

機関番号 : 32202

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008 年度～2010 年度

課題番号 : 20590177

研究課題名 (和文) 末梢神経系発生に關与するパイオニアニューロンの解析

研究課題名 (英文) Role of pioneer neurons in development of peripheral nervous system

研究代表者 池田 啓子 (KEIKO IKEDA)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10265241

研究成果の概要 (和文) :

近年申請者が *Six1* ノックアウトホモマウスの解析を通じて発見・同定した嗅上皮発生初期に出現するパイオニアニューロンは、末梢神経系と中枢神経系が最初につながる場、すなわち上皮の一定の場所から軸索が最初に嗅球にむかって出て行く場を提供するものである。このパイオニアニューロンへの分化を司る遺伝子ネットワークを解明するために、野生型マウスと *Six1* ノックアウトホモマウスの嗅上皮 (鼻プラコード) から RNA を抽出し、アレイ解析を行った。有意に差がある候補遺伝子が、100 種類程度見つかり、*in situ hybridization* にて、野生型での発現を確認した。そのうち嗅上皮で発現するものについてはホモマウスでの発現を確認し、有意に差があるもの 10 数種類に絞りこみ、発生関連遺伝子数種について、該遺伝子ノックアウトマウス胚の供与を受け、解析を行った。さらに残りの発生関連遺伝子については、嗅上皮組織培養系を用いて解析した。レチノイン酸依存的に発現が誘導される遺伝子群数種が、ノックアウトホモマウスで発現が有意に上昇していたため、組織培養系で再現できるかどうかについて検証したが、明確な結果は出なかった。培養細胞を用いたりポーターアッセイでは、*Six1* のリポーター抑制効果は検出されなかった。ニワトリ胚を用いて、鼻プラコード、*Epibranchial placode* のパイオニアニューロンの同定を、chick *Six1* 遺伝子発現により同定し、嗅上皮発生後期の、*Six1* 遺伝子の役割を同定し、発表した。

研究成果の概要 (英文) :

The olfactory epithelium (OE) is derived from the olfactory placode (OP) during mouse development. At embryonic day (E) 10.0-E10.5, "early neurogenesis" occurs in the OE, which includes production of pioneer neurons that emigrate out of the OE and other early-differentiated neurons. Pioneer neurons migrate out OP/OE and localize between OP/OE and the forebrain. The importance of pioneer neurons are important the first connection between peripheral and central nervous system during the development. To uncover the molecular mechanism that govern this connection, we investigated the genes involved in the production of pioneer neurons using *Six1*^{-/-}, because *Six1*^{-/-} shows total absence of pioneer neurons and their derivatives. We identified several candidate genes working under *Six1*. Interestingly, some of them are involved in retinoic acid signaling pathways. Others are genes whose products are important for cell-cell communication, such as Notch and Jagged. In parallel, we found that *Six1* is expressed in both apical and basal progenitors at later stages. In *Six1*^{-/-}, apical proliferating cells were absent and no morphologically identifiable sustentacular cells were observed. Consistently, the expression of *Notch2* and *Jagged1* in the apical layer was absent in *Six1*^{-/-}. Basal proliferating cells were observed in *Six1*^{-/-}, but the expression of *Ngn1*, *NeuroD*, *Notch1*, and *Jagged2* in the basal layer was absent. In sum, *Six1* regulates the expression of Notch, Jagged, and other neurogenic bHLH transcription factors for production of pioneer neurons, apical progenitors, and basal progenitors.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000

年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学、発生学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：Six 遺伝子、パイオニアニューロン、末梢神経系、嗅上皮、発生、ノックアウトマウス、レチノイン酸、組織培養

1. 研究開始当初の背景

嗅覚器に存在する嗅神経は、細胞体を外界に面した上皮内に有し、軸索を嗅球（中枢神経系）にむかって投射する末梢神経系の1つである。末梢神経系と中枢神経系が最初につながる機構、すなわち上皮の一定の場所から軸索が最初に嗅球にむかって出て行く機構について、ほ乳類ではほとんど解明されていなかった。*Six1*^{ノックアウト}ではこのパイオニアニューロンの分化が完全に欠損しており、その結果、その後分化する嗅神経細胞の軸索が脳に投射できず、軸索は鼻腔内に留まっていた。同様に、嗅上皮から発生する GnRH ニューロンも脳内に移動できず鼻腔内に留まっていた。以上の結果から、哺乳類においてもパイオニアニューロンが、中枢神経系と末梢神経系の最初のつながりを形成することがわかった。

2. 研究の目的

Six1^{ノックアウト}ではパイオニアニューロンの分化が完全に欠損しているため、野生型とノックアウトマウスの形態学的、発生学的比較解析を行い、中枢神経系と末梢神経系の最初のつながりが形成される際の分子基盤解明を目指した。

3. 研究の方法

①パイオニアニューロンへの分化を司る遺伝子ネットワークの解明するために、野生型とノックアウトマウスの嗅上皮を採取し、遺伝子発現パターンの違いを同定する。②上記で同定された遺伝子について、発生段階における発現パターンの検証と、嗅覚器以外の末梢神経系発生における遺伝子発現を、野生型とノックアウトで検証する。

4. 研究成果

野生型マウスと *Six1* ノックアウトホモマウスの嗅上皮（鼻プラコード）から RNA を抽出し、アレイ解析を行った。有意に差がある候補遺伝子が、100 種類程度見つかり、*in situ hybridization* にて、野生型での発現を確認した。そのうち嗅上皮で発現するものについてはホモマウスでの発現を確認し、有意に差があるもの 10 数種類に絞りこみ、発生関連遺伝子数種について、該遺伝子ノックアウトマウス胚の供与を受け、解析を行った。残りの発生関連遺伝子については、Raj Radher 博士に手法を習

い、嗅上皮組織培養系を用いて解析した。レチノイン酸依存的に発現が誘導される遺伝子群数種が、ノックアウトホモマウスで発現が有意に上昇していたため、組織培養系で再現できるかどうかについて検証したが、明確な結果は出なかった。培養細胞を用いたリポーターアッセイでは、*Six1* のリポーター抑制効果は検出されなかった。ニワトリ胚を用いて、鼻プラコード、Epibranchial placode のパイオニアニューロンの同定を、chick *Six1* 遺伝子発現により同定し、嗅上皮発生後期の、*Six1* 遺伝子の役割を同定した。

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 9 件)

1. Sato S, Ikeda K, Shioi G, Ochi H, Ogino H, Yajima H, Kawakami K. Conserved expression of mouse *Six1* in the pre-placodal region (PPR) and identification of an enhancer for the rostral PPR. *Dev Biol* 344, 158-171, 2010.
2. Ikeda K, Kageyama R, Suzuki Y, Kawakami K. *Six1* is indispensable for production of functional apical and basal progenitors during olfactory epithelial development. *Int J Dev Biol* 54,1453-1464, 2010.
3. Suzuki Y, Ikeda K, Kawakami K. Regulatory role of *Six1* in the development of taste papillae. *Cell Tissue Res* 339, 513-525, 2010.
4. Yajima H, et al., 10 人、5 番目 *Six1* family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp Cell Res* 316, 2932-2944, 2010.
5. Suzuki Y, Ikeda K, Kawakami K. Expression of *Six1* and *Six4* in mouse taste buds. *J Mol Histol* 41(4-5):205-214, 2010.
6. Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. *Phox2b* expressing neurons in the most rostral medulla of newborn rats. *Adv Exp Med Biol* 669, 87-90, 2010.
7. Yamashita T, et al., 6 人、4 番目 *Opn5* is a UV-sensitive bistable pigment that couples

with Gi subtype of G protein. Proc Natl Acad Sci 107, 22084-22089, 2010.

