

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15917

研究課題名（和文）視床下部神経系の軸索誘導・伸長機序の解明：マウスES細胞器官誘導系における検討

研究課題名（英文）Elucidation of the axon guidance and elongation mechanisms in the hypothalamic neurons: Investigation in the differentiation of mouse ES cells

研究代表者

河田 美穂 (Kawata, Miho)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：90761601

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）：視床下部-下垂体系の軸索誘導機構には未知の点が多い。これを解決するために、マウス ES 細胞 (mESCs) からの視床下部ニューロンの分化誘導系を用いた解析を行った。その結果、mESCs 由来視床下部ニューロンを同所性移植した場合にのみ下垂体まで軸索が投射されること、下垂体への軸索投射には近傍の外部環境に依存した走触性機序が働いている可能性が高いことが明らかになった。さらに、軸索誘導に関与すると予想される候補分子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部ニューロンの軸索誘導に関するこれまでの研究はいずれも拡散性分子による走化性機序を示すものであった。本研究は、それらの報告とは異なる、走触性機序による新たな軸索誘導機構を提案する。また、本研究で見出した候補分子群の機能解析を進めることで、視床下部ニューロンの軸索誘導・伸長機構の詳細が明らかになるとともに、それらの知見が視床下部・下垂体疾患の治療や再生医療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of axon guidance in the hypothalamus-pituitary system is still unknown. To solve this problem, we analyzed the mouse ES cells (mESCs)-derived hypothalamic neurons. We found that the graft-derived axons project to the posterior pituitary only when mESCs-derived hypothalamic neurons are orthotopically transplanted, and that axon projection to the pituitary gland is likely to be mediated by a haptotaxis mechanism that depends on the external environment nearby. Furthermore, we found the candidate molecules predicted to be involved in axon guidance and elongation.

研究分野：神経科学

キーワード：マウス ES 細胞 視床下部 下垂体 軸索伸長 軸索ガイダンス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

再生研究の発展により、マウスやヒトの多能性幹細胞から視床下部および下垂体組織を分化誘導する技術が確立されたが [1, 2]、それらの組織を実際に動物脳内へ移植した研究は少ない。申請者らは、マウス ES 細胞 (mESCs) から分化誘導した視床下部ニューロンを動物脳内へ正所性移植する実験を進めてきた。その過程で、マウス視索上核 (SON) 領域へ移植した細胞が、内在性視床下部神経と類似した軸索投射パターンを示し、移植 3 ヶ月経過後には下垂体後葉まで軸索を伸長することを見出した。この結果を受けて、視床下部ニューロンの下垂体後葉への軸索伸長を促進することができれば、より早く多くの軸索を下垂体後葉へ誘導することができ、細胞移植後の早期病態改善も見込めるのではないかと考えた。例えば、中脳ドパミン神経細胞においては、神経突起伸長分子が特定され、それらの発現を操作することで軸索伸長を促進し、再生医療へ応用する試みが為されている [3]。しかしながら、視床下部-下垂体系においては上記のような試みが国内外において実施されておらず、その理由として、視床下部-下垂体系の軸索誘導機構の知見の少なさが考えられた。そこで、当講座で確立した mESCs からの視床下部ニューロンの分化誘導系や移植技術を用いることで、軸索誘導機構を解明することを着想した。

2. 研究の目的

mESCs からの視床下部ニューロン分化誘導系を用いて、視床下部神経の軸索誘導および伸長機構の解明を目指す。特に、視床下部-下垂体系に着目し、軸索投射様式を明らかにすると共に、軸索誘導および伸長を担う標的分子の同定を行い、再生医療へ応用することを目指す。

3. 研究の方法

同所性移植により、移植細胞の視床下部から下垂体への軸索投射が確認されたため、異所性移植した場合でも下垂体への軸索投射が誘導されるのかを検討した。無血清凝集浮遊培養法 (SFEBq/gfCDM) によって mESCs から分化誘導した視床下部ニューロンを、AAV-CAG-tdTomato ベクターにより赤色標識した後、成体マウスの SON に同所性移植する群と、黒質網様部 (SNr) に異所性移植する群にわけて、それぞれの移植細胞の軸索投射領域を比較した。この実験により、下垂体への軸索投射が移植細胞自律的に誘導されるものなのか、あるいは、外部環境の影響を受けて誘導されるものなのかを検討した。軸索ガイダンス機構には、拡散性分子によって誘導される走化性と細胞接着によって誘導される走触性の 2 種類の作用様式がある。走化性機序の影響を調べるために、成体ラット脳から視床下部領域と下垂体組織を切り出し、一定の間隔をあけて同一容器内に配置して共培養を行い、下垂体方向へ軸索が伸長するか検討した。また、上記と同様に、mESCs 由来視床下部ニューロン凝集塊と下垂体組織との共培養も行った。視床下部ニューロンの軸索誘導を担う分子を絞り込むため、PCR により主要な軸索ガイダンス分子群 (ネトリン、セマフォリン・プレキシシン・ニューロピリンファミリー、Slit・Robo ファミリー等) の発現を検討した。サンプルには、軸索の伸長が開始する誘導 14 日目の未成熟な mESCs 由来視床下部ニューロンと、軸索が発達した誘導 28 日目の成熟ニューロンを用いた。上記の 2 群間で発現が変動する分子を探索することで、視床下部ニューロンの軸索伸長に機能する分子を同定することを目指す。上記の実験に加えて文献検索も行い、それによって絞り込んだ複数の候補分子について、実際に、生体の視床下部-下垂体領域内においても発現が見られるのか免疫染色により検討した。この実験では、軸索ガイダンス分子の発現が豊富なマウス胎児脳をサンプルに用いた。

4. 研究成果

まず、移植した mESCs 由来視床下部ニューロンの軸索投射パターンが、同所性移植した場合と異所性移植した場合で変化するか検討した。その結果、移植細胞が軸索を投射する脳領域は移植する部位によって変わることが明らかとなり、下垂体後葉への軸索投射は同所性移植した場合でのみ観察された (図 1)。また興味深いことに、同所性移植した群では、移植細胞の軸索が宿主のバゾプレシン、オキシトシンニューロン軸索束に沿って伸長する様子が観察された。このことから、下垂体への軸索投射は、移植細胞自律的に誘導されるのではなく、外部環境の影響を受けて誘導される可能性が高いことが明らかとなった (図 2)。軸索ガイダンス機構には走化性と走触性の 2 種類の作用様式がある。走化性機序の関与を検討するため、視床下部と下垂体組織の共培養と、mESCs 由来視床下部ニューロン凝集塊と下垂体組織との共培養を行った。その結果、

いずれの実験においても下垂体方向特異的な軸索伸長は観察されなかった。上記の移植と共培養の実験結果から、走化性機序の関与は少なく、走触性機序によって視床下部から下垂体への軸索投射が行われる可能性が示唆された。mESCs 由来視床下部ニューロンをサンプルに用いて、PCR により主要な軸索ガイダンス分子の発現を検討した。軸索発達が未成熟な分化誘導 14 日目と成熟した分化誘導 28 日目の

ニューロンの PCR の結果を比較したところ、成熟した段階で発現が上昇あるいは減少する分子それぞれを見出すことができた。上記で絞り込んだ候補分子と、文献検索により候補に挙げられた分子群について、それらが実際に生体の視床下部-下垂体領域内においても発現しているのかを免疫染色により検討した。軸索ガイダンス分子の発現が豊富なマウス胎児脳を用いて検討した結果、下垂体後葉へ伸長するパソプレシンニューロンの軸索上や下垂体後葉において高発現する複数の分子を見つけた。

以上、本研究により視床下部-下垂体系の軸索伸長様式とそれに関与する候補分子を同定することができた。今後は候補分子の機能解析を進め、視床下部-下垂体系の軸索伸長機構の解明と、視床下部・下垂体疾患に対する治療や再生医療への応用を目指す。

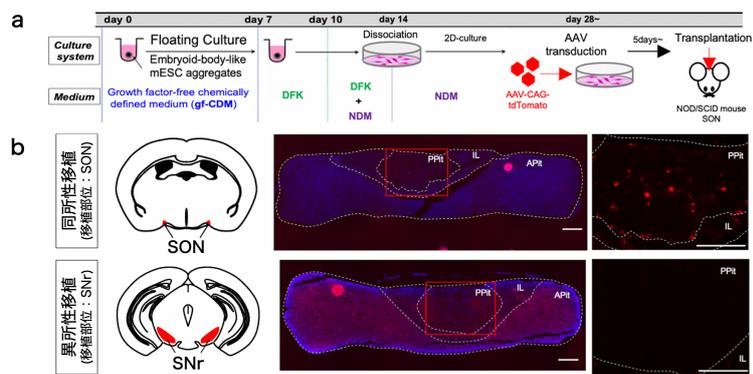


図1. 同所性移植・異所性移植した場合の移植細胞の軸索投射パターン
a) mESCs の視床下部ニューロンへの分化誘導と移植のプロトコル。
b) 上段：同所性移植、下段：異所性移植した場合の宿主下垂体の像。上段の同所性移植した場合のみ、移植細胞由来の tdTomato 陽性反応が下垂体後葉で観察された。スケールバー：200 μm

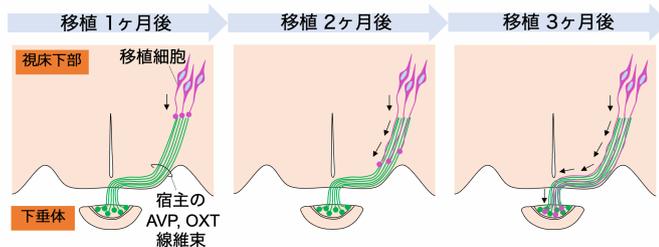


図2. 移植した視床下部ニューロンの想定される軸索投射メカニズム
移植細胞は周囲の外部環境を手がかりとして軸索を伸長する可能性がある。

<引用文献>

- 1) Wataya et al., Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(33):11796-801. (2008) doi: 10.1073/pnas.0803078105.
- 2) Kasai et al., Hypothalamic Contribution to Pituitary Functions Is Recapitulated In Vitro Using 3D-Cultured Human iPS Cells. *Cell Rep.* 30(1):18-24.e5. (2020) doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.009.
- 3) Izumi et al., Integrin $\alpha 5 \beta 1$ expression on dopaminergic neurons is involved in dopaminergic neurite outgrowth on striatal neurons. *Sci Rep.* 7:42111. (2017) doi: 10.1038/srep42111.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miho Kawata, Yu Kodani, Mahito Ohkuma, Ei-Ichi Miyachi, Yoko S Kaneko, Akira Nakashima, Hidetaka Suga, Toshiki Kameyama, Kanako Saito, Hiroshi Nagasaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Long-range axonal projections of transplanted mouse embryonic stem cell-derived hypothalamic neurons into adult mouse brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0276694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0276694	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河田 美穂、小谷 侑、亀山 俊樹、齋藤 加奈子、中島 昭、長崎 弘
2. 発表標題 マウス ES 細胞由来視床下部神経の正所性移植と軸索投射の解析
3. 学会等名 第 47 回 日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河田美穂、小谷 侑、亀山俊樹、中島 昭、長崎 弘
2. 発表標題 同種移植されたマウス ES 細胞由来視床下部神経は下垂体後葉に軸索投射する
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河田美穂、小谷 侑、亀山俊樹、齋藤加奈子、中島 昭、長崎 弘
2. 発表標題 同種移植したマウス ES 細胞由来視床下部神経の軸索投射様式の解析
3. 学会等名 第52回藤田学園医学会
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------