

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590218

研究課題名（和文） 脊髄特異的な新規遺伝子群の感覚神経ネットワーク形成における機能の解析

研究課題名（英文） Analyses of novel genes expressed in the embryonic spinal cord with reference to the sensory axonal guidance

研究代表者

増田 知之 (MASUDA TOMOYUKI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70372828

研究成果の概要（和文）：発生初期の脊髄神経節細胞（DRG）の軸索は脊髄背側からの誘引作用によって脊髄背外側部に侵入する。本研究ではこの誘引メカニズムの解明を目指し、脊髄背側部に発現する新規遺伝子群に注目して解析を進めた。その結果、*mouse Fukushima 1 (mF1)* と命名した遺伝子の遺伝子産物が DRG 軸索を誘引する活性を有することを見出した。電気穿孔法の結果と考え併せると、mF1 が脊髄背側部由来誘引因子の有力候補であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：During early development, the dorsal spinal cord-derived cue chemoattracts dorsal root ganglion (DRG) axons toward the dorsal root entry zone. To identify the molecular nature of this chemoattraction, we examined the function of novel genes expressed in the embryonic dorsal spinal cord. We revealed that a protein encoded by *mouse Fukushima 1 (mF1)* exerted an attractive activity for DRG axons. These results suggest that mF1 may be a candidate for the dorsal spinal cord-derived attractant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・組織，発生・分化，神経科学，脳・神経

1. 研究開始当初の背景

発生初期の脊椎動物胚において、脊髄神経節細胞（DRG）の軸索は二極性に伸び出し、末梢と中枢の標的組織に向けて伸長することが知られているが、その分子機構はよくわかっていなかった。私たちは、脊索等の非標的組織の出す軸索反発因子が軸索を「通せんぼ」することで、このガイダンスに重要な役

割を果たすこと、およびその分子メカニズムを明らかにしてきた。一方で私たちは、DRGの軸索が脊髄背外側部の中間標的（エントリーゾーン）に向かう現象に軸索誘引メカニズムが関与することも明らかにした。しかしながら、脊髄背側部由来の軸索誘引因子の分子実体は依然としてわかっていない。

そこで私たちは、脊髄背側部由来の軸索誘

引作用の実体解明にあたり、レーザーマイクロダイセクション法を用いてエントリゾーンを含む脊髄背側部を選択的に切り出し、この領域に特異的な cDNA を得ることに成功した。平成 19-20 年度には科学研究費の補助を受け、この cDNA を用いたマイクロアレイを行い、候補となる遺伝子の絞り込みを行った。さらに、各候補遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で確認し、最終的に脊髄背側部に発現を有する 25 個の新規遺伝子を得た。これらの遺伝子の中にはエントリゾーンに特異的な発現を有するものもあり、その機能の詳細な解析が待たれる。

2. 研究の目的

私たちはマイクロダイセクション法とマイクロアレイを併用した以前の研究を通じて、脊髄背側部に発現する 25 個の新規遺伝子を得ることに成功した。本研究ではこれらの新規遺伝子のうち、発生初期の脊髄で興味深い発現様式を有する 3 個の遺伝子 *huntingtin-interacting protein 1-related (Hip1r)*, *neuron navigator 2 (Nav2)*, *mouse Fukushima 1 (mF1)* に的を絞り機能解析を進める。まず、遺伝子導入の容易なニワトリ胚を用いて電気穿孔法による生体内での解析を行う。さらに各遺伝子産物を発現させた培養細胞と DRG を共培養する *in vitro* の系を用いて、その詳細な作用機序を検討する。これらの解析を通じて、各遺伝子の DRG 軸索ガイダンスへの関与の有無を評価する。本研究を推し進めることで、脊髄背側部の軸索誘引作用による DRG 軸索の標的認識メカニズムの全容解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ニワトリホモログ遺伝子の単離

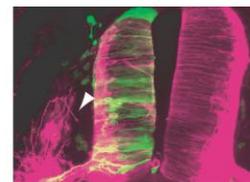
ニワトリ胚はマウス胚と比較して生体内への遺伝子導入が容易であり、目的遺伝子の生体内での機能を簡便に評価できる利点を持つ。ニワトリ胚を用いた機能解析を行うために、3 個のマウス遺伝子 (*Hip1r*, *Nav2*, *mF1*) のニワトリホモログ遺伝子の単離を行う。単離した後には、各遺伝子の全長 cDNA を発現ベクターに組み込むとともに、

in situ ハイブリダイゼーション用の cRNA プローブも作製し、ニワトリ胚脊髄における発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって確認する。

(2) 遺伝子導入実験

上記で作製した発現ベクターを使用して、電気穿孔法によるニワトリ胚への遺伝子導入を行う。この方法では、時間・空間的に遺伝子を操作することが可能なため、各遺伝子の機能を簡便に評価することが可能である。具体的には、電気穿孔法によってニワトリ胚脊髄片側に異所性に各遺伝子を発現させる。遺伝子導入後、一定期間ののちに胚を固定し、その DRG 軸索の走行を解析することで、操作した遺伝子の軸索ガイダンスにおける機能を評価する（下図参照）。軸索走行の解析のほかに、脊髄背側部におけるマーカー分子 (*neogenin*, *LH2A/2B*, *Islet-1*, *Lim1/2*) の分布も

in situ ハイブリダイゼーション法または免疫染色法によって調べる。これらのマーカー分子の分布に変化が生



脊髄への遺伝子導入で DRG 軸索が U ターンした例 (矢頭)

じている場合には、操作した遺伝子が脊髄内の細胞群の発生・分化を調節し、その結果として DRG の軸索ガイダンスに影響を及ぼした可能性が想定される。

(3) 組織培養法による解析

3 個の遺伝子 (*Hip1r*, *Nav2*, *mF1*) の詳細な作用機序を明らかにするために、培養系による解析を行う。この実験から、各遺伝子の遺伝子産物が DRG の軸索に対してどのような活性（伸長・抑制・誘引・反発）をもち、ガイダンスに関与しているかがわかる。具体的には、発現ベクターを用いて HEK 細胞に各遺伝子のタンパク質を一過性に発現させ、その細胞塊と DRG をコラーゲンゲル中で 3 次元共培養することでその活性を検討する。なお、遺伝子産物が分泌型でなくとも、分泌シグナル配列をもつ発現ベクターに組み込むことで分泌型に改変するので、本アッセイを行う上で問題は生じない。

4. 研究成果

(1) ホモログの単離と発現様式の解析

注目した3個の遺伝子 (*Hiplr*, *Nav2*, *mF1*) のニワトリホモログ遺伝子を単離するとともに、各遺伝子の頭部 (マウス胚) と脊髄 (ニワトリ胚) における発現様式を詳細に調べた。その結果、マウス胚の頭部では *Hiplr* は分泌腺に、*mF1* は嗅覚系に特異的に発現していることが判明した。一方、各遺伝子のニワトリ胚脊髄における発現様式は、マウス胚の同時期のものと同様であることが明らかとなった。

(2) 電気穿孔法による遺伝子導入

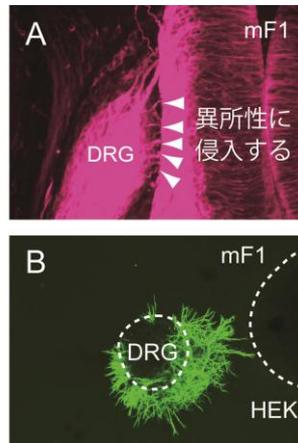
次に、これらのホモログ遺伝子の発現ベクターを構築し、電気穿孔法によるニワトリ胚への遺伝子導入実験を行った。ニワトリ胚脊髄の片側に異所性に各遺伝子を発現させたところ、*mF1* 遺伝子を導入した場合、導入側の DRG 軸索の走行に異常が見られた。具体的には、導入側の DRG 軸索は、本来投射すべき部位 (エントリーゾーン) 以外の部位からも脊髄内に侵入するようになった (図 A 矢頭参照)。

このことは、*mF1* 遺伝子の遺伝子産物が DRG 軸索の誘導に何らかの影響を与えていることを示唆している。また、*mF1* 遺伝子導入後の脊髄内の

分子の分布を調べたところ、*Islet-1* 陽性細胞の位置に若干の変化が見られた。このことは、*mF1* の遺伝子産物が脊髄内細胞群の発生・分化に影響を及ぼしている可能性を示唆しており、今後の詳細な検討が待たれる。

(3) 組織培養法による検討

さらに組織培養法を用いて各遺伝子産物の DRG 軸索に対する活性の有無を検討した。その結果、*mF1* 遺伝子の遺伝子産物が DRG 軸索を誘引する活性を有することを見出した (図 B)。本結果と電気穿孔法による結果を



考え併せると、*mF1* は脊髄背側部由来の軸索誘引因子である可能性が高い。

(4) 国内外における位置づけと今後の展望

DRG の軸索を誘引する新規分子の同定は、神経再生を促す新しい治療法への応用に繋がるので、世界中の医療関係者が渴望している発見の1つである。本研究から、新規遺伝子 *mF1* の遺伝子産物が DRG 軸索の誘引因子である可能性が明らかとなり、今後のさらなる解明が待たれる。本研究の結果の一部は、日本解剖学会総会および日本神経科学大会で既に発表した。今後さらなる検討を重ね、その成果を国際的な学術雑誌に発表する予定である。

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6件)

- ① Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Toshiyuki Yamagishi, Takayuki Ueno, Yuriko Yamada, Hiroyuki Yaginuma. Molecular cloning and expression pattern of the splicing variant of chick neuron navigator 2. Saito Ho-on Kai Museum of Natural History Research Bulletin, 査読なし, **75**, 7-17, 2011.
- ② Kenta Kobayashi, Tomoyuki Masuda, Masanori Takahashi, Jun-ichi Miyazaki, Masahiro Nakagawa, Motokazu Uchigashima, Masahiko Watanabe, Hiroyuki Yaginuma, Noriko Osumi, Kozo Kaibuchi, Kazuto Kobayashi. Rho/Rho-kinase signaling pathway controls axon patterning of a specified subset of cranial motor neurons. European Journal of Neuroscience, 査読有り, **33** (4), 612-621, 2011.
- ③ Masahiko Taniguchi, Tomoyuki Masuda, Yoshinori Mikami, Masafumi Kimura, Tomoyuki Yoshida, Masayoshi Mishina, Takao Shimizu. Identification and characterization of a novel zebrafish semaphorin. Neuroscience Letters, 査読有り, **488** (1), 215-220, 2011.
- ④ Tomoyuki Masuda, Hiroyuki Yaginuma, Chie Sakuma, Katsuhiko Ono. Netrin-1 signaling for sensory axons: involvement in sensory axonal development and

regeneration. *Cell Adhesion and Migration*, 査読有り, **3** (2), 171-173, 2009.

- ⑤ Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Hiroyuki Yaginuma. Molecular mechanisms of patterning initial trajectories of sensory neurons. *Saishin Igaku*, 査読有り, **64** (4), 938-943, 2009.
- ⑥ Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Hiroyuki Yaginuma. Role for netrin-1 in sensory axonal guidance in higher vertebrates. *Fukushima Journal of Medical Science*, 査読なし, **55** (1), 1-6, 2009.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 増田知之, 佐久間千恵, 八木沼洋行. マイクロアレイとデータベースによる脊髄神経軸索ガイダンス機構解明へのアプローチ. 第 117 回日本解剖学会全国学術集会, 平成 24 年 3 月 26 日, 山梨.
- ② 川口将史, 渡邊愛己, 真喜屋宏美, 長島寛, 川崎能彦, 平田たつみ, 増田知之, 倉谷滋, 村上安則. 羊膜類の体幹部末梢神経系の進化. 第 34 回日本神経科学大会, 平成 23 年 9 月 16 日, 神奈川.
- ③ 増田知之, 佐久間千恵, 上野孝之, 山田優里子, 谷口雅彦, 山岸敏之, 長瀬隆弘, 小林和人, 八木沼洋行. マイクロアレイとデータベースを用いた脊髄神経軸索ガイダンス機構解明へのアプローチ. 第 34 回日本神経科学大会, 平成 23 年 9 月 17 日, 神奈川.
- ④ 増田知之, 佐久間千恵, 谷口雅彦, 田中英明, 志賀隆, 八木沼洋行. 脊髄神経の回路形成を制御する分子メカニズム—私たちのゴールは見えてきたのか? 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム, 平成 23 年 3 月 28 日, 神奈川.
- ⑤ 増田知之, 佐久間千恵, 谷口雅彦, 志賀隆, 八木沼洋行. 脊髄神経後枝の発生とその投射路形成を担う分子機構. 第 56 回東北・北海道連合支部学術集会, 平成 22 年 9 月 26 日, 北海道.
- ⑥ 増田知之, 佐久間千恵, 谷口雅彦, 田中英明, 志賀隆, 八木沼洋行. 脊髄神経後

枝の回路形成を担う分子機構解明へのアプローチ. 第 33 回日本神経科学大会, 平成 22 年 9 月 3 日, 兵庫.

- ⑦ 増田知之, 佐久間千恵, 八木沼洋行. かずさ長鎖 cDNA マイクロアレイを用いた軸索ガイダンス機構解明への試み. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム, 平成 22 年 3 月 29 日, 岩手.
- ⑧ 小林憲太, 増田知之, 高橋将文, 宮崎純一, 中川匡弘, 八木沼洋行, 大隅典子, 貝淵弘三, 小林和人. 菱脳運動神経の回路形成における Rho シグナル伝達系の役割. 第 32 回日本神経科学大会, 平成 21 年 9 月 16 日, 愛知.
- ⑨ Tomoyuki Masuda, Keisuke Watanabe, Chie Sakuma, Kazuhiro Ikenaka, Katsuhiko Ono, Hiroyuki Yaginuma. Involvement of netrin-1 in dorsal spinal cord-derived chemorepulsion in the vertebrate embryo. *International Symposium on Autophagy and Cell Death*, 平成 21 年 7 月 4 日, 東京.

[図書] (計 1 件)

- ① 増田知之, 他, 東京化学同人社, 生物学辞典, 2010, 487~1327 ページ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

甲斐 信行 (KAI NOBUYUKI)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50301750