

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500311

研究課題名（和文）サブグループ特異的運動神経細胞死における Hox 遺伝子の関与の解明

研究課題名（英文）Involvement of Hox genes in subgroup specific motoneuron death

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

研究成果の概要(和文)：本研究で得られたおもな所見は以下の通り。(1)鳥類胚の頸髄で発生早期に起こる細胞死において、HoxC5とHoxC6発現の吻側端は、それぞれ、細胞死領域の吻側および尾側境界とよく一致する。(2)ホックス遺伝子と協働するFoxP1遺伝子が、細胞死を起こす細胞群に発現する。しかし、その機能的意義について期間内の解明には至らなかった(3)鳥類の頸髄には脳幹の鯉弓性運動神経に相当する神経群が存在する。この細胞群は、特異的な転写因子のPhox2bを発現するので、細胞死を起こす細胞群とは区別される。

研究成果の概要(英文)：Major results of the present study are as follows:

- (1) The rostral ends of HoxC5 and HoxC6 expressions well correspond to the rostral and caudal borders of the segments with early cervical motoneuron death, respectively.
- (2) FoxP1 transcription factor that is known to cooperate with Hox genes for inducing specific motoneuron subgroups is found in dying motoneurons. However, functional significance of FoxP1 in early cervical motoneuron death has not been elucidated yet.
- (3) In the avian cervical cord, there are branchial motoneurons that express Phox2b and never die during the period of early cervical motoneuron death.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:複合領域

科研費の分科・細目:神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード:発生・分化、運動神経細胞、神経細胞死、ホックス遺伝子、転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1)神経系の発生過程に起こる神経細胞死の多くは、神経の生存を支える栄養因子を競合する結果起こるとされるが、一方、このような機序では説明されず、むしろ神経細胞の分化と関連した神経細胞死であると考えられる細胞死があることが示唆されていた。しかし、そのような細胞死が起こる機序についての解析はあまり行われて

いなかった。

(2)研究代表者らは、鳥類胚の頸髄に起こる運動神経の細胞死に関して詳しい解析を行い、細胞死をおこす神経細胞は、4つの転写因子発現の組合せ、すなわち、Isl1+, Isl2+, Lim3-, MNR2+の発現パターンを示すことを明らかにしていた。

(3)しかしながら、同じような発現パターンを示す

運動神経は、頸髄以外にも認められることから、4つの転写因子の発現組合せの他に、頸髄に特異的に働く遺伝子が細胞死に関わっている可能性が示唆された。

(4)脊椎動物の吻尾軸における部位の特異化に関しては、ホメオボックス(ホックス)遺伝子群の関与が古くから知られており、運動神経細胞の吻尾軸特異的分化にもホックス遺伝子C群(HoxC)の関与が明らかとなっていた。

2. 研究の目的

(1)鳥類胚の頸髄で細胞死を起こす運動神経細胞群におけるHox遺伝子やその関連遺伝子の発現を詳細に調べ、細胞死決定に関与する遺伝子の候補を見つける。

(2)(1)の結果に基づき、機能阻害や強制発現系を用いて、それらの遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ホックス遺伝子群の発現パターンをニワトリ胚の頸髄から胸髄領域にかけて詳細に調べた。まずin situ hybridization法を用いて検索し、頸髄およびその前後の領域で発現しているホックス遺伝子を決定した。ついで、それらの遺伝子のタンパク質産物に対する抗体を用いて、細胞レベルの詳細な発現パターンを明らかにした。ホックスの発現は、Isl1, Isl2, Lim3, MNR2などの転写因子の発現パターンや細胞死のマーカーなどとの多重染色を行い、細胞死を起こす細胞における各分子の発現組合せを明らかにした。

(2)(1)で得られた結果に基づいて生体内で機能阻害実験を行ない、細胞死への影響を調べた。発現抑制あるいは機能阻害のために、engrailed遺伝子のレプレッサー領域にHox関連遺伝子のホメオドメインを繋げたコンストラクトをレトロウイルスベクターに挿入し、電気穿孔法で神経管の細胞内に導入した。細胞死への影響を、細胞死検出法で調べた。

4. 研究成果

(1)細胞死が起きる頸髄領域を区画するホックス遺伝子群の同定と詳細な発現パターンが明らかになった。特にHoxC5の発現が細胞死を起こす区域の吻側端と、HoxC6の発現が細胞死を起こす区域の尾側端とほぼ一致することが明らかになった。

頸髄とその周辺のレベルで発現しているホックス遺伝子について、はじめにin situ hybridization法で検索をおこなった。その結果、図1に示すようにHoxC5, C6, A3, A6の4つのホックス遺伝子の発現が認められた。

