

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590224

研究課題名(和文) プラコードと神経堤の細胞間相互作用を司る分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of cellular interaction between placode and neural crest

研究代表者

池田 啓子 (Ikeda, Keiko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10265241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：頭部末梢神経系は、脳神経と付随した感覚神経節・副交感神経節よりなる。頭部には加えて一対の特殊感覚器官がある。脊椎動物の発生初期に一過的に観察されるプラコードと神経堤細胞は、初期胚神経板と表皮の外胚葉ポーター領域から生じる2つの細胞群で、上記構造の発生に関わる。先行研究で、Six1とSix4遺伝子はプラコードに特異的に発現し神経堤には発現しないが、同遺伝子欠損マウスでは両者の移動障害、分化障害、劇的なアポトーシスが観察され、両細胞間相互作用が器官形成に必須であることが示されていた。野生型および同遺伝子欠損マウス胚を用いてプラコードと神経堤の細胞間相互作用を担う分子とその作用機作解明を目的とした。

研究成果の概要(英文)：The cranial peripheral nervous system is unique in the sense that it is derived from both ectodermal placodes and neural crest cells (NCCs). The interdependent relationship exists between placodes and NCCs all through development. Considering obvious importance of understanding the interactions between placodes and NCCs, it is not fully uncovered about the ligands and receptors governing their interactions, especially in the mammals. The aim of this research was to identify molecules for the interaction. We have already reported that transcription factor encoding genes, Six1 and Six4 expressed solely in the placodes, but not in the NCCs. Knockout mouse embryos targeting these genes showed defects not only placodal, but also NCCs derived organs. Using the gene targeting mice and wild type one, here we searched candidate molecules essential for the interaction between placodes and NCCs. We also examined the effects of inhibiting the expression of candidate molecules during development.

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：プラコード 神経堤 細胞間相互作用 発生 Six 遺伝子 外胚葉ポーター細胞 全胚培養

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の頭部は、進化の過程で左右両側に存在する感覚器と頭部感覚神経節（脳神経節）というユニークな特徴を獲得した。これらは、外胚葉性上皮の肥厚（プラコード）と神経堤という2つの細胞群に由来する。プラコードと神経堤は共に発生途上の神経板と表皮の境界領域の外胚葉で生じる細胞集団（ボーダー細胞）で、細胞は胚体内へと移動する。ボーダー細胞（特に神経堤細胞）は移動中、多種多様な組織へと分化する能力（多分化能）と増殖能を維持し続け、標的部位に到達したあと分化する。移動中の細胞をとりまく環境からのシグナル分子や、移動中の細胞と周囲の細胞との相互作用・接触誘導を司る分子的実体、移動中の細胞が目的的部位に到達するのに必要な走化性・誘因・化学反発を担う因子、多分化能を維持する分子機構については、古くから、ニワトリ胚やウスラ胚を用いた研究がなされている。しかし、特に哺乳類についての相互作用については、未解明な点が多く残されている。

最近、癌の転移で観察される細胞移動やアノキス（上皮細胞の接着不全で誘起されるアポトーシス）回避では、神経堤細胞と共通の分子機構が使われていることが示唆されている。また、哺乳類の神経堤細胞の挙動と頭蓋顔面形成との関係も臨床的にも注目されている。

プラコードに関しては、Streit A. 博士（ニワトリ）と Schlosser G. 博士（ゼノパス）らが、プラコード特異的遺伝子の解明とプラコード前駆領域（pan-placodal region, PPR）の同定などの成果をあげてきた。PPR はニワトリ、ゼブラフィッシュ、ゼノパスで最初に同定された、Anterior Neural plate の周囲に形成される馬蹄形の領域で、ここから各々の感覚器プラコード（眼を除く）が分離していく。なお、私たちは近年、マウス胚での PPR の存在を証明した。

一方、我々がここ数年間解析してきた、Six-ホメオドメインを有する転写因子をコードする *Six1* と *Six4* は、感覚器（嗅上皮、内耳など）や脳神経節の形成に必須で、*Six1* は鰓弓耳腎(Branchio-oto-renal : BOR) 症候群の原因遺伝子である。*Six1* と *Six4* は PPR およびそこから分離した感覚器プラコード細胞に特異的に発現し、神経堤細胞には発現していない。しかし *Six1* 遺伝子欠損マウスや *Six1/4* 二重欠損マウスでは、プラコード由来細胞のみならず、神経堤由来細胞の移動障害、分化障害、劇的なアポトーシスが観察され、両細胞間相互作用が器官形成に重要であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

プラコードと神経堤の相互作用についてマウスでの知見はまだ少ない。私たちが作成し

た遺伝子改変マウスや野生型マウスを利用して、プラコードと神経堤の細胞間相互作用を担う分子とその作用機作を解明することを最終目標とした。本研究では以下3点を明らかにすることを目的とした。細胞系譜を可視化したマウスを用いてプラコードと神経堤の細胞系譜を発生段階を通じて詳細に同定する。プラコードと神経堤の細胞間相互作用を司る遺伝子/因子を探索する。同定した遺伝子/因子を阻害した際の胚・器官発生に及ぼす影響を観察し、プラコードと神経堤の作用を担う分子を同定し、作用機作を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスを用いたプラコード細胞と神経堤細胞の細胞系譜の解析：私たちは先行研究で、感覚器プラコードと脳神経節プラコードで特異的に遺伝子発現を制御するエンハンサーを同定した。そのエンハンサー制御下で Cre recombinase (以下、Cre) を発現する2系統の遺伝子改変マウス(以下、Tg マウス)を作成した。さらに神経堤細胞特異的に Cre を発現する2系統の遺伝子改変マウスの譲与を受けた。これら Tg マウスと、Cre の存在下でマーカー遺伝子(蛍光タンパク質や LacZ をコードする)を発現する遺伝子改変マウスを掛け合わせ、野生型や Six 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、プラコードや神経堤細胞の挙動を発生段階で観察した。

(2) 細胞間相互作用を司る分子の探索：(1)で発生段階を追ってその挙動を同定したプラコード細胞について、野生型と、Six 欠損マウス胚から障害が明らかになる直前(胎生 8.75-9.0日)に単離し、遺伝子発現プロファイルを、マイクロアレイ解析により発現量が有意に異なる遺伝子を探索した。

(3) 細胞間相互作用を司る候補因子の検証-細胞の移動、相互作用のリアルタイム解析：(2)で候補にあがった遺伝子・因子を RNA 干渉(RNAi)で発現阻害をしたときの、胚発生における影響を調べた。(1)のプラコード特異的エンハンサーや神経堤特異的エンハンサー下で発現する蛍光トレーサーを同時に用いることにより、阻害によるマウス胚での細胞移動を、マウス器官培養やマウス全胚培養系で観察した。

## 4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウスを用いたプラコード細胞と神経堤細胞の細胞系譜の解析：先行研究で同定したプラコードエンハンサーの制御下で Cre を発現するマウスや神経堤細胞特異的に Cre を発現するマウスと、ROSA locus に LacZ 遺伝子が入っている遺伝子改変マウ

スもしくは mRFP タンパク質を発現するマウス (locus は不明) と掛け合わせ、LacZ 染色や蛍光による発生段階を追った細胞



系譜解析を行った。鼻・耳・上鰓神経節プラコードのエンハンサーは、高頻度で発生初期から全身での発現活性がオンになり (スクリーニング時にはこの表現型はほとんど現れなかった) 三叉・上鰓神経節プラコードのエンハンサーは、胎生 8.75-9.0 ではごく限られた部分の発現活性のみがオンになることが判明した。図 1 に胎生 10.5 のマウスにおけるプラコードエンハンサー制御下の LacZ 染色を示す。神経堤細胞特異的に Cre を発現するマウスについては、Wnt1 については神経堤細胞のみならず、発生初期の中樞神経系においても高発現すること、P0 についてはグリアの細胞系譜に特化して強く発現することを確認した。神経堤については、E8.5 から発現が観察されることを確認した。

(2) 細胞間相互作用を司る分子の探索: 1) で胚の発生段階での発現を同定したエンハンサーを蛍光ラベルし (floxed されることにより蛍光タンパク質が発現する Tg マウスと掛け合わせた) 蛍光を指標にしながら野生型と Six 遺伝子ノックアウトマウスのプラコードから、細胞の採取を試みた。スライドガラス上で領域を確認しながら行った。プラコード (PPR) についてのみ、アレイ解析に回すことができる量の RNA 採取ができた。神経堤については充分の量が採取できないと判断した。PPR で特異的に発現する遺伝子群、および Six 遺伝子ノックアウトマウスで野生型に比べてプラコードにおいて有意におちている遺伝子群をマイクロアレイを用いて同定した (Ikeda et al., in preparation)。

(3) 細胞間相互作用を司る候補因子の検証-細胞の移動、相互作用の解析: マウスの器官培養 (嗅上皮など) については、組織を埋め込むマトリックスや培地に加える神経因子の検討を行った。しかし、数時間以上の培養で組織構造を保持することがきわめて困難であることが判明した。そのため、全胚培養をアッセイ系とした。胎盤をつけたままの初期胚の調整、24 時間培養可能な培地の選択についての検討を繰り返した。結果、培養後の胚が外見上正常と判断できる程度の 24 時間全胚培養技術確立ができた。さらに培養開始時の胚のプラコード部位に電気穿孔法 (electroporation) にて核酸導入を行った。(2) で候補にあがった遺伝子について RNA 干渉 (RNAi) により発現阻害を行った。候補遺伝子 10 数種類について、siRNA を受託し、使用した。導入部位は胚の片側のプラコード部位とし、導入場所の同定のために、FITC-labeled

control siRNA を同時に導入した (図 2 右)。24 時間培養後、候補遺伝子の発現抑制による、プラコードの分化 (図 2 左、Tuj1; 神経分化マーカー) や移動、アポトーシスの増減を、対側のプラコード部位と比較した。候補遺伝子 2 種類について、発現抑制により、プラコードの運命が変わること、それに伴い、神経堤の分化が抑制されることが明らかになった。例数を増やして統計学的解析を行っている (Ikeda et al., in preparation)。

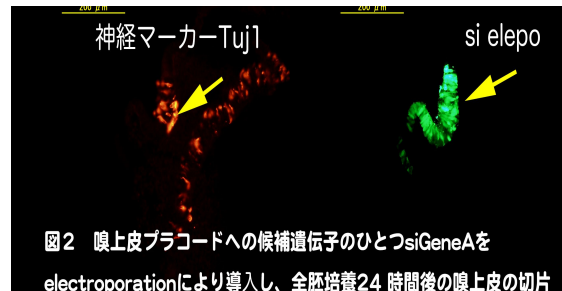


図2 嗅上皮プラコードへの候補遺伝子のひとつsiGeneAを electroporationにより導入し、全胚培養24時間後の嗅上皮の切片

## 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 7 件)

\*は Corresponding Author

1. Ikeda, K.\*, Satake, S., Onaka, T., Sugimoto, H., Takeda, N., Imoto, K., Kawakami, K.\* (2013) Enhanced inhibitory neurotransmission in the cerebellar cortex of *Atp1a3*-deficient heterozygous mice. *J. Physiol.* 591, 3433-3449. 【IF=4.718】 査読有
2. 池田啓子.\* (2013) 遺伝子改変マウス (*Atp1a3*+/-) を使った家族性ジストニアパーキンソン症候群の病態解明. 加藤記念難病助成基金研究報告集. 26:9-21. 査読無
3. Sato, S.\*, Ikeda, K., Shioi, G., Nakao K., Yajima, H., Kawakami, K. (2012) Regulation of *Six1* expression by evolutionarily conserved enhancers in tetrapods. *Dev. Biol.* 368, 95-108. 【IF= 4.069】 査読有
4. Onimaru, H.\*, Ikeda, K., Kawakami, K. (2012) Postsynaptic mechanisms of CO<sub>2</sub> responses in parafacial respiratory neurons of newborn rats. *J. Physiol.* 590, 1615-1624. 【IF=4.718】 査読有
5. Onimaru, H.\*, Ikeda, K., Kawakami, K. (2012) Relationship between the distribution of the paired-like homeobox gene (*Phox2b*) expressing cells and blood vessels in the parafacial region of the ventral medulla of neonatal rats. *Neuroscience* 212, 131-139. 【IF=3.38】 査読有
6. Ikeda, K.\* Two distinct neurogenesis in olfactory epithelium. (2012) *Jpn. J. Taste Smell Res.* 19(1), 63-69. 査読有
7. Suzuki, Y.\*, Ikeda, K., Kawakami, K.

Development of gustatory papillae in the absence of Six1 and Six4. *J. Anat.* 219, 710-721, 2011. 【IF= 2.37】 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 池田啓子. モデルマウスを使った小児交代性片麻痺の病態分子基盤の解明. (特別講演) 第 66 回兵庫県医師会設立記念式典受賞記念講演, 2013 年 11 月 10 日, 兵庫県医師会館, 兵庫
2. Kawakami, K., Sugimoto H., Ikeda, K. Toward the understanding sodium pump disease. (シンポジウム) 10th Nikko Symposium. Oct. 17. 2013, Tochigi, Japan (Abstract book p.14)
3. Sugimoto, H., Ikeda, K., Kawakami, K. *Atp1a3*-deficient heterozygous mice show shorter stride and fall latency in hanging box in chronic stress condition. (poster) 2nd Symposium on *ATP1A3* in disease. Sep. 23-24, 2013, Rome, Italy
4. Ikeda, K., Satake, S., Kawakami, K. Increased inhibitory neurotransmission in the cerebellum of the *Atp1a3*-deficient heterozygous mice. (poster) 2nd Symposium on *ATP1A3* in disease. Sep. 23-24, 2013, Rome, Italy
5. 池田啓子. Na ポンプの最近の知見～周産期における Na ポンプの役割～. (特別講演) 第 6 回福井生殖生物学・医学研究会 2013 年 8 月 30 日, 福井
6. Ikeda, K., Sato, S., Kawakami, K. Expression of Six genes in the mouse early development of mouse and the role in cranial gangliogenesis. (poster) Gordon Research Conference: Neural Crest & Cranial Placodes. July 21 - 26, 2013, Stonehill College in Easton MA, United States
7. Kawakami, K., Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Ogino, H., Ueno, N. : Role of *Six1* in evolution of vertebrate primary sensory system. 46<sup>th</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. May 28-31, 2013. Matsue, Japan (Program Book: p.35)
8. 佐竹伸一郎, 池田啓子, 川上潔, 井本敬二 *Atp1a3*<sup>+/ -</sup> マウス小脳皮質において登上線維伝達物質のシナプス外拡散は強く抑制されている. (poster, P2-2-33) 第 36 回日本神経科学大会 Neuro2013, 2013 年 6 月 20-23 日, 国立京都会館, 京都 (Abstract book p.277)
9. Ikeda, K., Satake, S., Onaka, T., Takeda, N., Yamada, G., Imoto, K., Kawakami, K. Altered inhibitory neurotransmission in the cerebellum *DYT12* model mice. *Neuroscience* 2012 (第 25 回日本神経科学会), 2012 年 9 月 18-21 日, 名古屋
10. Ikeda, K., Suzuki, Y., Kawakami, K. Development of gustatory papillae in the

absence of Six1 and Six4. (poster) Society for Developmental Biology 71st Annual Meeting July 19-23, 2012, Motreal, Canada

11. Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Ogino, H., Ueno, N., Kawakami, K. Key regulator for developmental and evolutionary switch from Rohon-Beard cells to dorsal root ganglia. (poster) Society for Developmental Biology 71st Annual Meeting July 19-23, 2012, Motreal, Canada
12. Sato, S., Ikeda, K., Shioi, G., Nakao, K., Yajima, H., Kawakami, K. Six1 expression is regulated by evolutionarily conserved enhancers. (poster) Society for Developmental Biology 71st Annual Meeting. July 19-23, 2012, Motreal, Canada
13. Ikeda, K., Suzuki, Y., Kawakami, K. Developmental defects of gustatory papillae in Six gene-knockout mice. Joint meeting of the 45th Annual meeting of JSDB and the 64th Annual meeting of JSCB, 2012 年 5 月 28-31 日, 神戸
14. Sato, S., Ikeda, K., Shioi, G., Nakao, K., Yajima, H., Aizawa, S., Kawakami, K. (2012) Conservation and diversity of Six1 gene enhancers in chordate. Joint meeting of the 45th Annual meeting of JSDB and the 64th Annual meeting of JSCB, 2012 年 5 月 28-31 日, 神戸
15. 池田啓子. 頭部感覚器発生を司る遺伝子カスケード. (特別講演) 兵庫医科大学医学学会学術講演会, 2012 年 1 月 23 日, 兵庫
16. 池田啓子. 嗅上皮発生段階におこる neurogenesis を司る遺伝子カスケード. (シンポジウム) 日本味と匂学会第 45 回大会, 2011 年 10 月 5-7 日, 金沢
17. 鈴木裕子, 池田啓子, 川上潔 *Six1/4* 二重欠損マウスにおける舌乳頭の発生. (poster) 日本味と匂学会第 45 回大会, 2011 年 10 月 5-7 日, 金沢
18. Ikeda, K., Sato, S., Yajima, H., Kawakami, K. Expression pattern of Six genes in the mouse early embryos. (poster) 第 44 回日本発生生物学会年会, 2011 年 5 月 18-21 日, 沖縄宜野湾
19. Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Ogino, H., Ueno, N., Kawakami, K. Heterochronic shift of Six1 expression drives evolutionary transition of vertebrate primary sensory neurons. (poster) 第 44 回日本発生生物学会年会, 2011 年 5 月 18-21 日, 沖縄宜野湾

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究紹介

<http://www.hyo-med.ac.jp/faculty/course/biology.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

池田 啓子 ( IKEDA, KEIKO )

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10265241

### (2)研究協力者

川上 潔 ( KAWAKAMI, KIYOSHI )

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10161283