8. Tani M, Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K, Homma I. Menthol inhibits respiratory rhythm in the brainstem preparation of newborn rats. Neuro Rep 21, 1095-1099, 2010.
9. Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. Phox2b, RTN/pFRG neurons and respiratory rhythmogenesis. Respiratory Physiol Neurobiol 168, 13-18, 2009.

[学会発表] (計 12 件) 先頭が発表者

1. Kawakami K, Yajima H, Ikeda K, Sato S. Roles of Six family genes in differentiation and evolution of primary sensory neurons. The 18th CDB Meeting, Common Themes and New Concepts in Sensory Formation, Kobe, April 13-15, 2009. (Abstracts: p.84-85) (一般発表)
2. Ikeda K, Kawakami K. Expression pattern of neural crest marker genes and PPR marker Six1 in early mouse embryos. The 18th CDB Meeting, Common Themes and New Concepts in Sensory Formation, Kobe, April 13-15, 2009. (Abstracts: p.116) (一般発表)
3. Yajima H, Suzuki M, Ikeda K, Sato S, Ueno N, Kawakami K. The key regulator in the evolution of trunk primary sensory neurons. The 18th CDB Meeting, Common Themes and New Concepts in Sensory Formation, Kobe, April 13-15, 2009. (Abstracts: p.158-159) (一般発表)
4. Sato S, Ikeda K, Hayashibara Y, Nakao K, Aizawa S, Ochi H, Ogino H, Kawakami K. Characterization of Six1 enhancers: implication for the development and evolution of PPR and sensory placodes. The 18th CDB Meeting, Common Themes and New Concepts in Sensory Formation, Kobe, April 13-15, 2009. (Abstracts: p.146-147) (一般発表)
5. Kawakami K, Sato S, Ikeda K, Kiyonari H. Identification and characterization of Six1 enhancers. Society for Developmental Biology 68th Annual Meeting, San Francisco, July 23-27, 2009. (Abstracts / Developmental Biology 331: A160-A161) (一般発表)
6. Ikeda K, Kawakami K. Preplacodal region marked by Six1 in mice. Society for Developmental Biology 68th Annual Meeting, San Francisco, July 23-27, 2009. (Abstracts / Developmental Biology 331: A98-A99) (一般発表)

7. Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K. Phox2b immunoreactivity of the parafacial respiratory group neurons. The XIth Oxford conference on modeling and control of breathing --- New frontiers in respiratory control, Nara, July 24-26, 2009. (X Abstracts: p.125)(シンポジウム)
8. Yajima H, Suzuki M, Ikeda K, Sato S, Ueno N, Kawakami K. Key regulator for the transition from intra- to extra-spinal sensory neurons in the craniates. Chicago, Neuroscience 2009, October 18, 2009. (Program: p.82) (一般発表)
9. Ikeda K, Kageyama R, Kawakami K. Six1 is essential for production of functional apical and Basal progenitors during olfactory epithelial development. CDB Symposium 2010, Frontiers in Organogenesis, Kobe, March 23-25, 2010. (Program: L01) (一般発表)
10. Yajima H, Suzuki M, Ochi H, Ikeda K, Sato S, Ogino H, Ueno N, Kawakami K. Six1 acts as a molecular switch of primary sensory systems from Rohon-beard cells to DRG neurons. The 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription. Okinawa, July 1-5, 2010. (Program : ORAL VI-5) (シンポジウム)
11. Ikeda K, Kageyama R, Kawakami K. Six1 is indispensable for production of functional apical and basal progenitors during olfactory epithelial development. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting, Albuquerque, August 5-9, 2010. (Developmental Biology : A108) (一般発表)
12. Kawakami K, Yajima H, Suzuki M, Ochi H, Ikeda K, Sato S, Ogino H, Ueno N. Developmental switch of primary sensory system from Rohon-Beard cells to Dorsal root ganglia. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting, Albuquerque, August 5-9, 2010. (Developmental Biology : A141) (一般発表)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 啓子 (KEIKO IKEDA)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10265241

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無