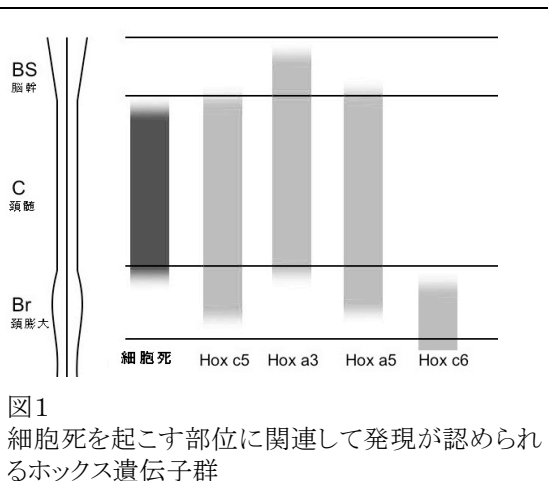


図1
細胞死を起こす部位に関連して発現が認められるホックス遺伝子群

この結果に基づいて、ホックス分子に対する抗体を用いて免疫組織化学的手法を用いて詳細な観察を行った。抗体が入手できなかったものについては、代表者の研究室において作成して使用した。

HoxC5の発現は延髄と頸髄との境界付近から認められるが、その発現は神経管のあるレベルで一様に始まるわけではなく、吻側では運動神経より背側に位置する介在神経に発現が認められ、下方に向かうにつれ腹側に発現が広がり、多くの運動神経に発現が認められるようになる。細胞死はC2セグメントより下方で起こるが、その始まるレベルにほぼ一致して、運動神経細胞群内にHoxc5の発現が認められた。以上の結果はHoxc5の発現が起こることと細胞死との間に関連のあることを示唆する(図2)。

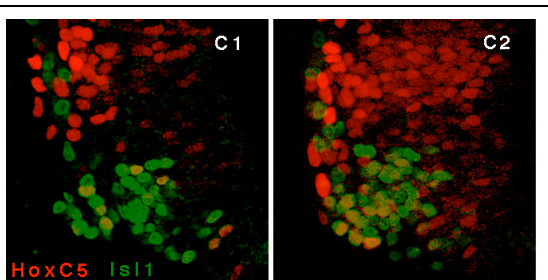


図2
HoxC5(赤)はC1ではおもに運動神経細胞(緑)の背側に認められるが、C2レベルでは運動神経全体に認められるようになる。

HoxC6は頸髄下部で発現が始まり、C13レベルで、細胞死を起こすLim3(-)群での発現が増える。細胞死はC13レベル付近まで認められることから、HoxC6の発現は細胞死が認められる領域の尾側端に一致している可能性が示された(図3)。今後、強制発現実験などで機能の解明を目指す予定である。

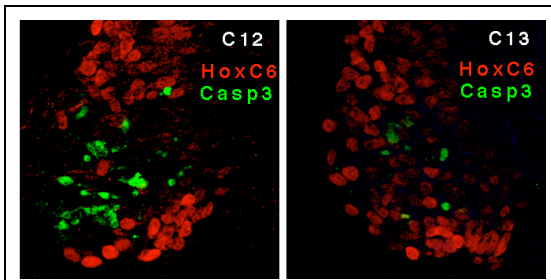


図3

HoxC6(赤)は頸髄下部で発現が認められ始め、頸膨大部が始まる C13 レベルで運動神経細胞全体での発現が始まる。細胞死の分布を細胞死マーカーである活性型カスパーゼ3に対する抗体で染めると(緑)、その分布は HoxC6 の発現と相補的になっている。

また、HoxC 群以外の HoxA3, A5 などに対する抗体の作成も終了しており、今後これらの分子の発現についても解析を進める。

(2) ホックス遺伝子と協同して働き、運動神経の吻尾軸における分化に関与することが知られているホメオドメイン遺伝子である FoxP1 (Forkhead box P1) が、細胞死を起こす細胞群に発現していることが明らかになった。

細胞死が起こる直前の時期に FoxP1 に対する抗体で染色したところ、FoxP1 は細胞死を起こす Lim3(-) の運動神経細胞群と Isl1 のみを発現する運動神経群に発現していることが明らかとなった(図4)。

