

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790164

研究課題名（和文）末梢感覚神経系の形成におけるニューロナルロイシンリッチリピート4の機能解析

研究課題名（英文） Dynamic expression pattern of Neuronal leucine-rich repeat 4 in mouse sensory neurons during development

研究代表者 板東 高功 (BANDO TAKAYOSHI)

和歌山県立医科大学 医学部 学内助教

研究者番号：00423963

研究成果の概要（和文）：

脊髄神経節の発生過程における NLRR4 遺伝子の詳細な発現解析を行った。脊髄神経節には様々な機能を持った1次感覚神経細胞が存在することが知られているが、それぞれの細胞が誕生する時期、投射を行う時期、神経細胞の成熟の時期などは、神経細胞の種類によって異なっている。NLRR4 は、固有感覚や機械刺激受容を担い成熟の早い TrkC 陽性の神経細胞で発現し始め、痛覚を担う TrkA 陽性の成熟の遅い神経細胞では、TrkC 陽性の神経細胞より遅れて発現することを見出した。また、NLRR4 の発現する時期はそれぞれの神経細胞が脊髄において、二次神経細胞とシナプスを形成する時期と一致した。これらのことから、NLRR4 は一次感覚神経細胞のシナプス形成に関与することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the expression of NLRR-4 in the adult and developing dorsal root ganglia (DRGs). Northern blotting analysis revealed that the expression of NLRR-4 mRNA was detected between postnatal day (P) 0 and adult DRGs, in particular, the strong expression was observed at P0 and P7. *In situ* hybridization histochemistry showed that NLRR-4 mRNA was exclusively detected in the small-sized DRG neurons of the adult mice. Likewise, LacZ staining in NLRR-4 heterozygote mice revealed that LacZ-positive neurons were observed in 8% of the total DRG neurons, and this frequency was similar to the results of *in situ* hybridization histochemistry. Approximately 42% of NLRR-4-positive neurons contained receptor tyrosine kinase (Trk) A immunoreactivity, and 58% expressed Ret immunoreactivity in the adult mice. In the developing DRGs, NLRR-4 expression was first detected in 7% of total DRG neurons at embryonic day (E) 13.5, gradually increased, and reached the maximum level to 44% at E17.5. The percentage of LacZ-positive neurons in total neurons changed little between E17.5 and P7, and drastically reduced after P7. As a results of characterization for NLRR4-expressing neurons during development, NLRR4-positive neurons mainly expressed TrkC at E13.5. Between E17.5 and P0, NLRR-4-positive neurons contained predominantly TrkA-immunoreactivities. TrkC-positive neurons are earlier matured compared with TrkA-positive neurons such as axonal innervation into the spinal cord, synaptic formation, and synaptic maturation. These results suggested that NLRR-4 might play a role in the synapse formation of DRG neurons contacting to the secondary neurons in the spinal cord.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：細胞機能形態学

1. 研究開始当初の背景

脊髄神経節には固有感覚、機械刺激受容、温度感覚、痛覚など様々な機能をもった感覚神経細胞が存在することが知られている。様々な神経細胞が存在しているにもかかわらず、各々の神経細胞は秩序だった投射パターンを示すことが知られている。しかしながら、その分子機構は不明な点が多い。正確な投射を行うには細胞接着因子の使い分けが重要であることが考えられるが、脊髄神経節の形成過程における細胞接着因子の機能解析は進んでいない。

2. 研究の目的

NLRR4は、I型の膜タンパク質で細胞接着因子として働いていると考えられ、中枢神経系では、海馬、大脳皮質、小脳などで発現が認められる。しかしながら、末梢神経系での発現及びその機能は不明である。そこで本研究課題では末梢神経系でのNLRR4の発現解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *in situ* hybridization法によるNLRR4 mRNAの発現解析

