

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14710

研究課題名（和文）頬ひげのMerkel細胞の分化を制御する分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of the differentiation of Merkel cells in a whisker follicle

研究代表者

石田 研太郎（Ishida, Kentaro）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20707898

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、頬ひげ原基と三叉神経節の器官共培養系を用いて、胎生期のマウスの頬ひげのMerkel細胞の分化を制御する分子機構を解析することを目的とした。はじめに、免疫組織化学的な手法により、器官培養によって分化する頬ひげのMerkel細胞の数と位置を解析した。また、生体内電気穿孔法による遺伝子導入により、細胞と細胞小器官を蛍光タンパク質で可視化した。さらに、遺伝子導入した器官をライブイメージングし、細胞の分裂、移動、細胞小器官の動態を解析した。本研究で開発された手法は、頬ひげのMerkel細胞の分化の制御機構の解明に貢献するものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頬ひげは、げっ歯類が外部環境から情報を得るための最も重要な体性感覚器官の一つである。頬ひげに加えられた機械的刺激は、頬ひげ毛包の上皮細胞の一部の特殊化した機能細胞であるMerkel細胞によって電気的シグナルに変換されて三叉神経に伝達される。Merkel細胞の分化やMerkel細胞と三叉神経との接続は、頬ひげを介する体性感覚機能において必須であるが、発生過程でこれらの機構を制御する分子機構は未だ解明されていない。本研究で開発された器官培養技術やこれを応用した解析技術を用いることにより、Merkel細胞の分化や三叉神経との相互作用の分子機構を詳細に解析できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to analyze the molecular mechanisms of the differentiation of Merkel cells of the embryonic mouse whisker follicles using an organotypic co-culture of a whisker pad with a trigeminal ganglion explant. I initially analyzed the number and the position of the formation of Merkel cells in the cultured whisker follicles. In addition, I visualized cells and organelles using fluorescent proteins by an in vivo electroporation. Furthermore, we observed cell proliferations, movements, and dynamics of some organelles using a live imaging of the electroporated tissue explants on a dish. These results will contribute to understanding the regulatory mechanisms of the Merkel cell differentiation during the embryonic development of whisker follicles.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官培養 頬ひげ原基 Merkel細胞 三叉神経

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

げっ歯類の頬ひげは、外部環境を認識するための重要な感覚器官である。頬ひげに入力された機械的刺激は、特殊化した上皮細胞である Merkel 細胞で電気的情報に変換され、三叉神経に伝達される。その後、三叉神経節、脳幹、視床を経由して大脳皮質一次体性感覚野 (S1) の第 4 層に到達する。頬ひげと一次体性感覚野の関係は、外胚葉性皮膚付属器官と中枢神経系の密接な関連が示された稀有な事例である。体表面で受容した外部刺激を中枢へ伝達し認識する高次機能の成立のメカニズムの解析に適しているとともに、異なる組織間・細胞種間の相互作用の仕組みを探るために極めて有用なシステムである。

マウスの頬ひげは胎齢 12 日頃に発生が始まり、16 日頃には上皮組織の特定の領域に Merkel 細胞の集団が形成される。この時、三叉神経節から伸長した神経終末が Merkel 細胞領域へ到達している。この Merkel cell-neurite complex と呼ばれる構造体が、頬ひげが体性感覚器官として機能するための要である。しかしながら、いかに Merkel 細胞と三叉神経が相互作用し、感覚器を完成させるのかは不明である。また、Merkel 細胞の分化を制御している分子機構はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者が開発した頬ひげ原基と三叉神経節の器官共培養系を軸に、頬ひげの Merkel 細胞の分化を制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 頬ひげ原基と三叉神経節の器官共培養系の開発と解析

頬ひげの Merkel 細胞の分化を制御する分子機構の解析のツールとして、頬ひげ形成前のマウス胎仔の頬の皮膚と三叉神経節を用いた独自の器官共培養技術を開発し、その成果を論文にまとめて報告した (Ishida *et al.*, *Development, Growth & Differentiation* 60(5), 291-299, 2018)。この技術における頬ひげの形成、Merkel 細胞の分化、三叉神経節の機能等を解析することにより、本実験系のツールとしての有用性を解析した。

(2) 組織の遺伝子操作による解析

頬ひげの Merkel 細胞の分化を制御する分子機構の解析において、生体外での培養器官への遺伝子導入法は強力なツールとなる。文献を参考にして、遺伝子発現ベクターを電気穿孔によって導入する遺伝子導入法を実施した。

(3) 遺伝子操作した組織のライブイメージング

生体外の器官培養系を用いて、頬ひげの Merkel 細胞の分化を制御や Merkel 細胞と三叉神経との相互作用を解析する上で、発生過程や分化過程のライブイメージングが有用である。上記の手法で複数の遺伝子発現ベクターを導入した組織を器官培養し、マルチカラーで解析するライブイメージング法を実施した。また、特定の細胞小器官に蛍光タンパク質が局在するように構築した発現ベクターを用いることにより、器官培養過程の細胞小器官の動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 頬ひげ原基と三叉神経節の器官共培養系の開発と解析

研究代表者が開発した器官共培養系では、頬ひげ形成前の胎生 12.5 日のマウスの頬の皮膚と、同日齢の三叉神経節を摘出し、コラーゲンゲルに包埋して器官培養することにより、頬ひげの形成と三叉神経の伸長が起こり、培養 7 日目には頬ひげ原基の Merkel 細胞への三叉神経線維の到達が観察される。

器官培養した三叉神経節および三叉神経線維が機能を保っていることを解析するために、ライブカルシウムイメージングを実施した。器官培養した三叉神経節に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって発光する Ca1-520 を取り込ませ、周囲の培養液を高カリウムイオン濃度 (270 mM) 状態にして解析した。その結果、低カリウムイオン濃度 (4 mM) 状態と比較して、多くの発光が観察された (図 1)。この結果から、器官培養した三叉神経節の三叉神経細胞は、神経機能を保持していることが示唆された。

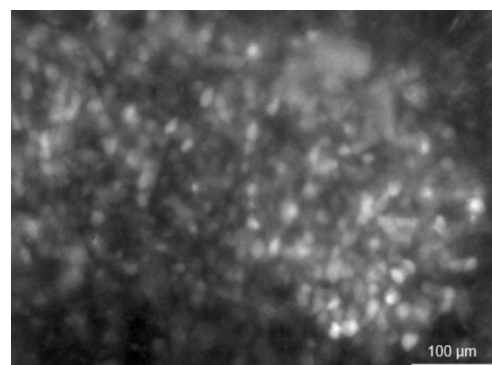


図 1 器官培養した三叉神経節のカルシウムイメージング

次に、本器官培養法を用いて、頬ひげ原基の Merkel 細胞の分化における上皮-神経相互作用の関与を解析した。胎生 12.5 日の頬皮膚のみを 7 日間器官培養し、神経線維のマーカータンパク質である Neurofilament-H (NF-H) と Merkel 細胞のマーカータンパク質である Cytokeratin 8 (Krt8) の免疫染色を行なった。器官培養によって形成した頬ひげ原基の周辺に NF-H が検出されなかったことから、頬皮膚のみの器官培養により、摘出組織に含まれていた神経線維が消失したことを確認した。この時、形成した頬ひげ原基の上皮組織に Krt8 陽性の Merkel 細胞が観察された (図 2)。このことから、頬ひげ原基の形成における Merkel 細胞の分化には三叉神経節由来の神経線維との相互作用が必ずしも必須ではないことが示唆された (Ishida *et al.*, *Development, Growth & Differentiation* 60(5), 291-299, 2018)。

一方、器官培養した頬ひげ原基では、正常発生の頬ひげ原基と比較して、出現する Merkel 細胞の数が減少している傾向が観察された。また、頬ひげ上皮組織において Merkel 細胞が出現する位置に関しては、正常発生と比較して有意な差は観察されなかった。このことは、Merkel 細胞が分化する位置は、頬ひげ原基の発生過程において、何らかの自律的なメカニズムによって制御されていることを示唆している。

(2) 組織の遺伝子操作による解析

頬ひげの Merkel 細胞の分化を制御する分子機構を解析するため、Merkel 細胞への分化に応答する蛍光レポーター実験を上記の器官培養系と組織への遺伝子操作を組み合わせることを計画した。はじめにマウス胎仔への *in vivo* 電気穿孔法による遺伝子導入方法を習得した。文献に従い、蛍光タンパク質発現プラスミドベクターをマウス胎仔の側脳室に注入して電気パルスを与えることにより、正電極側の細胞における蛍光タンパク質の強制発現が観察された。次に、緑、橙、赤、近赤外の蛍光を発する 4 種類の蛍光タンパク質の発現ベクターを構築し、同様の手法で目的の細胞集団を複数の蛍光タンパク質で標識できることを確認した。さらに、特定の細胞小器官に局在するタンパク質と融合させることにより、標的の細胞小器官に蛍光タンパク質が局在するように設計した発現ベクターを作成した。これらの発現ベクターを上記の手法で遺伝子導入し、組織切片を作成して解析した。その結果、標的の細胞小器官における蛍光タンパク質の局在が観察された。

(3) 遺伝子操作した組織のライブイメージング

頬ひげの Merkel 細胞の分化を制御や Merkel 細胞と三叉神経との相互作用を解析する上で、遺伝子操作した組織を研究代表者の器官培養系で培養しながら、発生過程や分化過程のライブイメージングを試みた。上記の手法で細胞質全体で蛍光タンパク質を発現させるベクターと、特定の細胞小器官で蛍光タンパク質を発現させるベクターを同時に遺伝子導入した組織を器官培養し、マルチカラーでのライブイメージングを実施した。その結果、器官培養による発生過程の細胞の分裂、移動、細胞小器官の構造変化を数分ごとに 24 時間以上連続して解析することが可能となった。本手法を用いることにより、Merkel 細胞の分化と三叉神経の相互作用の分子機構をより詳細に解析できるようになると期待される。

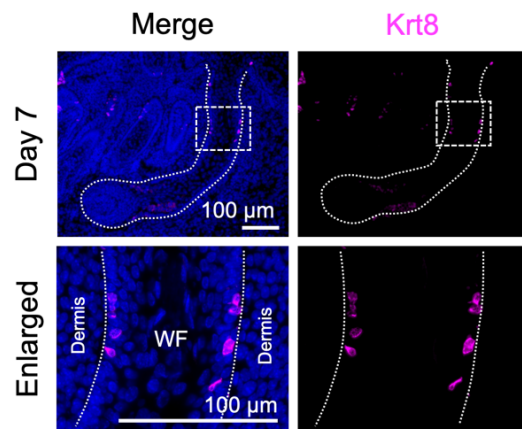


図 2 器官培養した頬ひげ原基の免疫染色画像

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 3件）

1. 著者名 Ishida Kentaro, Saito Tetsuichiro, Mitsui Toshiyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Involvement of selective epithelial cell death in the formation of feather buds on a bioengineered skin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12593	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 -

1. 著者名 Kubota Tomoya, Lloyd Kento, Sakashita Naoto, Minato Seiya, Ishida Kentaro, Mitsui Toshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Clog and Release, and Reverse Motions of DNA in a Nanopore	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 84 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym11010084	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 -

1. 著者名 Ishida Kentaro, Saito Tetsuichiro, Mitsui Toshiyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 In vitro formation of the Merkel cell-neurite complex in embryonic mouse whiskers using organotypic co-cultures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 291 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12535	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0件

〔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
研究協力者	三井 敏之 (Mitsui Toshiyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	斎藤 哲一郎 (Saito Tetsuichiro)		