

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570245

研究課題名(和文) 神経冠細胞が関与する、脊髄運動神経細胞体の脱落防止機構の解明

研究課題名(英文) Roles for neural crest derivatives in retaining motor neuron cell bodies in the fish embryonic spinal cord.

研究代表者

前田 美香(佐藤美香)(Sato-Maeda, Mika)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・教育研究支援者

研究者番号：40292205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄運動神経は、その軸索が脊髄を脱して移動していく一方で、細胞体は脊髄の内に留まり情報を受け取る必要がある。その仕組みを知る目的で、ゼブラフィッシュ胚で運動神経と移動中の神経冠細胞に発現する接着分子Tag1に注目し、研究を行った。Tag1が発現していない場合、神経冠細胞の軸索への異常な配列や細胞死、異常なSchwann細胞の分化が起こり、さらにこのような胚では運動神経細胞体の軸索からの脱落が観察された。魚類の運動神経細胞体の保持には、Tag1を介したSchwann前駆細胞の軸索への配列が重要な役割を果たしており、ニワトリやマウスと同様に神経冠由来細胞が関わっている事がわかった。

研究成果の概要(英文)：We showed Tag1-expressing neural crest cells (NCCs) play an important role to prevent motor neuron emigration from the embryonic spinal cord in Zebrafish. Tag1 deficiency causes disruption of NCC alignment along axon, cell death of NCC, and Schwann cell reduction. Such embryos show the dislocation of motor neuron cell body out of the spinal cord. The results show that the Tag1-mediated interaction between NCC and motor axon is required for the differentiation of functional Schwann cells, and that comparable function of NCC derivatives to retain the integrity of embryonic spinal cord is conserved among vertebrates.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 発生生物学

キーワード：神経冠細胞 運動神経 グリア細胞 Tag1 細胞間相互作用 Schwann細胞

1.研究開始当初の背景

脊髄運動神経は、ひとつの細胞の二カ所の領域が異なる場所に配置されている。つまり、その細胞体は介在神経を經由した感覚神経からの入力を受けるため脊髄内に留まり、一方で軸索は脊髄を脱出し筋節に投射している。介在神経からのシグナルを適切に受け取るとは脊髄運動神経の機能発現の上で必須である事を考えれば、この細胞体位置の保全機構は生物学的に重要な意味を持つと考えられる。しかし、軸索伸展経路の制御機構の研究に比べ、「脊髄運動神経の細胞体を脊髄内に保持する機構」の研究はまだ歴史が浅く解明されていない部分も多い。

この機構について、齧歯類と鳥類では発生中に一時的に構築される神経冠細胞由来のバウンダリキャップセル (BC細胞) の存在が知られ、その除去は運動神経細胞体の脱落を引き起こすことが示されている (Vermeren et al., 2003)。しかし魚類では神経冠由来細胞のこの機構への関与はこれまで報告がなく、運動神経軸索脱出点でのBC細胞マーカーの発現も見られない (Kucenas, et al., 2008)。

これまで私達は、ゼブラフィッシュの脊髄一次運動神経(PMN)の細胞体が、軸索伸展前に脊髄内で前後位置の調整を行い、この結果、運動神経軸索脱出点が各セグメントで一カ所に定まることを明らかにしてきた (Sato-Maeda et al., 2008)。この研究過程で、受精後15時間後には既にパイオニアとして軸索を脊髄から脱出させるPMN細胞体がどのようにして脊髄内に保持されるのかに興味を持ち、予備的実験を行い以下の結果を得た。(1) 神経冠細胞が行う分化等に重要な転写因子Sox10の機能阻害により、24hpfでのPMN細胞体の脊髄からの脱落が観察され、神経冠細胞 (及びその由来細胞) の関与が強く示唆された。(2) 接着分子Tag1(Cntn2)は、軸索伸展期には、PMNと脊髄の「軸索脱出点」より腹側に位置する神経冠細胞の両方に発現しているが、このTag1欠損胚でも運動神経の細胞体脱落を確認した。これらの予備的実験から、

神経冠由来細胞が関与する羊膜類における神経細胞体保持機構のプロトタイプとも言うべきものが、魚類においても存在する可能性が浮上した。

2.研究の目的

ゼブラフィッシュ胚をモデル系として用い、発生過程中的脊髄運動神経と神経冠細胞 (及びその由来細胞) の相互作用をin vivoで解析を行うことで、羊膜類で知られる神経冠由来細胞が関与する神経細胞体保持機構が魚類にも存在するかどうかを明らかにする。これにより、運動神経の機能を保証する重要な機構の一つが脊椎動物の進化の過程でどのように発達していったのか、そして、運動神経軸索との相互作用が神経冠細胞の分化に与える影響についての、新しい知見を得ることを目的とした。特に、予備的実験からこの機構に重要な役割を持つと予測される接着分子Tag1に関して、その果たす役割の解明を目指した。

3.研究の方法

本研究においてゼブラフィッシュ胚をモデル系として用いた主な利点は、以下の通りである。

(1) ゼブラフィッシュ胚は脊髄一次運動神経(PMN)軸索伸展期には透明であり、神経冠細胞の挙動をin vivoで直接解析できる。特に、トランスジェニック系統Tg(*nrla:gfp*)js8及びTg(*nrla:gfp*)js12 (Sato-Maeda et al., 2006, 2008)、および、Tg(*sox10(7.2):mrfp*)^{vu234}

(Kucenas, et al., 2008) を用いる事により、軸索伸展期のPNMと神経冠細胞の相互作用をlive観察することが可能になる。

(2) モルフォリーノ・アンチセンスオリゴ(MO)を注射することにより任意の遺伝子の発現を抑制し、その効果を検証できる。

(3) 上述したトランスジェニック系統胚、MO注射胚などを用いた細胞移植操作によって、接着分子Tag1を発現していない神経冠細胞やPMNを部分的に持つキメラ胚を作成できる。これにより、Tag1を介した同種、異種

細胞間の相互作用の効果を解析する事が可能である。

これらの利点を活かし、発生過程中的PMN軸索と神経冠細胞（及びその由来細胞）の相互作用の検討を行った。

4. 研究成果

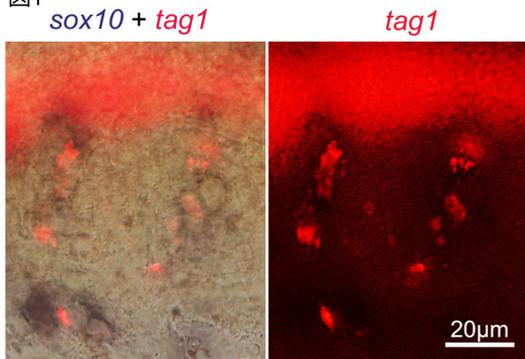
(1) 予備実験で観察した脊髄一次運動神経(PMN)細胞体の脱落現象について、Sox10欠損胚とTag1欠損胚を用いて再確認を行った(表1)。

表1. Tag1欠損胚とSox10欠損胚における、受精後24時間での一次運動神経細胞体の脱落現象

MO injected (6-7 ng / embryo)	Embryos examined	Embryos with motoneuron cell bodies out of the spinal cord*
<i>tag-1</i> MO	72	19
<i>tag1</i> 5b-mis control MO	66	1
<i>sox10</i> MO	44	25
<i>sox10</i> 5b-mis control MO	40	0

(2) 受精後24時間胚を用いて*tag1*と*sox10*の2重 in situ hybridizationを行った結果、移動中の神経冠細胞の一部が*tag1*を発現している事が明らかになった(図1)。また、この*tag1*を発現する神経冠細胞は受精後24時間において、脊髄一次運動神経軸索に配列し包み込む形態を示していることを確認した。このことから、*tag1*を発現している神経冠細胞はSchwann細胞前駆体である可能性が示唆された。

図1

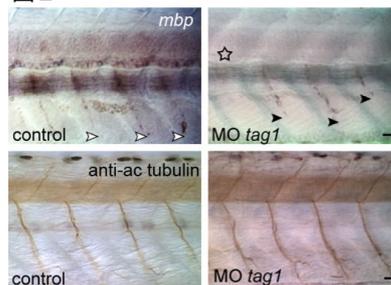


(3) Tag1に対するモルフォリン・アンチ

オリゴを注射したTag1欠損胚では、移動中の神経冠細胞の軸索への配列が乱れ、特に脊髄腹側の「軸索脱出点」付近で多層状の神経冠細胞塊が形成される特徴が見られた。PMN細胞体の脱落もこのような胚で見いだされた。Tag1欠損胚では、受精後30時間においても軸索に沿って密着する形態を示す神経冠細胞の減少が観察された。

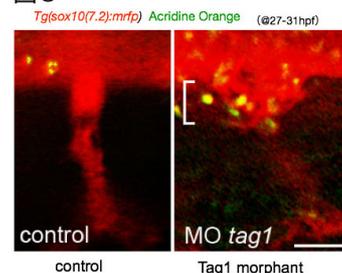
(4) 受精後5日胚について、運動神経軸索に沿ったシュワン細胞の分化状態を見るために、その分化マーカーであるmyelin basic protein mRNAの発現を調べた。正常胚では各体節で軸索に沿った発現パターンを示すが、Tag1欠損胚では発現が弱くかつイレギュラーなパターンを示した(図2)。一方、抗-Hu抗体によって検知できる後根神経節形成については、Tag1欠損胚においては正常であることがわかった。

図2



(5) アクリジンオレンジ、及び抗Caspase3抗体を用い、Tag1欠損胚における神経冠細胞に細胞死が見られるかどうかを調べた。受精後30時間において、コントロール胚のmedial経路を移動する神経冠細胞ではほとんど細胞死が観察されないが、Tag1欠損胚では細胞死の頻度が上昇した(図3)。一方、神経冠細胞の細胞分裂の比較ではコントロール胚とTag1欠損胚とに差はなかった。

図3



(6) トランスジェニック系統Tg(*nrp1a:gfp*)js8を用いたliveイメージング解析により、Sox10欠損胚で運動神経細胞体が脊髄から脱落するタイミングは、PMN軸索が体節の背腹境界域に達し筋節との結合部を形成した後(軸索にかなりの張力が生ずる事が予想される状況)であること確認した。

(7) トランスジェニック系統

Tg(*sox10(7.2):mrfp*)、またはTg(*nrp1a:gfp*)js12;

Tg(*sox10(7.2):mrfp*)を用い、細胞移植操作によつて、①ドナーを色素でラベルしたTag1欠損胚、ホストを正常胚とするキメラ胚、②Tag1欠損胚をホストとし、ドナーを色素ラベルした正常胚とするキメラ胚、の2種類のキメラ胚を作成した。受精後24時間胚での観察の結果、Tag1(+)

の神経冠細胞はTag1(+)

図4

Tag1(-)神経冠細胞(青色)はTag1(+)軸索(緑)と接していない

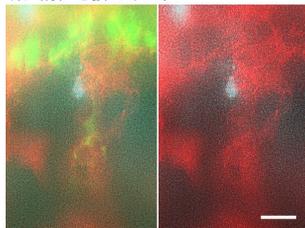
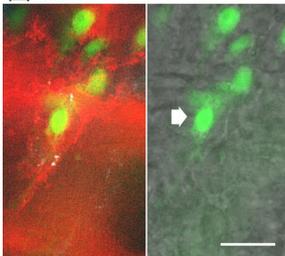