(2) β -gal染色によるNLRR4発現細胞の同定

(3) β -gal染色と免疫組織化学法を組み合わせたNLRR4発現細胞の分類

4. 研究成果

(1) 成獣の脊髄神経節におけるNLRR4の発現細胞

成獣の脊髄神経節におけるNLRR4 mRNAの発現を*in situ* hybridization法を用いて解析した。NLRR4は約8%の神経細胞に発現して

いた(図1A, B)。脊髄神経節の神経細胞には、その細胞の大きさによって機能的に分類することができることが知られているので、*in situ* hybridization法を用いて同定したNLRR4発現細胞の大きさを測定したところ、NLRR4陽性細胞は、痛覚受容を行う小型の神経細胞であった(図1C)。このことから成獣において、NLRR4は痛覚系において何らかの機能をしていること示唆した。

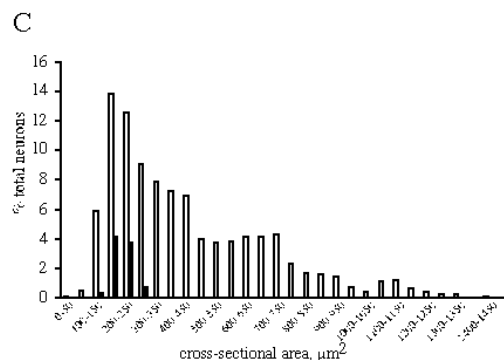
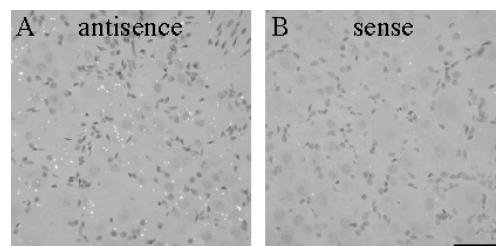


図1 成獣の脊髄神経節におけるNLRR4 mRNAの発現とNLRR4発現細胞のサイズ
□全神経細胞、■NLRR4陽性神経細胞

(2) 発生過程の脊髄神経節におけるNLRR4の発現。

β -gal 染色法を用いた発生過程の脊髄神経節における NLRR4 の発現を解析した。NLRR4 の発現細胞は胎生 13.5(E13.5)から認められ、E17.5 までは発生に伴って NLRR4 陽性神経細胞の頻度が増加した。E17.5 から生後 7 日 (P7) において、その頻度は一定であったが、P7 以降はその頻度が急激に減少することを見出した。このことは、NLRR4 が胎生後期から出生後 1 週の間重要な機能を有することを示唆した (図 2)。

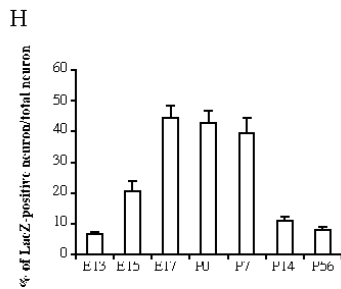
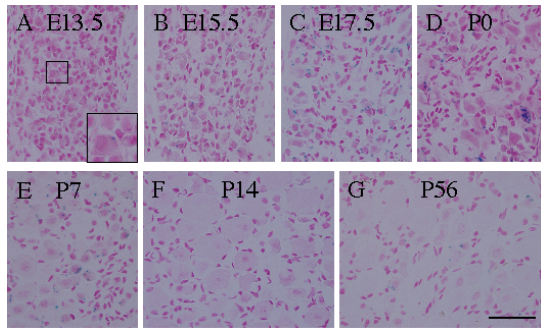


図 2、発生過程の脊髄神経節における NLRR4 の発現

(3) 発生過程の脊髄神経節における NLRR4 陽性細胞の分類

図 2 で示したように、脊髄神経節の発生過程において、NLRR4 の発現が劇的に変化することを見出したので、発生過程における NLRR4 発現細胞の分類を試みた。Trk や ret は脊髄神経節の神経細胞を機能的に分類する有力なマーカー分子であるので、 β -gal 染色による NLRR4 の発現とこれらのマーカー分子の免疫組織化学的染色との二重染色を行なった。E13.5 においては、NLRR4 陽性神経細胞は主に TrkC を発現していた。また、E17.5 から P0 においては主に TrkA を、P7 においては主に TrkA と Ret を発現していた (図 3A、図 3B)。NLRR4 は早熟の固有感覚や機械刺激受容を担う TrkC 陽性の神経細胞で発現し始め、成熟の遅い痛覚受容を行う TrkA 陽性の神経細胞では TrkC 陽性の神経細胞より遅れて発現することを見出した。また、NLRR4 の発現する時期はそれぞれの神経細胞が脊髄において、2 次神経細胞とシナ

プスを形成する時期と一致しており NLRR4 が一次感覚神経細胞のシナプス形成に關与する可能性が示唆された。

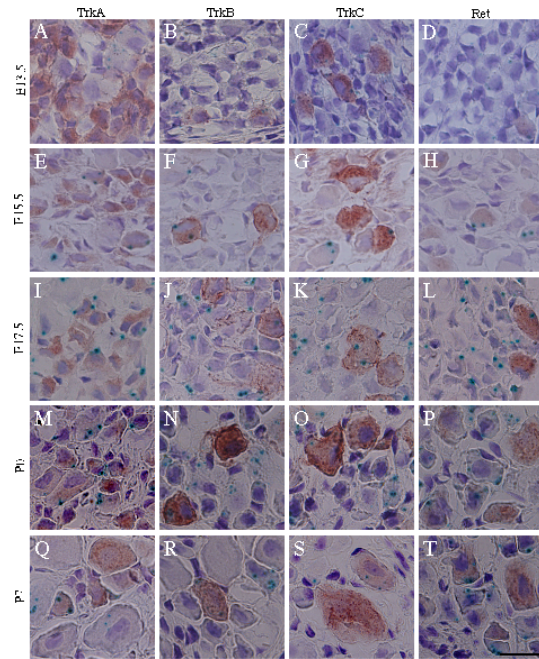


図 3A、発生過程における NLRR4 陽性神経細胞の分類

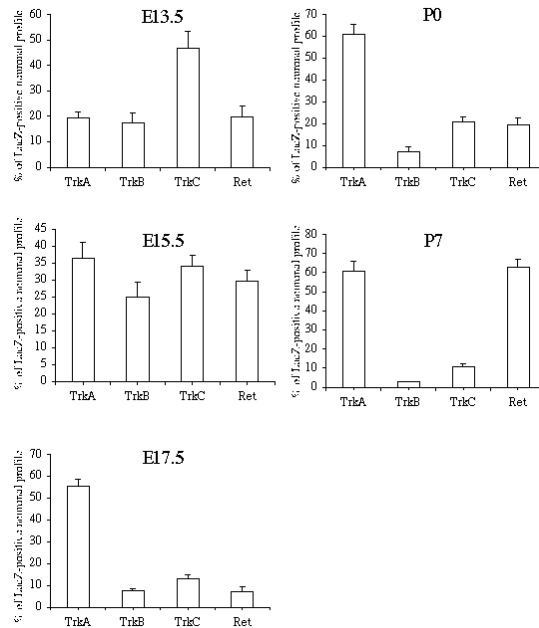


図 3B、発生過程における NLRR4 陽性細胞の TrkA、TrkB、TrkC、Ret の発現頻度

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 日本神経科学学会 名古屋 2009 年 9 月
16 日 P1-f14
一次感覚神経の発生過程における Neuronal
leucine-rich repeat 4 の発現
板東高功、森川吉博、宮島篤、仙波恵美子

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igaku/160412/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 高功 (BANDO TAKAYOSHI)
和歌山県立医科大学、医学部、学内助教
研究者番号 : 00423963

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :