

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14840

研究課題名（和文）触覚を担う神経回路の形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis for sensory neural network formation

研究代表者

芝田 晋介（Shibata, Shinsuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問教授

研究者番号：70407089

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）：本課題では、生物の生存に必要な不可欠な「触覚」を担う神経回路の発生過程における形成メカニズムを解明するため、触覚異常をきたす複数の遺伝子改変動物を用い、周囲から触覚情報を得るための神経回路の形成過程に関する基礎データを得ることを目的として実施した。目的達成のため申請者は行動学的に触覚異常のみられるマウスを検証し、光学顕微鏡レベルで神経回路の異常を可視化し、標的因子群の解析を実施して回路形成異常を引き起こす分子メカニズムに迫り、最終的にはMRIや電子顕微鏡の観察へ発展させ、マクロのMRIからミクロの電子顕微鏡解析までの解析結果を結びつけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

触覚を担う神経回路網は、外傷などの神経損傷後の回復過程で回路異常をきたすことがあり、異痛症と呼ばれているが、その形成機序は十分に明らかにはなっていなかった。現在でも外傷などに伴って生じる慢性疼痛に苦しむ患者さんは増え続けており、日本では成人人口の2割を超える患者さんが苦しんでいるとも言われている。全世界では10億人を超える患者さんがいるとの試算もあり、発生学的に触覚や痛覚の回路形成に重要な分子メカニズムを解析することは、このような慢性疼痛の患者さんの疼痛発生機序の理解に役立つ可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this project, in order to elucidate the tactile neural network formation mechanism on the course of development in mice, we used the multiple genetically modified animals which cause the abnormalities of the tactile sensation. The touch sensation is indispensable for the survival, then we tried to obtain the fundamental data about the process of the tactile circuit formation in vivo. To achieve this purpose, we examined the behavioral abnormality in tactile sensation with some mice strain. The abnormalities of the neural circuits were visualized at the optical microscope level, and the target factors were identified. The abnormal neural network were completely analyzed both with macro-level MRI and with micro-level electron microscope imaging.

研究分野：神経発生・神経再生学・組織学

キーワード：感覚神経 触覚 神経回路網 神経回路形成 発生 異痛症

1. 研究開始当初の背景

外傷などによる神経損傷後の回復過程で触覚の神経回路が異常をきたすと痛みを引き起こすことがある。しかし、その発生メカニズムはこれまで十分に解明されていなかった。また神経機能評価には電気生理学や fMRI が一般的に用いられているが、電子顕微鏡を用いて変化が描出されたことはなかった。

これまで我々はゼブラフィッシュおよびマウスの神経発生過程における正常および異常な神経回路の形成過程を解析し複数の成果を得て発表している (Shibata et al. 2010, 2012, 2015a 他)。RNA 結合蛋白質 Musashi については、最初はショウジョウバエで発見されたが (Nakamura et al 1994)、我々は zebrafish において Musashi を初めて同定し、その機能を明らかにした (Shibata S et al. 2012)。マウスにおいても Musashi1 および Musashi2 が同定され、神経幹細胞に強く発現し神経幹細胞の分化調節に関与していることを明らかにすることができた (Sakakibara S et al 1996, 2001)。Musashi1 欠損マウスを作成し、上衣細胞付近の細胞の増殖異常による先天性水頭症を示すことが分かった (Sakakibara S et al. 2002)。

さらに我々はこれまでに、免疫染色サンプルについて光学顕微鏡および電子顕微鏡を並行して用いた解析を重ね、様々な組織の形態異常についての解析技術を確立してきた (Shibata et al. 2015b, 2019 他)。

これらの技術を活用して生物の生存に重要な五感の一つである触覚を担う神経回路の形成メカニズムに迫りたいと考え、今回、複数の遺伝子改変マウスの解析に本プロジェクトで着手することとなった。

2. 研究の目的

生物が生存し続けるのに必要不可欠な触覚を担う神経回路の形成過程および異常を来すメカニズムに迫るために、触覚異常をきたす遺伝子改変動物を用いて周囲から触覚情報を得るための神経回路の形成過程に関する基礎データを取得することを第一の研究目的として実施した。

この目的達成のために、我々は行動学的に触覚異常のみられるマウスの詳細を分析し、光学顕微鏡レベルで触覚神経回路の異常を検証し、触覚の回路形成異常を引き起こす分子メカニズムの検討を行い、MRI および電子顕微鏡のイメージング技術を応用して、マクロの MRI からミクロの電子顕微鏡解析まで同一個体で撮影する手法を検討することで、形成異常を起こした触覚神経回路を様々な解像度で可視化することを目指した。

3. 研究の方法

以下の(1)から(6)までの研究を実施した。

(1) 触覚を担う神経回路異常の組織学的な解析

これまでの解析により感覚神経が異常になっていることが示唆された遺伝子改変マウスを用い、神経発生の際に形成される3種類の感覚神経(触覚、関節位置覚、温痛覚)のうち、どのサブタイプの神経線維が、脊髄後角のどの層へ神経線維連絡しているのか詳細な組織学的解析を光学顕微鏡にて行い、発生初期段階における感覚神経ネットワーク形成に対する影響を検証した。

(2) 触覚回路異常の行動学的な解析

温痛覚・関節位置覚・触覚などを担う3種類の感覚神経の機能を検証した。hotplate test や von Frey hair test などの感覚神経の検査によって、触覚を担う感覚神経の異常を明らかにした。

(3) 標的分子の解析

特異的な抗体を用い、標的スクリーニングを行い、触覚神経の回路形成に関与する可能性のある分子群を同定することにより、不明の点が多かった触覚受容回路形成の分子メカニズム解明のヒントが得られた。

(4) 感覚神経における関連分子および発現解析

標的スクリーニング結果に基づいて、標的候補因子の蛋白レベルの発現変化をネットワーク形成に重要な時期のサンプルを用いて Western blotting や免疫染色によって検証し、また既報の関連する受容体群の発現および活性化を詳細に検証した。標的候補因子に関してより詳細な、時間的・空間的な発現量の変化を解析すると共に、蛍光多重染色を用いて触覚神経回路形成に関わる分子の局在情報を得た。

(5) マウス MRI 解析

MRI を用いて感覚神経が異常になっていることが示唆された遺伝子改変マウスの解析を実施し、経時的に撮像して血流および酸素消費量が増大している領域を可視化し触覚を担う神経線維の回路状態を重点的に、定量的かつ経時的に評価した。

(6) 光学顕微鏡と電子顕微鏡による触覚回路の可視化

3種類の感覚神経のうちどの神経線維が、どの程度の神経線維連絡が各遺伝子欠損マウスで変化しているのか、経時的にかつ定量的に明らかにするために、遺伝子欠損マウス生体内で神経回路を複数の遺伝子改変マウス同士の交配により蛍光ラベルし、光学顕微鏡と電子顕微鏡で相関解析を実施した。触覚神経の回路状態をMRIのマクロデータを軸に、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡のミクロデータを組み合わせ、様々な階層で回路を可視化した。

4. 研究成果

感覚神経、特に触覚の神経回路異常の分子メカニズム解析は近年活発に報告され続けている。代表的なものでは、Semaphorin-Plexinシグナル(Yaron et al., 2005; Yoshida et al., 2006)や、Unc-5C受容体を介したNetrin-1シグナル(Masuda et al., 2008; Watanabe et al., 2006)、さらにはTrkC受容体を介するNeurotrophin-3 (NT3)シグナル(Cronk et al., 2002; Postigo et al., 2002)など、分子シグナルと組織異常の解析は行われてきた。過去の報告では、神経の正常発生と異常変化を蛍光染色やトレーサーなどで可視化しているが、触覚機能との証明や異常なシナプス形成の証明は不十分であった。

今回、我々はfMRIなどの機能的な神経回路解析手法と免疫電顕解析を組み合わせ、異常触覚回路の詳細な可視化に挑み、形成異常を起こした触覚神経回路を様々な解像度で可視化することができ、新規標的の同定を通じて、正常な神経の回路形成過程にRNA結合蛋白質が重要な役割を担っていることが示された。

今後の展望としては、触覚と温痛覚というのは同じ背側神経節内の異なる感覚神経細胞がそれぞれ担当している。現在、温痛覚の異常に伴って生じる疼痛に苦しむ患者は増加の一途を辿っており、持続的な痛みで苦しむ患者は日本国内の成人人口の5分の1を超える数千万人存在し、世界での患者数は数十億人に達するとも言われている。また米国だけでも慢性疼痛による経済的損失は9兆円とも推計されており、大きな社会問題となっている。疼痛は患者本人の生活の質Quality of Life (QOL)を著しく低下させるだけでなく、家族のQOLをも低下させる。今後は、外傷後などに触覚が温痛覚と混線して異常を来す病態が起こるメカニズムに応用するなど、触覚・温痛覚などトータルで解析をして、疼痛などに苦しむ多くの患者さんに寄与する研究を今後も継続して実施したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Kamata Yasuhiro, Isoda Miho, Sanosaka Tsukasa, Shibata Reo, Ito Shuhei, Okubo Toshiki, Shinozaki Munehisa, Inoue Mitsuhiro, Koya Ikuko, Shibata Shinsuke, Shindo Tomoko, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Okano Hideyuki, Nagoshi Narihito, Kohyama Jun	4. 巻 10
2. 論文標題 A robust culture system to generate neural progenitors with gliogenic competence from clinically relevant induced pluripotent stem cells for treatment of spinal cord injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 398 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.20-0269	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 Suzuki Masami, Saito-Adachi Mihoko, Arai Yasuhito, Fujiwara Yuko, Takai Erina, Shibata Shinsuke, Seki Masahide, Rokutan Hirofumi, Maeda Daichi, Horie Masafumi, Suzuki Yutaka, Shibata Tatsuhiko, Kiyono Tohru, Yachida Shinichi	4. 巻 81
2. 論文標題 E74-Like Factor 3 Is a Key Regulator of Epithelial Integrity and Immune Response Genes in Biliary Tract Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 489 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-2988	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 Nagai Norihiro, Kawashima Hirohiko, Toda Eriko, Homma Kohei, Osada Hideto, Guzman Naymel A., Shibata Shinsuke, Uchiyama Yasuo, Okano Hideyuki, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 3
2. 論文標題 Renin-angiotensin system impairs macrophage lipid metabolism to promote age-related macular degeneration in mouse models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01483-2	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 Suzuki Toru, Adachi Shungo, Kikuguchi Chisato, Shibata Shinsuke, Nishijima Saori, Kawamoto Yurie, Iizuka Yusuke, Koseki Haruhiko, Okano Hideyuki, Natsume Tohru, Yamamoto Tadashi	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulation of Fetal Genes by Transitions among RNA-Binding Proteins during Liver Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9319 ~ 9319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239319	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 Kajikawa Keita, Imaizumi Kent, Shinozaki Munehisa, Shibata Shinsuke, Shindo Tomoko, Kitagawa Takahiro, Shibata Reo, Kamata Yasuhiro, Kojima Kota, Nagoshi Narihito, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Okano Hideyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell therapy for spinal cord injury by using human iPSC-derived region-specific neural progenitor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00662-w	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 Teratani Toshiaki, Mikami Yohei, Nakamoto Nobuhiro, Suzuki Takahiro, Harada Yosuke, Okabayashi Koji, Hagihara Yuya, Taniki Nobuhito, Kohno Keita, Shibata Shinsuke, Miyamoto Kentaro, Ishigame Harumichi, Chu Po-Sung, Sujino Tomohisa, Suda Wataru, Hattori Masahira, Matsui Minoru, Okada Takaharu, Okano Hideyuki et al	4. 巻 585
2. 論文標題 The liver-brain-gut neural arc maintains the Treg cell niche in the gut	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 591 ~ 596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2425-3	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 該当する

1. 著者名 Okazaki Isao, Shibata Shinsuke, Ando Wataru, Yanagawa Takayo, Yokomori Hiroaki, Sonoda Akira, Suzuki Norihiko, Yamanouchi Eigo, Okada Shinya, Kamikura Shinichi, Hachimura Kazuaki, Takaki Takashi, Otori Katsuya, Suzuki Yutaka, Okano Hideyuki, Inagaki Yutaka	4. 巻 Volume 7
2. 論文標題 Sequential Matrix Metalloproteinase-1 Expression Triggered by Infiltrating Monocytic Lineage Cells Modulates Pathophysiological Aspects of Human Nonalcoholic Steatohepatitis</p>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metalloproteinases In Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/MNM.S252991	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 Yamaguchi Takefumi, Higa Kazunari, Yagi-Yaguchi Yukari, Ueda Koji, Noma Hisashi, Shibata Shinsuke, Nagai Toshihiro, Tomida Daisuke, Yasu-Mimura Ririko, Ibrahim Osama, Matoba Ryo, Tsubota Kazuo, Hamrah Pedram, Yamada Jun, Kanekura Kohsuke, Shimazaki Jun	4. 巻 6
2. 論文標題 Pathological processes in aqueous humor due to iris atrophy predispose to early corneal graft failure in humans and mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaaz5195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz5195	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 該当する

1. 著者名 Tanaka H, Homma H, Fujita K, Kondo K, Yamada S, Jin X, Waragai M, Ohtomo G, Iwata A, Tagawa K, Atsuta N, Katsuno M, Tomita N, Furukawa K, Saito Y, Saito T, Ichise A, Shibata S, Arai H, Saido T, Sudol M, Muramatsu SI, Okano H, Mufson EJ, Sobue G, Murayama S, Okazawa H.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 YAP-dependent necrosis occurs in early stages of Alzheimer's disease and regulates mouse model pathology.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14353-6.	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 該当する
1. 著者名 Khazaei M, Ahuja CS, Nakashima H, Nagoshi N, Li L, Wang J, Chio J, Badner A, Seligman D, Ichise A, Shibata S, Fehlings MG	4. 巻 12(525)
2. 論文標題 GDNF rescues the fate of neural progenitor grafts by attenuating Notch signals in the injured spinal cord in rodents.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Transl Med	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aau3538.	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 該当する
1. 著者名 Serizawa T, Isotani A, Matsumura T, Nakanishi K, Nonaka S, Shibata S, Ikawa M, Okano H.	4. 巻 146(21)
2. 論文標題 Developmental analyses of mouse embryos and adults using a non-overlapping tracing system for all three germ layers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.174938.	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 Ariyasu D, Kubo E, Higa D, Shibata S, Takaoka Y, Sugimoto M, Imaizumi K, Hasegawa T, Araki K.	4. 巻 160(11)
2. 論文標題 Decreased Activity of the Ghrhr and Gh Promoters Causes Dominantly Inherited GH Deficiency in Humanized GH1 Mouse Models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2673-2691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2019-00306.	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 Hoshino Y, Nishide K, Nagoshi N, Shibata S, Moritoki N, Kojima K, Tsuji O, Matsumoto M, Kohyama J, Nakamura M, Okano H.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 The adeno-associated virus rh10 vector is an effective gene transfer system for chronic spinal cord injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46069-z.	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 Shibata S, Iseda T, Mitsuhashi T, Oka A, Shindo T, Moritoki N, Nagai T, Otsubo S, Inoue T, Sasaki E, Akazawa C, Takahashi T, Schalek R, Lichtman JW, Okano H	4. 巻 13:29
2. 論文標題 Large-area fluorescence and electron microscopic correlative imaging with multibeam scanning electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2019.00029.	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 該当する

1. 著者名 Kirihara T, Luo Z, Chow SY, Misawa R, Kawada J, Shibata S, Khoystatee F, Vollette CA, Levi T, Fujii T, Ikeuchi Y	4. 巻 14
2. 論文標題 A human induced pluripotent stem cell-derived tissue model of a white matter tract connecting two cerebral regions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 301-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.03.012.	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 該当する

1. 著者名 信藤 知子, 井原 諒, 盛一 伸子, 永井 俊弘, 岡野 栄之, 芝田 晋介	4. 巻 2018年12月号 50(14)
2. 論文標題 シナプスレベルの脳回路研究の最先端	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊「細胞」特集・シナプス研究の最先端	6. 最初と最後の頁 679-682
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 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝田 晋介, 井原 諒, 伊勢田 太郎, 信藤 知子, 盛一 伸子, 永井 俊弘, 岡野 栄之,
2. 発表標題 Novel procedure for visualizing specific neural circuit information by using large area correlative light and electron microscopy imaging with multi-beam scanning electron microscopy
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回 日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芝田 晋介, 信藤 知子, 井原 諒, 伊勢田 太郎, 盛一 伸子, 永井 俊弘, 岡野 栄之
2. 発表標題 Large area serial section 3D electron microscope imaging with multi-beam scanning electron microscopy for visualizing neural circuit
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芝田 晋介, 信藤 知子, 井原 諒, 伊勢田 太郎, 盛一 伸子, 永井 俊弘, 岡野 栄之
2. 発表標題 Large area correlative light and electron microscopy imaging with multi-beam scanning electron microscopy for visualizing specific neural circuit
3. 学会等名 NEUR02019第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢田太郎, 芝田 晋介, 三橋隆行, 大坪進矢, 信藤知子, 高橋孝雄, 岡野栄之
2. 発表標題 LA-CLEM: novel procedure for Large area Correlative Light and Electron Microscopy analysis with multi-beam scanning electron microscopy
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会, 第61回日本神経化学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 一瀬綾花, 岡野栄之, 芝田 晋介, 岡澤均, 藤田慶大
2. 発表標題 Localization of Alzheimer's disease early phase marker, phospho-M ARCKS (Ser46) at electron microscopic level
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 電子顕微鏡用試料の作成システム、電子顕微鏡用試料の作成方法およびこれに用いられる プラズマ処理装置、スパッタ装置、テープ搬送機構	発明者 芝田晋介, 信藤知子, 岡野栄之, 後藤修一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-248067	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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			
米国	Harvard University	Chicago University		
カナダ	Toronto University			