

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06835

研究課題名(和文)鳥類の僧帽筋を支配する運動神経の発生機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of developmental mechanisms of motor neurons that innervate the avian cucullaris muscle

研究代表者

八木沼 洋行 (Yaginuma, Hiroyuki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90230193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、僧帽筋を支配する運動神経(SAN/dMNs)軸索の経路形成とSAN/dMNsの発生・分化に関する分子メカニズムについて、その前駆領域であるp3領域の分化も含めて検討した。主な結果は以下の通り。(1)SAN/dMNsから伸び出す副神経脊髄根はst20(E3-3.5)に形成がされていることが判明した。(2)異所性のHox分子の強制発現は発生に影響を与えないことが明らかとなった。(3)microRNA-9(MiR-9)の強制発現によって、SAN/dMNの移動が妨げられた。また、p3領域にROB03の早発的な発現が認められた。(4)ROB03発現の調整機構とその種差が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、これまでの僧帽筋を支配する運動神経の発達に関する理解に新しい知見を加えるものである。特に運動神経を含めて体の吻尾軸における構造の決定に関するHox分子の異所性発現によってSAN/dMNの分化に影響が見られなかったことは興味深く、今後のさらなる研究の必要性を示している。また、SAN/dMNの分化とはまだ直接結びつかないが、MiR-9発現の影響の解析から発展し、ROB03の発現調整に係わるcis-regulatory moduleの同定を行い、硬骨魚類と四足動物間の種差を明らかにしたことは学問的な価値が高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the pathway formation by axons of motor neurons that innervate the trapezius muscle (SAN/dMN) and the molecular mechanisms of development and differentiation of SAN/dMN, including the differentiation of the p3 region, which is their precursor domain. The main results are as follows. (1) It was found that the spinal accessory nerve extending from SAN/dMNs was formed at st20 (E3-3.5). (2) It was clarified that the forced expression of ectopic Hox molecules does not affect the development of SAN/dMN. (3) Forced expression of microRNA-9 prevented the dorsal migration of SAN/dMN. In addition, precocious expression of ROB03 was observed in the p3 region. (4) The regulation mechanism of ROB03 expression and its species difference between tetrapods and teleosts was clarified.

研究分野：発生学 神経解剖学

キーワード：僧帽筋 副神経 MiR-9 Homeobox ROB03 運動神経 頸髄

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループはこれまで、鳥類頸髄における運動神経群の個体発生を研究してきており、この中で鳥類の頸髄の運動神経の発生過程には哺乳類の頸髄とはことなる特徴があることを明らかにしてきた。例えば、頸髄では発生早期に一過性に現れる運動神経群があり、それらの運動神経は、頸部には本来無い上肢を支配する外側運動神経核の特徴を示すことを明らかにしている (Mukaiyama ら 2017)。また、頸髄には運動神経であるにもかかわらず後根から軸索を出す神経の存在が古くから知られていたが、それらは僧帽筋を支配する副神経脊髄根運動神経に相当するものであることを報告してきた (Kobayashi ら 2013)。申請者らのこれまでの研究の核心をなす学問的な「問い」は、これら鳥類の頸髄の運動神経発生における特徴的な現象がどのようなメカニズムで起こり、どのような生物学、進化発生的な意味を持つものであるかを明らかにすることである。これらの鳥類の頸髄に特徴的な運動神経の構成や発生過程は、他の脊椎動物に比べ著しく長い頸を獲得してきた鳥類 (哺乳類の頸椎 7 個に対して鳥類は 12~22 個) の進化にともなって獲得されてきたものと考えており、その発生メカニズムの解明は鳥類 (そしてその祖先であるとされる恐竜類) の進化と発生の理解につながるものである。

### 2. 研究の目的

本研究では以下の 2 つを目的とした。

#### (1) SAN-MNs/dMNs から伸び出す軸索の経路形成のメカニズムの解明

SAN-MNs と dMNs は同じ運動神経グループでありながら、存在するレベルによって途中の経路が異なる理由についても解明したいと考えている。そのために、SAN-MNs/dMNs から伸び出す軸索の経路形成について、形成時期やその様式について解析する。

#### (2) 鳥類の僧帽筋を支配する SAN-MNs/dMNs の分化発生の分子的メカニズムの解明

鳥類の僧帽筋を支配する運動神経は、頸髄上部に存在し、副神経脊髄根として僧帽筋へ向かうもの (SAN-MNs) と頸髄中部から下部に存在し、後根を通過して脊髄神経として僧帽筋へ向かうもの (dMNs) の 2 群あるが、両者は共通の転写因子を発現し、共通の progenitor domain である p3 領域 (floor plate と運動神経核の間の領域) から発生したのち、最終的な位置へ移動することが明らかとなっているが、progenitor domain の分化も含めて、その分化発生の分子的なメカニズムが不明であり、本研究ではまずこの解明を第一の目的とした。具体的に検討すべき分子として、SAN-MNs/dMNs に発現していることが知られている *onecut* や *Hox* 分子の関与について調べる。p3 領域の分化発生については、single cell mRNA sequencing データベースを利用した解析も行う。

### 3. 研究の方法

SAN-MNs/dMNs から伸び出す軸索の経路形成時期やその様式についての解析のためには、透明化胚の全載標本において神経特異的マーカーによる免疫染色を行い経路形成の時期について検討した。

様々な分子の SAN-MNs/dMNs の発生に対する影響を調べるため、それらの分子そのものや、分子の発現を抑える分子の強制発現をおこない、その影響について調べた。具体的には *onecut* の発現を抑える MiR-9 (microRNA-9) および、本来 SAN-MNs/dMNs に発現されていない *Hox* 分子の強制発現を行った。強制発現は、発達中のニワトリ胚 (st15) に電気穿孔法によって様々な分子の遺伝子導入を行い、SAN-MNs/dMNs の移動が終了する E4.5~5 で固定し、SAN-MNs/dMNs の発生に異常が起きているかどうか検討した。

SAN-MNs/dMNs が派生する p3 領域の形成・分化メカニズムの解析のためには、公開されている single cell mRNA sequencing のデータベースを利用し、p3 領域の神経細胞の分化過程や種間の比較を行った。それらの結果はさらに *in vivo* で確かめた。

### 4. 研究成果

#### (1) SAN-MNs/dMNs から伸び出す軸索の経路形成時期の確定

ニワトリ胚の Wholemount 標本において、ニューロフィラメントに対する抗体を用いて免疫染色を行ったのち透明化を施し、副神経脊髄根の発達時期について検討した。その結果 st20 (E3-3.5) のニワトリ胚において副神経脊髄根の形成されていることが

判明した(図1)。先の申請者らの研究の結果では、SAN-MNs/dMNs の最終分裂の時期は E2.5~E3 (st15~st18)であり、今回の結果は最終分裂後半日程度でその軸索を相当の距離伸ばしていることが明らかとなった。また、一方、標的である僧帽筋の発生は st26~28(E5~E6)とかなり遅いことも知られており、SAN-MNs/dMNs の軸索と僧帽筋がどのような形で相互作用するのかについて今後明らかにしていくべき課題と思われる。

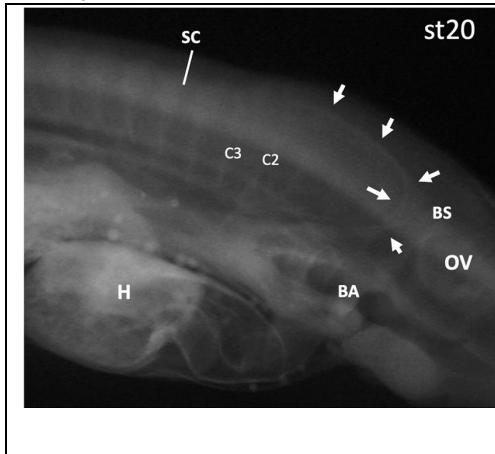


図1  
st20 (E3~3.5) のニワトリ胚におけるニューロフィラメントの wholemount 免疫染色

矢印は副神経脊髄根および副神経(迷走神経の一部)を指す。ニワトリ胚では上行した副神経脊髄根は迷走神経と合流して下行する。

BA: 鰓弓、BS: 脳幹、  
H: 心臓、SC: 脊髄、  
C2: 第2頸神経、C3: 第3頸神経、OV: 耳胞

### (2) Hox 分子の関与についての検討

Hox 分子は体の吻尾軸における形態形成に係わる。脊髄でも各分節に特異的な運動神経グループの分化に係わることが知られている。申請者らのグループは予備的な研究の中で頸髄に発現している Hoxa5 が SAN-MNs/dMNs にも発現しているのに対し、もう一つの頸髄領域に通常発現する Hoxc5 が SAN-MNs/dMNs に発現していないことを見いだしている。この違いが SAN-MNs/dMNs の発生にとって意味のあることかどうかもす明らかにしようとした。また、通常 Hoxc6 と Hoxa6 は頸髄上部や中部には発現せず、頸髄下部の頸膨大部以下で発現することが知られているので、これらの Hox を異所性に頸髄上部や中部で発現させた時に SAN-MNs/dMNs の発生に異常が生ずるか検討を行った。その結果、Hoxc5, Hoxc6, Hoxa6 のいずれの強制発現によっても SAN-MNs/dMNs は通常に分化し、移動することが明らかとなり(図2)、SAN-MNs/dMNs の分化には Hoxc5 の発現の有無は関係しないこと、またより尾側で発現する Hox 分子による分化抑制がおこらないことが示唆された。さらに尾側に発現する Hox 分子群の影響については今後の課題である。

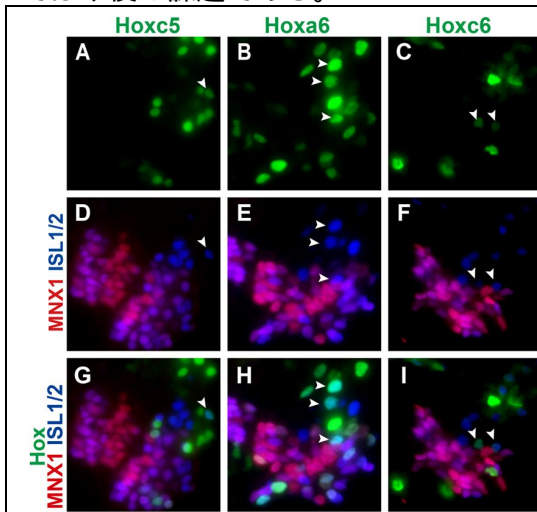


図2  
異所性の Hox 分子強制発現の影響

dMN に本来発現していない Hox の強制発現によって dMN の発生は影響を受けるかを検討した。

Hoxc5, Hoxa6, Hoxc6 の発現 (green) によっても、dMN は発生していた(矢じり)。

dMN は MNX1(red)(-)かつ Is1/2(blue)(+)のニューロンである。

### (3) MiR-9 発現による影響の検討

予備実験で SAN-MNs/dMNs に運動神経の分化に関与する onecut が発現していることがわかったので、onecut をターゲットとすることが知られている microRNA-9(MiR-9)を強制発現し、その影響を調べた。その結果、MiR-9 の強制発現により、SAN-MNs/dMNs の背側への移動が障害され、腹側の p3 領域に多数の SAN-MNs/dMNs が残っていることが明らかとなった(図3)。そこで、この原因を探るため、細胞移動に関連することが知られている ROBO-SLIT 分子群の発現を調べたところ、SAN-MNs/dMNs の背側への移動が起こる時期である st22 の頸髄において ROBO3 が p3 領域に発現していることが確認された(図4)。さらに詳しく調べると、ROBO3 は正常の頸髄では、



SAN-MNs/dMNs の背側移動が終了したのちの st26 で V3 領域に発現していること明らかとなった (図 4)。これは、MiR-9 によって ROBO3 の発現時期が早まり、まだ移動を始めていない SAN-MNs/dMNs の背側への移動を抑制したことを意味するものと考えられた。しかしながら、ROBO3 の SAN-MNs/dMNs の移動に対する影響についての直接的な証明までは至っておらず、今後の課題となった。

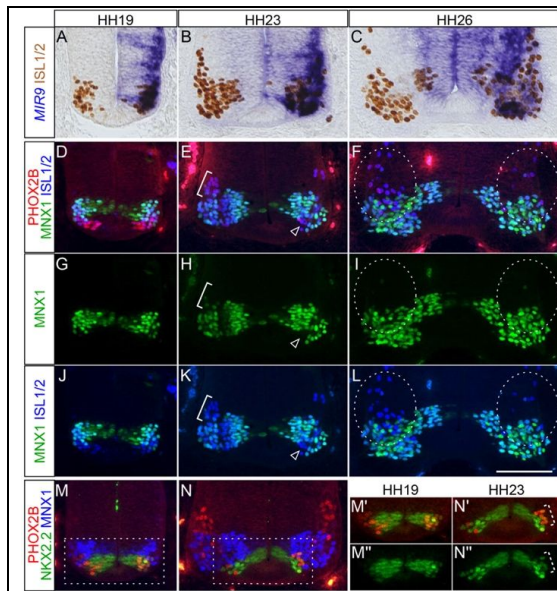


図 3  
MiR-9 発現による SAN/dMN の移動抑制

MiR-9 を発現させたのち各ステージで観察すると (A-C)、SAN/dMN の腹側から背側への移動が妨げられ (D-L)、st26 となっても多くの SAN/dMN が V3 領域にとどまっていた (M,N)。

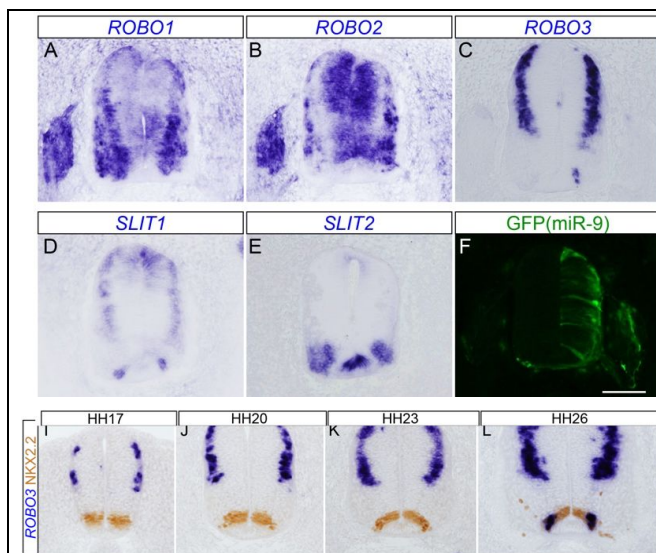


図 4  
MiR-9 発現後の ROBO-SLIT 分子群の発現パターンの変化 (A-F) および正常胚における ROBO3 の発現 (G-L)

MiR-9 の発現によって、ROBO3 の発現に変化が認められた。st23 で V3 領域に ROBO3 の発現が認められた (C)。正常の胚では、st26 で ROBO3 が背側部に加えて V3 領域特異的にも発現してくる (L)。MiR-9 によって ROBO3 の発現時期が早まったことを示している。

#### (4) p3 領域の分化メカニズム、ROBO3 発現の調節機序

(3) の研究の過程で、ROBO3 が p3 領域に特異的に発現されることが判明したので、これを 1 つの手がかりに、p3 領域の分化、ROBO3 の発現調節について公開されている single cell mRNA sequencing (scRNA-seq) のデータベースを利用して解析を行った。マウスの各ステージの胎仔の脊髄の細胞から作られた mRNA の発現プロファイルをクラスター化し、*Nkx2-2* または *Sim1* をマーカーとして p3 領域の progenitor およびこの領域から分化する V3 ニューロン群を抽出した。その結果、V3 ニューロン群の分化過程を追うことができた (図 5)。さらに V3 ニューロン群は ROBO3 を発現するニューロン群 (ROBO3+) と ROBO3 を発現せず *Lhx1* を発現する (*Lhx1*+) ニューロン群の 2 つのグループに分けられることが判明した。実際にニワトリ胚の脊髄でこれら 2 つのニューロン群の局在を調べたところ、ROBO3+ はやや内側に、*Lhx1*+ はやや外側に位置しているニューロン群であることが分かった (図 5)。

同様の解析をゼブラフィッシュ胚の scRNA-seq のデータベースで行ったところ、ゼブラフィッシュでも p3 領域の progenitor およびこの領域から分化する V3 ニューロン群を抽出することができた。しかし、V3 ニューロンのほぼ全てが ROBO3 を発現し

ており、ROB03 を発現していないニューロンはほとんど存在していなかった。これらの結果は ROB03 の発現に関しては、硬骨魚類とほ乳類や鳥類とでは異なる発現制御メカニズムを持つことを示している。

このことをさらに追求するために、利用可能な ChIP-seq と ATAC-seq のデータベースを用いて ROB03 の *cis*-regulatory module (CRM) の検索を行った。その結果、ROB03 の転写開始点の約 20kb 上流に多数の転写因子が結合可能な部位 (Robo3-CRM) を見つけることができた (図 6)。この部位の機能を確認するため Robo3-CRM に GFP を付けて、電気穿孔法でニワトリ胚に導入したところ、内因性の ROB03 発現に一致して GFP の発現がおこることを確認した。この Robo3-CRM について種間の違いを調べたところ両生類以上では保存されているのに対し、硬骨魚類では失われていることが判明した。これが ROB03 発現様式の違いの原因であることが示された。以上の結果は、他の結果とともに現在論文投稿中である。

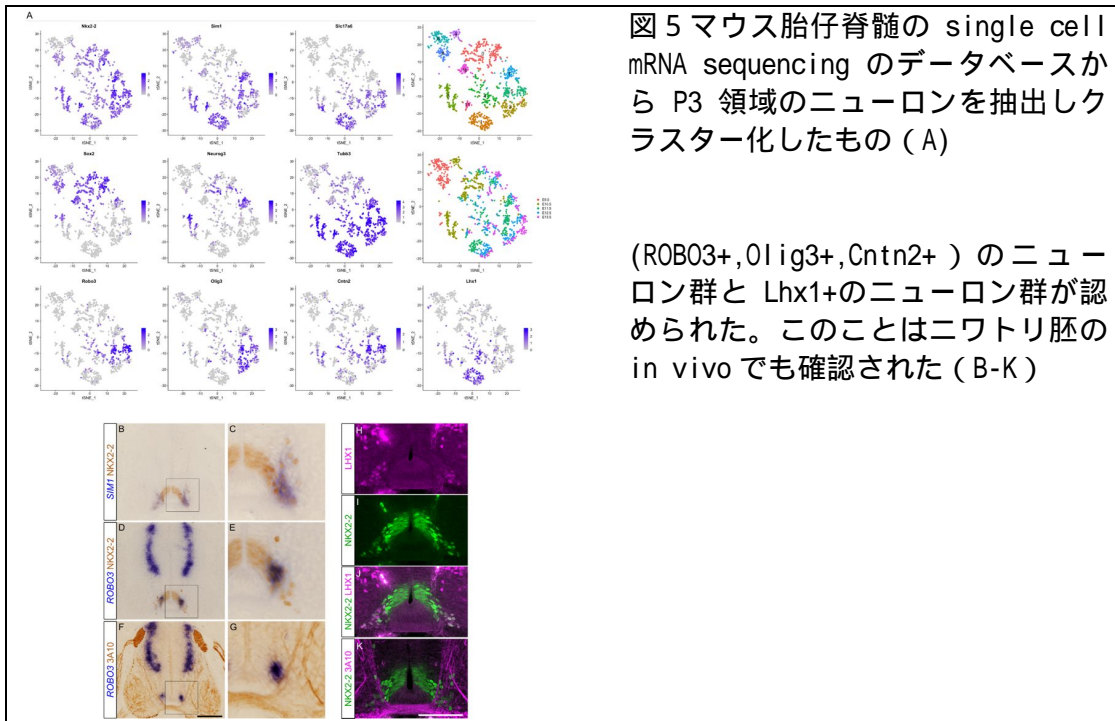


図 5 マウス胎仔脊髄の single cell mRNA sequencing のデータベースから P3 領域のニューロンを抽出しクラスタ化したもの (A)

(ROB03+, Olig3+, Cntn2+) のニューロン群と Lhx1+ のニューロン群が認められた。このことはニワトリ胚の *in vivo* でも確認された (B-K)

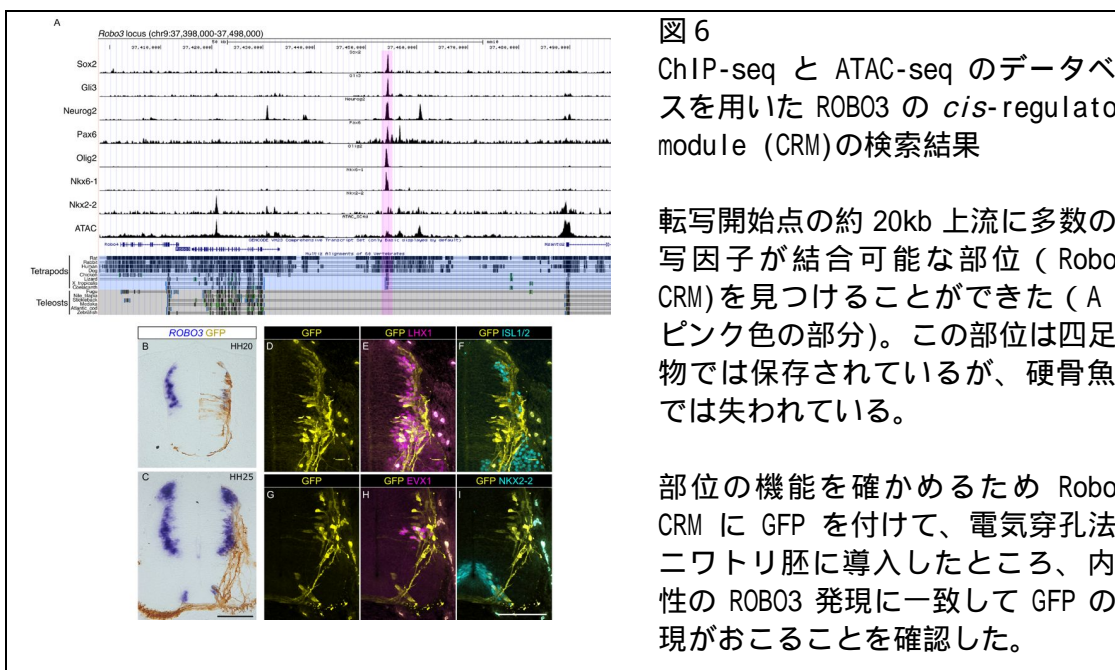


図 6 ChIP-seq と ATAC-seq のデータベースを用いた ROB03 の *cis*-regulatory module (CRM) の検索結果

転写開始点の約 20kb 上流に多数の転写因子が結合可能な部位 (Robo3-CRM) を見つけることができた (A のピンク色の部分)。この部位は四足動物では保存されているが、硬骨魚類では失われている。

部位の機能を確認するため Robo3-CRM に GFP を付けて、電気穿孔法でニワトリ胚に導入したところ、内因性の ROB03 発現に一致して GFP の発現がおこることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Nagashima, Daisuke Koga, Satoshi Kusumi, Katsuki Mukaigasa, Hiroyuki Yaginuma, Tasuo Ushiki, Noboru Sato	4. 巻 237
2. 論文標題 Novel concept for the epaxial/hypaxial boundary 5 based on neuronal development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Anatomy	6. 最初と最後の頁 427-438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Y, Sakuma C, Yaginuma H.	4. 巻 437
2. 論文標題 Dispersing movement of tangential neuronal migration in superficial layers of the developing chick optic tectum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 131-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2018.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Y, Sakuma C, Yaginuma H	4. 巻 -
2. 論文標題 Visualization of Tangential Cell Migration in the Developing Chick Optic Tectum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vis Exp.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/58506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 向笠勝貴, 佐久間千恵, 八木沼洋行
2. 発表標題 Foxp1転写制御領域におけるレチノイン酸応答配列の探索と種間比較
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本光広, 八木沼洋行
2. 発表標題 ウイルスベクターを用いた、新たな小脳の神経回路の解明
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊裕二, 佐久間千恵, 八木沼洋行
2. 発表標題 視蓋円形核投射を形成する視蓋遠心路ニューロンの発生と移動
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向笠 勝貴, 佐久間 千恵, 八木沼 洋行
2. 発表標題 V3インターニューロンの発生過程でSIM1はROB03を抑制しMIR9により抑制される.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向笠勝貴, 佐久間千恵, 八木沼洋行
2. 発表標題 Foxp1遺伝子座に位置するレチノイン酸応答配列の機能解析と種間比較.
3. 学会等名 第9回Tokyo Vertebrate Morphology Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mukaigasa Katsuki, Sakuma Chie, Yaginuma Hiroyuki .
2. 発表標題 mir-9 misexpression causes upregulation of Robo3 specifically in the branchial visceral motor neurons in chick embryo .
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yaginuma Hiroyuki, Mukaigasa Katsuki .
2. 発表標題 Mechanisms of motoneuron death in the developing cervical spinal cord .
3. 学会等名 XXVI International Symposium on Morphological Sciences ( ISMS 2108 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間 俊作, 島田 孝子, 八木沼 洋行
2. 発表標題 発生学的筋コンパートメントに基づいた脊髄神経の新しい分岐パターン
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 ; 20181128 ; 横浜
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向笠勝貴、佐久間千恵、八木沼洋行
2. 発表標題 FoxP1転写制御領域におけるレチノイン酸応答配列の探索と種間比較
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会 新潟
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 八木沼洋行
2. 発表標題 頸髄運動神経細胞の発生・分化から見た「くび」の進化
3. 学会等名 日本解剖学会第66回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向笠勝貴, 佐久間千恵, 八木沼洋行
2. 発表標題 ニワトリ胚脊髄V3介在ニューロンの発生過程におけるSIM1およびROB03の発現解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会全国学術集会；
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向笠勝貴, 佐久間千恵, 八木沼洋行
2. 発表標題 脊髄神経発生過程におけるRobo3の発現制御機構とその種間多様性の解析.
3. 学会等名 日本解剖学会第66回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向笠勝貴, 佐久間千恵, 八木沼洋行
2. 発表標題 脊椎動物における神経管パターンニングに関わる遺伝子群の転写制御領域の多様化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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	向笠 勝貴  (Mukaigasa Katsuki)  (60706349)	福島県立医科大学・医学部・助教   (21601)	
研究 分担者	本間 俊作  (Homma Shunsaku)  (20261795)	福島県立医科大学・医学部・准教授   (21601)	
研究 分担者	渡邊 裕二  (Watanabe Yuji)  (80301042)	福島県立医科大学・医学部・講師   (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------