図5



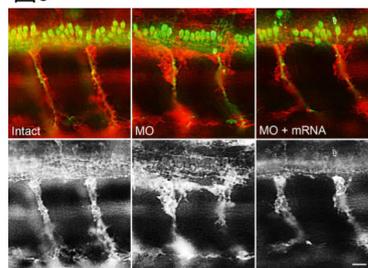
(8) Tag1欠損胚にTag1・mRNAを注射することによって、これまでTag1欠損胚の特徴として観察された異常な表現型(上述の神経冠細胞の軸索周囲への配列障害、発生後期でのSchwann細胞分化

異常)がrestoreされるか否かの解析を行った。

Tag1モルフォリーノ・アンチセンスオリゴ(MO)とともにTag1・mRNAを胚に注射した胚、MO単独注射胚、mRNA単独注射胚、野生型胚を比較した。

① Tag1欠損胚で観察される神経冠細胞の配列異常についての解析を行った。ここで「異常表現型」のクライテリアとして、「受精後30時間胚において、頭部側セグメント(5th-10th segments)で、脊髄ventral root付近で30μm以上の幅にわたり神経冠細胞が重層化し、体節中央部まで及ぶ表現型」を採用した。比較の結果、野生型胚、mRNA単独注射胚では、当該セグメントでの異常表現型は見られなかった。一方、MO単独注射胚では38/264セグメントで、MO+mRNA注射胚では18/264セグメントで異常な表現型が観察された。わずかながら、mRNA注射によって有意差のある異常の軽減が観察された(図6)。②受精後5日胚における、シュワン細胞の分化マーカーであるmyelin basic protein (*mbp*) mRNAの発現についての解析を行った。10th-20thセグメントにおいて*mbp*が脊索の腹側端を超えて発現しているものを正常とし、異常なセグメント数をカウントを行った。このカウントにおいて、MO単独注射胚とMO+mRNA注射胚との差は見られなかったが、1胚あたりの異常セグメント数に関しては軽減が見られた。

図6



(9) 高速度カメラにて受精後5日の稚魚の行動解析を行った。野生型稚魚と比べ、Tag1欠損稚魚では細かい体軸の動きは観察されず、特徴的な遊泳異常が見られた。

これらの結果により、将来グリア細胞

(Schwann細胞)に分化する神経冠細胞が、接着分子Tag1を介して運動神経軸索に接着・整列することが、ゼブラフィッシュ胚での神経細胞細胞体の保持にも重要である事が示された。また、Tag1欠

損胚において、重層化し軸索と接触できない神経冠細胞が出現し、これらの神経冠細胞での細胞死が観察されたことから、神経冠細胞（Tag1を発現しているSchwann前駆細胞）の軸索への配列異常が、発生後期での不完全なグリア分化、さらには遊泳異常を招いている可能性が示唆された。

本研究は、羊膜類と同様に魚類においても、神経冠由来細胞（ここでは早い時期でのグリア予定細胞）が、機能的に特殊化はしていないものの、羊膜類におけるBC細胞のプロトタイプとして脊髄内・外のインターフェースの保全に関与することを、初めて示した研究である。

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）

[学会発表]（計 5件）

- ① 前田美香、東海林互、「神経冠細胞は、ゼブラフィッシュ胚の運動神経・細胞体の位置を保持する機構に関与する」、日本動物学会第84回大会、2013年 9月28日、岡山
- ② Mika Sato-Maeda, Wataru Shoji、「Tag1-mediated early interaction between neural crest cells and motor axons in zebrafish」、46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists、2013年 5月29日、松江
- ③ 前田美香、東海林互、「Tag-1を介したゼブラフィッシュ一次運動神経軸索と神経冠細胞の相互作用」、日本動物学会 第83回大会、2012年09月15日、大阪
- ④ 前田美香、東海林互、「Early interaction of Schwann Precursors with motor axon」、第17回小型魚類研究会、2011年09月08日 三島
- ⑤ 前田美香、東海林互、「運動神経軸索とシュワン前駆細胞の初期相互作用」、日本動物学会第82回大会、2011年09月22日、旭川

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

前田 美香（佐藤 美香）（Sato-Maeda, Mika）

東北大学・大学院理学研究科・教育研究支援者

研究者番号：40292205

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし