

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460251

研究課題名(和文) 一次感覚神経の発生・進化における形態と機能の連関の役割

研究課題名(英文) Role of the relation between morphology and function of sensory neuron in the development and evolution of sensory architecture

研究代表者

矢嶋 浩 (YAJIMA, Hiroshi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10433583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：体幹部感覚神経が脊髄内に位置するか、あるいは脊髄外に位置するかを司る機構は細胞自律的であり、脊髄の境界を形成・維持する機構とは独立に制御されていることが明らかになった。さらにこの機構は、体幹部感覚神経がランダムに分布するか、あるいは節構造となるかを司る機構と不可分であり、Six1遺伝子が両者を結びつけNeuropilin・Semaphorinシグナルが関与している可能性が示唆された。また、体幹部感覚神経の由来と進化の解明に、有尾両生類の発生過程が鍵となる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found 1) the developmental mechanism assigning the location of sensory neuron inside or outside spinal cord is cell-autonomous manner and acts independently of the mechanism which defines or maintains the integrity of the boundary structure between the CNS and PNS, 2) Six1 controls the mechanism and relates it to gangliogenesis of sensory neuron via Neuropilin-Semaphorin pathway and 3) urodele amphibians might have a transitional sensory architecture followed by the exclusive DRG system acquired in amniote.

研究分野：発生生物、進化発生

キーワード：発生 進化 分化 一次感覚神経 脊髄神経節 神経堤細胞 エンハンサー Six1遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた羊膜類の体幹部の感覚は、温熱・寒冷・痛み・接触・筋張力など実に多様で、それを担う神経細胞は脊髄の外にある脊髄神経節に納められている。一方、魚類や両生類の発生過程では、感覚神経の形態と機能が劇的に変化する。これらの生物では、幼少期の体幹部感覚は接触刺激のみであり、それを担う細胞は脊髄の中に存在し、Rohon-Beard細胞(RB細胞)と呼ばれている。発生が進行するとRB細胞は細胞死によって消失し、脊髄神経節の神経細胞がその機能を引き継ぐのみならず、多様な感覚を担うようになる。より原始的な体制とされる頭索類・ナメクジウオの感覚神経細胞は終生脊髄内に存在することから、この切換の過程はまるで進化の道筋を辿っているかのようである(Fritzscht & Northcutt, 1993; 倉谷と大隅, 1997)。RB細胞と脊髄神経節は、同じ体幹部一次感覚神経にもかかわらず、髄内か髄外か、頭尾軸に沿ってランダムに分布するか左右対称の繰り返し節構造をとっているか、細胞体の大きさが均一か混在か、と形態が大きく異なる。このような形態の違いと、単純な刺激の受容か、より複雑で多様な感覚形成かという機能の違いとの相互関係を明らかにすることは、神経系の進化の過程で形態と機能がいかに連関してきたかを理解する鍵となると考え本研究計画を遂行した。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究から、ホメオボックス遺伝子の一つ *Six1* が両生類・アフリカツメガエルのRB細胞から脊髄神経節への切換を担い、また、本来RB細胞を持たないマウスにおいては *Six* 遺伝子がRB細胞の出現を抑えていることが明らかになった。さらに、両生類とほ乳類の感覚神経の体制の違い(切換か脊髄神経節のみか)が、*Six1* の発現開始時期の違いに起因しており、それが *Six1* エンハンサーの配列の変化によるものであることを突きとめた。これは、*Six1* の発現のヘテロクロニックシフトが感覚神経の形態と機能の進化の鍵となった可能性を示唆するものである。

本研究計画は、これらの成果を発展させ、RB細胞と脊髄神経節の配置や節形成機構を司る遺伝子群を解明し、それらの発現操作や胚操作によって感覚神経の形態を変化させた場合に神経機能が影響されるか否かを検討することで形態と機能の連関を明らかにすることを目的とした。さらに、得られた知見をもとに、様々な脊索動物で形態と機能の連関が保存されているのかを検討することで、脊索動物体幹部一次感覚神経進化の分子基盤に迫ることを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 髄内か髄外かを司る分子機構の解明

①体幹部一次感覚神経の細胞体を髄内もしくは髄外に定める機構は、細胞自律的なものなのか、周囲の環境が重要なのかを明らかにするため、髄内一次感覚神経様細胞が生じる *Six1/Six4* 二重欠損マウスの髄内外境界の経時変化及び組織変化を観察した。

②一次感覚神経の髄内か髄外かを司る機構における *Six1* 発現タイミングの役割をより詳細に明らかにするため、*Six1^{+/+}Six4^{-/-}* 胚を用いて解析を行った。

(2) 節構造を司る分子機構の解明

脊髄神経節の節構造には、神経堤細胞と体節との相互作用が重要であり、Neuropilin(Nrp)・Semaphorin シグナルはそれを担う分子機構の一つである。そこで、野生型マウスと、脊髄神経節が癒合する *Six1/Six4* 二重欠損マウスの脊髄神経節形成過程において、Nrp1 と Nrp2 の発現を観察した。

(3) 形態と機能の連関と進化における役割

有尾両生類の脊髄形成過程は、無尾両生類アフリカツメガエルよりも羊膜類的であるとされている。脊髄形成の様式と一次感覚神経の形成・機能に連関があるのか否かを明らかにするため、有尾両生類胚における一次感覚神経の発生過程を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 髄内か髄外かを司る分子機構の解明

髄内外境界の形成・維持には、神経軸索の出入口に存在する Boundary cap 細胞(BC細胞)が関与することが知られている。*Six1/Six4* 二重欠損マウスにおいては、髄内一次感覚神経様細胞は胎齢 10.5 日(E10.5)から観察されるが(図1)、それに先立って

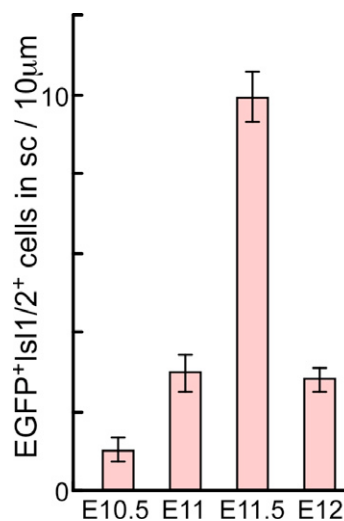


図1

のBC細胞の変化は観察されなかった(図2)。また、髄内外境界に存在する基底膜の状態を、ラミニンの分布を指標として観察したとこ

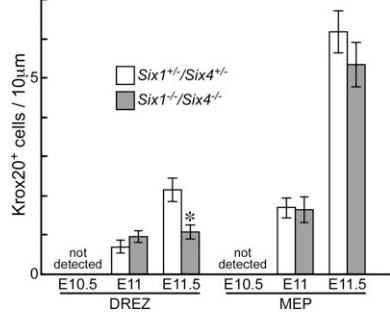
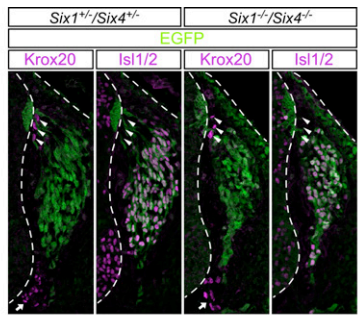


図 2

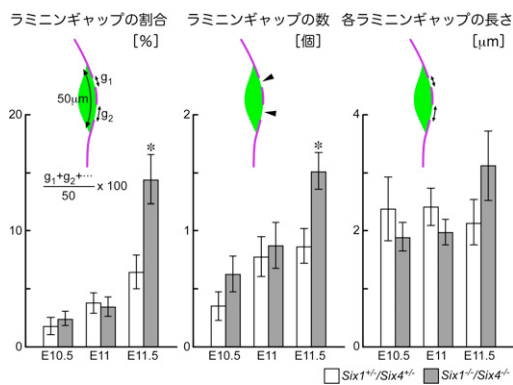


図 3

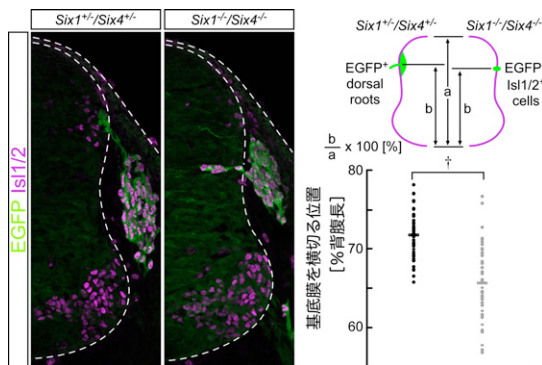


図 4

ら、同様に先行した変化は観察されなかった (図 3)。さらに、一次感覚神経様細胞が基底膜を横切る位置は、脊髄神経節からの神経突起が脊髄に接続する位置よりも腹側に分布していた (図 4)。これらの結果から、一次感覚神経の髄内か髄外かを司る機構は細胞自律的であり、髄内外境界を形成・維持する機構には従っていないことが示唆された。

Six1^{-/-}Six4^{-/-} 胚では、*Six1^{-/-}Six4^{-/-}* 胚よりも多くの髄内一次感覚神経様細胞が観察され、さらに一部は *Six1* 陽性であった。脊髄内外を隔てる基底膜を横切っている *Six1* 陽性細胞は観察されないことから、*Six1* の発現は髄内で開始したと考えられる。これらの結果から、早期から発現する *Six1* は、体幹部神経堤細胞の一部に備わっていると考えられる髄内への自律的な移動能を阻害していることが示唆された。また、*Six1* 発現の欠損ではなく、遅延によっても髄内一次感覚神経様細胞が生じることが明らかになった。

ニワトリ胚を用いた解析によって、*Six1* 遺伝子発現を司るエンハンサーの活性が甲状腺ホルモンに依存していることが示唆されたことから、髄内か髄外かを司る分子機構が甲状腺ホルモンに依存するかどうかを検討した。甲状腺ホルモン合成阻害剤であるメチマゾールを妊娠マウスに腹腔内投与しその胚を観察したが、体幹部感覚神経に顕著な変化は観察されなかった。マウス胚を *Six1^{-/-}Six4^{-/-}* や *Six1^{-/-}Six4^{-/-}* とした場合にも対照との差は観察されなかった。

(2) 節構造を司る分子機構の解明

脊髄神経節を形成する神経堤細胞では、*Nrp1* と *Nrp2* が共に陽性であるが、*Six1/Six4* 二重欠損マウスで出現する髄内一次感覚神経様細胞 (ランダムに分布) では、*Nrp1* 陽性 *Nrp2* 陰性であった (図 5)。これは、

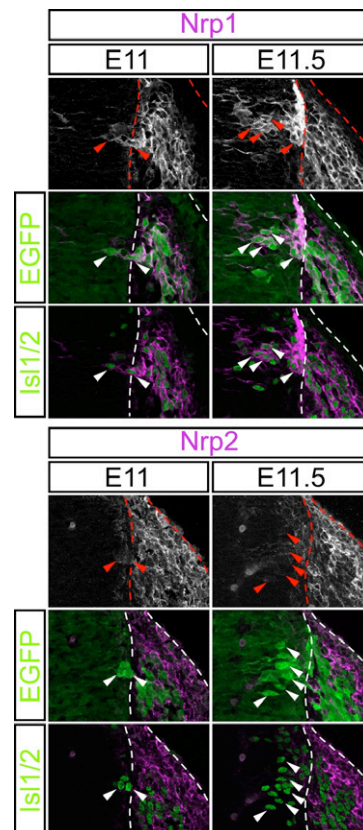


図 5

両生類の髄内一次感覚神経細胞が存在する

神経管の Nrp 発現様式 (Koestner *et al.*, 2008) と一致している。これらの結果から、節構造がランダムか、髄内か髄外か、を司る機構が不可分である可能性が示唆された。

マウス *Six1*^{+/-}*Six4*^{-/-} 胚では、*Six1*^{+/-}*Six4*^{+/-} 胚よりも多くの髄内一次感覚神経様細胞が観察されたにもかかわらず、顕著な節構造の変化は観察出来なかった。この結果から、節構造の形成には 1 コピーの *Six1* で十分である可能性が示唆された。

(3) 形態と機能の連関と進化における役割

爬虫類・スッポン胚においては、他の羊膜類同様、髄内一次感覚神経細胞は観察されなかった。有尾両生類の髄内一次感覚神経細胞はアフリカツメガエルよりも脊椎の側面に位置し、その発生のタイミングも遅延していた。特にアホロートル胚 (岡山大学、水戸川和正先生、佐藤伸先生との共同研究) は、観察を行ったどの有尾両生類胚よりも脊椎形成過程が羊膜類的であり、髄内一次感覚神経細胞の位置は *Six1/Six4* 二重欠損マウス胚の髄内一次感覚神経様細胞に酷似していた (図 6)。更に、その発生のタイミングも遅延しており、同じ神経板・表皮外胚葉境界由来の神経堤細胞の出現に近いものであった。これらの結果から、アホロートルが脊椎の発生様式と体幹部感覚神経の由来・進化を結びつける鍵となる可能性が示唆された。

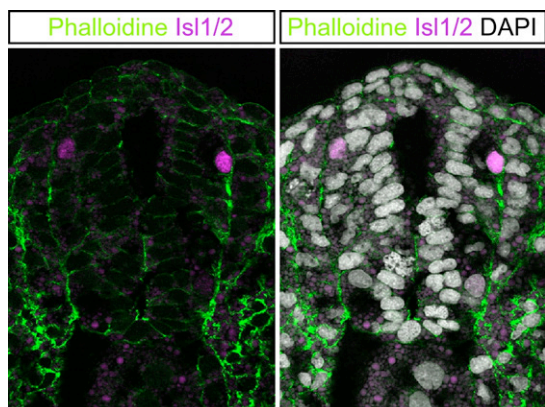


図 6

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 4 件)

① Tatsuki Kawasaki, Masanori Takahashi, Hiroshi Yajima, Yoshiyuki Mori and Kiyoshi Kawakami

Six1 is required for mouse dental follicle cell and human periodontal ligament-derived cell proliferation, 58/6, 2016, Development, Growth & Differentiation, 査読有

DOI: 10.1111/dgd.12291

② Hiroshi Yajima and Kiyoshi Kawakami

Low *Six4* and *Six5* gene dosage improves dystrophic phenotype and prolongs life span of mdx mice, 58/5, 2016, Development, Growth & Differentiation, 査読有
DOI: 10.1111/dgd.12290

③ Shigeru Sato, Hiroshi Yajima, Yasuhide Furuta, Keiko Ikeda and Kiyoshi Kawakami
Activation of *Six1* Expression in Vertebrate Sensory Neurons, 10(8), 2015, PLoS ONE, 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0136666

④ Hiroshi Yajima, Makoto Suzuki, Haruki Ochi, Keiko Ikeda, Shigeru Sato, Ken-ichi Yamamura, Hajime Ogino, Naoto Ueno and Kiyoshi Kawakami

Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates, 12(1), 2014, BMC Biology, 査読有

DOI: 10.1186/1741-7007-12-40

[学会発表] (計 4 件)

① 矢嶋浩, 佐藤滋, 林利憲, 小柴和子, 竹内隆, 川上潔
脊椎動物体幹部感覚神経進化における *Six1* 遺伝子の役割
第 86 回 日本動物学会年会, 1K1615, 2015 年 9 月 17 日~19 日, 朱鷺メッセ (新潟市)

② 矢嶋浩
脊椎動物体幹部感覚神経の発生と進化の鍵
第 5 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting, 2015 年 8 月 11 日, 東京慈恵会医科大学 (東京都)

③ 矢嶋浩, 佐藤滋, 林利憲, 竹内隆, 川上潔
A missing link in the evolution of sensory architecture in craniates
日本発生生物学会 第 48 回大会, P-115, 2015 年 6 月 2 日~5 日, つくば国際会議場 (つくば市)

④ 矢嶋浩, 佐藤滋, 川上潔
マウス髄内一次感覚神経様細胞の成り立ちから考える脊椎動物一次感覚神経の進化
第 85 回 日本動物学会年会, 3C1100, 2014 年 9 月 13 日, 東北大学川内北キャンパス (仙台市)

[その他]

ホームページ等

① 自治医科大学・分子病態治療研究センター・細胞生物研究部
<http://www.jichi.ac.jp/biol/>

② researchmap

<http://researchmap.jp/hyajima/>

③ Google Scholar

<http://scholar.google.co.jp/citations?user=AJw8dKYAAAAJ&hl=ja>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢嶋 浩 (YAJIMA, Hiroshi)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：10433583

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田村 宏治 (TAMURA, Koji)
東北大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：70261550