

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590244

研究課題名(和文) 神経板培養法を用いた頭部ブラコード特異性形成の段階的機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of gradual steps for a specificity formation of cranial placode by using a novel neural plate explant culture.

研究代表者

重谷 安代 (Shigetani, Yasuyo)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70431773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭部ブラコード形成について、神経堤形成と合わせた「2ステップモデル」が新しく提唱された。それに伴い、従来の解釈に変更が生じ、神経板外植片培養によって新しく精製された(扁平)上皮細胞の特徴の解釈にも変更が生じた。この2ステップモデルに照らし合わせると、この培養系で用いるFGF2は後のステップにおいてBMP4に拮抗作用をもたらしていると考えることができ、また精製された上皮細胞群は、神経板境界/前ブラコード外胚葉(PPE)/非神経外胚葉の全ての特徴を併せ持つような未成熟な段階の特徴を持つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：A new 'two-step model' has been advocated for the induction of the cranial placode along with the neural crest formation. According to the model, our explanation on the result of the neural plate explant culture should be corrected in part: FGF2 signal possibly has an antagonistic effect on BMP4 signal in our culture system; the induced squamous epithelium has characteristics of an immature composite of the neural border/pre-placodal ectoderm/non-neural ectoderm.

研究分野：神経発生学、組織学、進化発生学

キーワード：神経板 神経板外縁 神経堤 前ブラコード外胚葉 ブラコード BMP4 FGF2

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物に独特な構造体として知られる神経堤細胞とプラコードは、共に末梢の脳神経や感覚器の形成に関与する。両者の誘導は隣接して起こると考えられ、神経板の外縁で神経堤と前プラコード外胚葉 (Pre-Placodal Ectoderm: PPE) が隣り合うように位置し、神経堤からは脱上皮化 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) を起こしたのちに神経堤細胞が、また PPE からはプラコードが形成されることが知られているのである。なおこのプラコードからも後に EMT を起こして感覚神経細胞になることも知られている。

既報において、神経板外植片に BMP4 タンパク質を加えて培養すると、EMT を起こして神経堤細胞が形成されることが知られていた。そこで BMP4 と FGF2 の両方を神経板外植片に加えてみたところ、扁平上皮構造を形成し、また神経板外縁に発現する分子マーカー群を発現することから、神経堤と PPE に共通の前駆体ではないかと仮説立てた。

これをもとに胚体内で起こる現象を説明するべく、段階的形成機構について迫ろうと試みた。

2. 研究の目的

発生過程における神経堤-PPE 前駆体の時空間的誘導機構について、神経板外植片培養を利用した標的タンパク質の胚体外濃度検証を行う。

三叉神経プラコードの特異性形成の段階的機序に必要な鍵因子の同定を行う。

3. 研究の方法

① 神経板外植片培養による神経堤-PPE 前駆体形成について標的タンパク質の濃度検証をする

ニワトリ神経板は HH6-7 胚のものを使用する。予備実験データで得られた最適濃度を中心に培養液に加えるリコンビナントタンパク質 BMP4 と FGF2 の濃度条件を振って培養を行い、24 時間後に外植片由来の細胞の収穫をしたのちに RNA を抽出し、逆転写ならびに PCR 反応を行い、定量 PCR 法を実施する。分子マーカー遺伝子には、神経板境界領域に発現する *Dlx5*, *Six1*, *Eya2*, *Sox2/3*, *Snail2*, *Msx1*, *GATA3*, *keratin19* と、内在性遺伝子の *GAPDH* を用いる。

さらにはこれらの濃度検証結果に基づき、神経堤-PPE 前駆体が形成されるために必要な条件を胚体内で再現するべく、ニワトリ胚に上述リコンビナントタンパク質をビーズにしみ込ませたものを移植する実験や、ベクターに組み込んだ遺伝子をエレクト

トローレーション法により発現させるなどして、*in vitro* 検証実験を行う。

② レンズや鼻とは異なる三叉神経プラコードの形成機序を明らかにする

段階的に起こるプラコード特異性形成機序の仮説に基づき、鼻/三叉神経共通プラコード形成、ならびにそれらの細分化形成のステップそれぞれにおいて、FGF2 および Wnt 経路について獲得ならびに欠失実験を行い、各プラコード特異的分子マーカーを用いて検証する。

4. 研究成果

既報において、BMP4 のみを添加して培養した神経板外植片は、EMT を起こし *Sox9* や *Snail2* を発現する間葉系神経堤細胞が形成されることは示されている (Wakamatsu et al., 2004)。これは phalloidin 染色による actin の細胞骨格の配置や、電子顕微鏡による微細形態の観察から lamellipodia や filopodia が確認されたことから、移動性の間葉系細胞であることは明らかであった。一方で、FGF2 と BMP4 を添加して培養した神経板外植片 (F2B4 外植片) は、丸くて単層かつ扁平な形態を示し、細胞境界にはデスモゾームが観察され、その接着板の細胞質側には中間系フィラメント (tonofilament) が明瞭に認められた。従って、神経板外植片由来の細胞は上皮に特徴的なデスモゾームを沢山持つ、扁平上皮であることが微細・細胞形態学的に明らかとなった。

この F2B4 外植片上皮細胞の特徴を調べるために、以前よりも一層多くの分子マーカーを用いて半定量および定量 PCR によって詳細に調べた。使用した分子マーカーは以下の通り；非神経外胚葉特異的マーカー、*GATA3/keratin19*；神経板マーカー、*Sox1/Sox2/Sox3/Neurogenin1/NCAM*；神経板境界マーカー、*Msx1/Dlx5*；PPE マーカー、*Six1/Six4/Eya2*；神経堤マーカー、*Snail2/TFAP2 α /Zic1* (なお、*TFAP2 α* と *Zic1* は非神経外胚葉や神経板にも発現する)。半定量 PCR では、非神経外胚葉マーカー、神経板境界マーカー、PPE マーカーは全て F2B4 外植片細胞において有意に発現量の増加が認められた。ただし神経板マーカーの発現量だけは N2 のみを作用させたコントロール細胞よりも発現量は低下した。また神経堤マーカーは比較は的变化なかった。また *Dlx5*, *GATA3*, *Keratin19*, *Sox2* を用いた定量 PCR においては、F2B4 外植片細胞では *Dlx5* 発現量は N2 コントロール細胞よりも 18 倍高く、*GATA3* は 8 倍、*Keratin19* は 3 倍高かった。一方、*Sox2* は 1/3 と低くなっていた。加えて、PPE マーカー *Six1*, *Eya2* は 2 倍増、三叉神経の眼神経プラコードマーカー *Brn3a* は 2 倍増となっていた。これらの結果から、F2B4 処理をすると、神経板外植片に神経板境界/PPE/非神経外胚葉の特徴を付与するものと

考えられた。ちなみに頭部の領域別の感覚神経プラコードマーカーを用いて、培養細胞上に免疫染色や *in situ* hybridization 法を施して見ると、Pax6 (nasal+lens+ophthalmic trigeminal)、Pax3 (ophthalmic trigeminal)、Pax2 (pre-otic, otic)、Gbx2 (pre-otic, otic) は常に発現するが、 δ -crystallin (lens) の発現は決して見られることはなかった(若松、私信)。またこれらの発現は、外植片から周囲に移動する細胞の最外縁の2細胞分くらい(上述の最も扁平上皮らしい構造をとる細胞群)には見られなかった。そのようなところから、神経板外植片培養法による heterogeneity が示唆された。

最近のモデルによると、神経板外縁は FGF, Wnt, BMP シグナルによって誘導され、神経板外縁細胞は *Dlx5/6*, *GATA2/3*, *Foxi1/3*, *TFAP2* 等を発現する。続いて、神経板外縁はさらに Wnt と BMP シグナルによって領域特異化が起こるようであることが分かってきた (Grove and LaBonne, 2014)。つまり、神経堤細胞は神経堤特異化遺伝子を発現し、EMT を起こし表皮外胚葉から脱上皮化するという「2ステップモデル」が広く受け入れられるようになってきた。またそれに伴って、前プラコード外胚葉の誘導についても示唆されてきたという次第である。

FGF2 と BMP4 それぞれの濃度検証を試みたときに必ずしも綺麗なデータが出た訳ではないのであるが、それは上述2ステップモデルによって、BMP シグナルが2段階にわたって抑制を受けるからであり、しかもその2つ目のステップにおいて FGF の作用を受けて BMP シグナルが抑制されるものと考えられた。この神経板外植片培養において BMP4 と FGF2 の共働作用によって初めて扁平上皮様の形態的变化が起こるのだが、その個々のタンパク質の濃度の違いによる遺伝子発現量を測定することは神経板外植片由来の細胞の heterogeneity の問題もあり、大変複雑になってしまっている。これを解消するには恐らくシングルセル解析を行うしか方途はないのかも知れない。

また、FGF2 の BMP4 に対する拮抗作用に加えて、FGF2 の後方化作用も特筆すべきである。様々な発生イベントにおいて FGF2 の後方化作用が知られているが、この培養系でレンズプラコード特異的分子マーカーの発現が全く見られなかったことから(上述) プラコードの領域特異性が付与されるステップにおいても FGF2 が機能していることが示唆された。

なお、Wnt 経路が扁平上皮形成に関わっていることは Axin コンストラクトを電気穿孔法により発現させた神経板で外植片培養を行い、定量 PCR 実験を行ったことで明らかとなった。F2B4 外植片細胞で Axin を発現させると、発現していない細胞と比べ、PPE と三叉神経プラコードに発現する分子マーカーは全て 1/2-1/3 量に低下した。従っ

て、2ステップモデルでは報告されていなかったが、三叉神経の領域特異性の決定段階で Wnt 経路が重要であることが考えられ、さらにはこれが単に三叉神経プラコードの運命をリセットするとしたら、一体何になるのかという疑問が湧き起こってくる。前述の FGF2 による後方化作用が示唆されたことから、後方プラコード特異的な分子マーカーを用いた解析が必要だろうと考えている。

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0件)

[学会発表](計6件)

Yasuyo Shigetani, Tohru Yano, and Masataka Okabe. Morphogenesis of the lateral line scales in the primitive fish *Polypterus*. 第38回日本分子生物学会、2015年11月30日、神戸

Yasuyo Shigetani, Tohru Yano, and Masataka Okabe. Morphogenesis of the lateral line in the primitive fish *Polypterus*. 第120回日本解剖学会総会全国学術集会/第92回日本生理学会大会 合同大会、2015年3月21日、神戸

Yasuyo Shigetani, Tohru Yano, and Masataka Okabe. Morphogenesis of the lateral line scales in the primitive fish *Polypterus*. 第37回日本分子生物学会、2014年11月25日、横浜

Yasuyo Shigetani and Masataka Okabe. The vertebrate-specific structures the neural crest and the placode arise from the neural border: development of a new culture method for a possible precursor of exterior epithelium of the neural plate. The 10th International Congress of Vertebrate Morphology 2013, 8th July 2013, Barcelona, Spain

Yasuyo Shigetani and Masataka Okabe. Workshop: Development of a new culture method for a precursor to the neural crest and pre-placodal ectoderm, Joint Meeting of JSDB 45th and JSCB 64th, 31st May 2012, Kobe

Yasuyo Shigetani and Masataka Okabe. Development of a new culture method for a precursor to the neural crest and pre-placodal ectoderm, Joint Meeting of JSDB 45th and JSCB 64th, 31st May 2012, Kobe

〔図書〕(計1件)

重谷安代ほか 生命科学概論 -環境・エネルギーから医療まで- 朝倉書店 2012, 52-60.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重谷安代 (SHIGETANI YASUYO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：70431773

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：