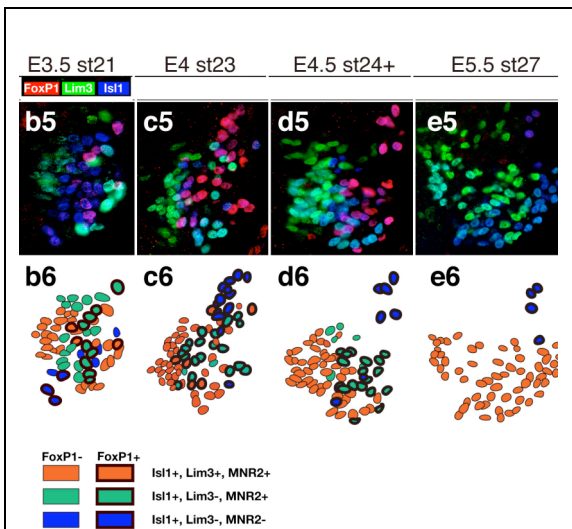


図4

Foxp1 は細胞死を起こす Lim3(-)細胞群と Isl1 のみを発現する細胞群で発現が見られた。

実際に細胞死が進行中の細胞において発現を見ると、細胞死を起こしている細胞の全てにおいて FoxP1 は陽性であることが確認された(図5)。

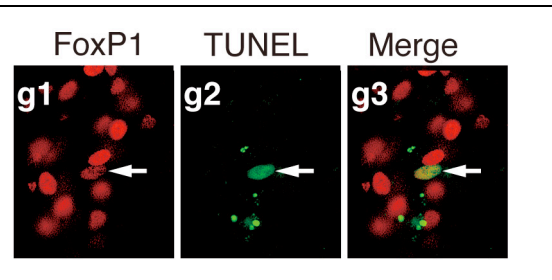


図5

FoxP1 は死につつまる運動神経細胞の核に発現している(矢印)

以上の結果から、FoxP1 が細胞死を起こす運動神経に発現していることが明らかとなったので、この分子の機能が細胞死にとって不可欠なものであるかどうかを確かめるため、FoxP1 のホメオドメインに engrailed のレプレッサー領域を繋げたコンストラクトをレトロウイルスベクターに挿入したプラスミドを電気穿孔法で導入する実験を行った。しかし、運動神経の細胞死には大きな影響見られず、この結果が、導入が上手く行かなかったためによるものか、FoxP1 の機能が細胞死の実行に必須のものでは無かったためなのかについては、期間中に結論が得られなかった。

(3) 脳幹の鰓弓性運動神経に特異的な転写因子であり、ホメオボックスを持つ Phox2b を発現している運動神経が頸髄にあることが判明した。これらは細胞死を起こさない細胞群であることがわかった。

以前の研究から、ニワトリ胚頸髄には、細胞死を起こす Lim3(-)細胞群、細胞死を起こさない Lim3(+)-細胞群、同じく細胞死を起こさない、はじめから Isl1 のみを発現する細胞群の 3 種あることが明らかになっていた(図6)。

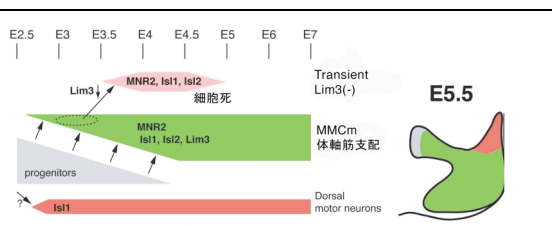


図6

ニワトリ胚頸髄に見られる 3 つの運動神経群

この内、Isl1 のみを発現する神経群がどのような運動神経群であるかについてはこれまで詳しい研究がされていなかった。この神経群は細胞死を起こす神経群と①Lim3 を発現させない、②FoxP1 を発現させるという共通の性質を持っており、本研究が対象としている神経細胞死を起こす群と、どのように性質が異なるかを明らかにしておく必要があった。このため、この神経群の

投射先、軸索経路、発生の詳細、この神経群特異的マーカーの探索を行った。

鳥類の頸髄には、後根から軸索を末梢に送る運動神経が存在していることが100年以上前から知られていた。そこでまずIsl1のみを発現する神経群が、後根から軸索を送る神経群であるかどうかを明らかにするために、逆行性標識トレーサーである標識デキストランを後根神経節ないしは後根が脊髄に入る部位に局限して注入し後根を通る軸索を出すニューロンを標識し、同時に細胞群特異的マーカーの発現を調べた。その結果、Isl1のみを発現する神経群は軸索を後根経由で末梢に送る神経群であることが確認された(図7)。

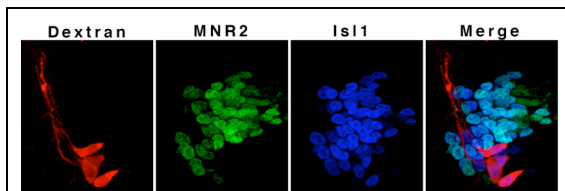


図7
後根部にデキストランを注入して逆行性に標識された神経群はIsl1のみを発現する細胞群であった。

また、前根を切った後デキストランを前角に注入し、この神経群の軸索を順行性に標識したところ、軸索は僧帽筋に達していることが分かった。これは、この神経群が副神経脊髄根を出す神経群に相当することを示している。そこで、延髄において鰓弓性運動神経細胞の発生に重要な役割を果たし、この細胞群の特異的マーカーとされるPhox2b (paired-like-homeobox 2b)の発現を調べたところ、この細胞群は全てPhox2bを発現しているが、細胞死を起こすLim3(-)群の細胞には発現していないことが明らかとなった(図8-1、2)。

さらに、発生部位について調べたところ、Nkx2.2陽性の前駆領域から発生していることもあきらかとなった(図8-3)。これらは、一致して、このIsl1のみ陽性の細胞群は鰓弓性運動神経であることを示している。

(1)から(3)の成果から、鳥類胚の頸髄で神経細胞死を起こす運動神経細胞群に特徴的な転写因子の組合せは、従来の(Isl1+, Isl2+, Lim3-, MNR2+)に加えて、FoxP1+, Phox2b-, HoxC5+, HoxC6-であることが明らかとなった(図8-4)。今後はさらに各々の機能的解析を進める必要がある。

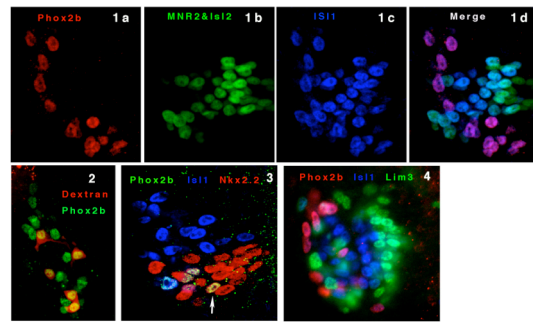


図8
1a-d. Phox2bはIsl1のみ陽性の神経群に発現している。2. Phox2b陽性細胞は後根へのデキストラン注入によって逆行性に標識される。3. Phox2bとNkx2.2の共存が認められ、この神経群はNkx2.2陽性の前駆領域から発生することが示唆された。4. 細胞死を起こす細胞群はLim3-, Phoxb2-, Isl1+の細胞群として同定することができる。

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7件)

- ① Kobayashi K, Masuda T, Takahashi M, Miyazaki J, Nakagawa M, Uchigashima M, Watanabe M, Yaginuma H, Osumi N, Kaibuchi K, Kobayashi K. Rho/Rho-kinase signaling pathway controls axon patterning of a specified subset of cranial motor neurons. Eur J Neurosci. 査読有 2011 Feb;33(4):612-21.
- ② Kato S, Kobayashi K, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M, Kobayashi K. A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. Hum Gene Ther. 査読有 2011 22(2):197-206.
- ③ Masuda T, Kai N, Sakuma C, Kobayashi K, Koga H, Yaginuma H. Laser capture microdissection and cDNA array analysis for identification of mouse KIAA/FLJ genes differentially expressed in the embryonic dorsal spinal cord. Brain Res. 査読有 2009 1249:61-7.
- ④ Homma S, Shimada T, Hikake T, Yaginuma H. Expression pattern of LRR and Ig domain-containing protein (LRRIG protein) in

the early mouse embryo. Gene Expr Patterns.
査読有 2009 9(1):1-26
⑤ Masuda T, Watanabe K, Sakuma C, Ikenaka
K, Ono K, Yaginuma H. Netrin-1 acts as a
repulsive guidance cue for sensory axonal
projections toward the spinal cord.
J Neurosci. 査読有 2008 28(41):10380-5

[学会発表] (計 10 件)

- ① 八木沼 洋行, Lenhosse'k-Cajal ニューロン
(後根経由で軸索を出す運動ニューロン)の投射
先と発生について、日本解剖学会第 56 回東
北・北海道連合支部学術集会 平成 22 年 9 月
25 日、旭川
- ② 本間 俊作、神経系のプログラム細胞死期
における ISLR2 の発現様式、第 33 回日本神経科
学大会、平成 22 年 9 月 2 日、神戸
- ③ 八木沼洋行、発生課程の運動ニューロンの
死に顔、第 115 回日本解剖学会総会・全国学術
集会、平成 22 年 3 月 29 日、盛岡
- ④ 西山 慶治、マウスの脊髄運動ニューロンの
発生分化に関わる転写因子と細胞死について、
第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、平
成 22 年 3 月 29 日、盛岡
- ⑤ 八木沼 洋行、頸髄特異的な早期運動神経
細胞死の決定に関与する Foxp1、第 114 回日本
解剖学会総会・全国学術集会、平成 21 年 3 月
30 日、岡山

[その他]

ホームページ

<http://www.fnu.ac.jp/cms/anatomy1/index.htm>
1

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

西山 慶治 (NISHIYAMA KEIJI)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10106354

本間 俊作 (HOMMA SHUNSAKU)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20261795

増田 知之 (MASUDA TOMOYUKI)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70372828

(3) 連携研究者
なし