の組織観察から嗅球原基近傍に見いだした神経線維マーカーを発現しない細胞塊との関連性やガイドポスト細胞の特定化については今後の課題である。

< 引用文献 >

Drapkin PT and Sliverman A-J. 1999. Development of the chick olfactory nerve. *Dev Dyn* 214:349-360.

Mendoza AS, Breipohl W and Miragall F. 1982. Cell migration from the chick olfactory placode: a light and electron microscopy. *J Embryol Exp Morph* 69:47-59.

Miyakawa M, Seki T and Arai Y. 1997. Supportive role of cellular bridge of neurons expressing a highly polysialylated form of NCAM (NCAM-H) at the initial stage of migration of LHRH neurons. *Zool Sci* 14:489-495.

Palaniappan TK, Slekiene L, Gunhaga L and Patthey C. 2019. Extensive apoptosis during the formation of the terminal nerve ganglion by olfactory placode-derived cells with distinct molecular markers. *Differentiation* 110:8-16.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上志津子、内山安男
2. 発表標題 蛍光色素Dilによる初期の嗅ブラコード由来移動細胞の動態解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上志津子、内山安男
2. 発表標題 初期嗅覚回路形成における嗅ブラコード由来移動細胞の役割
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shizuko Murakami and Yasuo Uchiyama
2. 発表標題 Early-generated migratory neurons from the olfactory placode are putative guidepost cells in the formation of the olfactory nerve tract.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上志津子・内山安男
2. 発表標題 初期の嗅ブラコード由来移動細胞と嗅神経路形成
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shizuko Murakami and Yasuo Uchiyama
2. 発表標題 Early migratory cells from the olfactory placode are required for the initial formation of the olfactory nerve tract and the migration of GnRH neurons.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上志津子・内山安男
2. 発表標題 嗅ブラコード由来移動細胞の一次嗅覚路形成における役割
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鈴木 ちぐれ (Suzuki Chigure) (40536629)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	