

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460253

研究課題名(和文) GnRHニューロンの脳内移動におけるセマフォリン3Aの役割

研究課題名(英文) A Chemorepulsive Effect of Semaphorin 3A on the Migration of GnRH Neurons in the Chick Forebrain.

研究代表者

村上 志津子 (MURAKAMI, Shizuko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20255649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：発生過程において嗅覚器原基から移動した生殖線刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)産生ニューロンは脳内に進入後、中隔背側部で腹側方向へ進路を変更する。ニワトリ胚では嗅球と中隔背側部に反発性軸索ガイダンス分子セマフォリン3A(Sema3A)の局所的発現があり、進路変更におけるSema3Aの関与が推察された。ニワトリ胚前脳にエレクトロポレーション法でSema3A遺伝子を異所性導入すると、GnRHニューロンは異所性Sema3A発現領域近傍で分散し、後方への移動が障害された。生体内でSema3AはGnRHニューロンに対し反発性に作用することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons originate in the olfactory placode and migrate to the forebrain. In exploring the molecular mechanisms guiding GnRH neurons to their final locations in the forebrain, we found that chick semaphorin 3A (Sema3A) mRNA is expressed in the olfactory bulb and the restricted region of the dorsal septum region (DS) to which GnRH neurons tend to avoid approaching. Most migrating GnRH neurons expressed neuropilin-1 mRNA, a Sema3A receptor. To investigate the chemorepulsive effect of Sema3A on the migration of GnRH neurons in the forebrain, we misexpressed Sema3A by in ovo electroporation in the ventral part of the medial forebrain of embryonic day (E) 3.5. At E6.5-7, GnRH neurons entered the medial forebrain, but failed to migrate to the DS over the site in which Sema3A was misexpressed. These results suggest that Sema3A acts as a chemorepulsive cue for the migration of GnRH neurons in the chick forebrain.

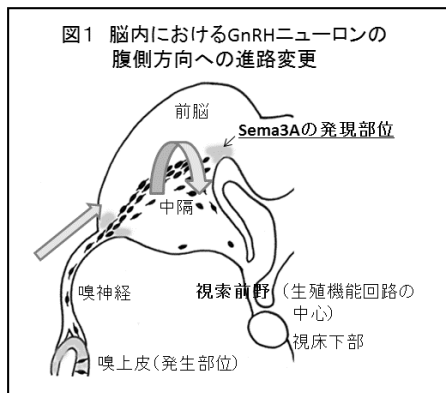
研究分野：神経発生

キーワード：GnRHニューロン 軸索ガイダンス分子 セマフォリン3A ニューロン移動 エレクトロポレーション
ニワトリ胚

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖機能の中核である生殖線刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)産生ニューロンは、他の脳ニューロンとは異なり、嗅覚器原基で発生し脳へと移動する。脳外から脳内に移動したGnRHニューロンは、前脳の視索前野から視床下部後方に定着し、生殖機能回路を形成する。GnRHニューロンの最終目的地への移動と定着は生殖活動にとって重要である。しかしながら、脳内におけるGnRHニューロンの分布は、神経核としてまとまっていないため、個々のニューロンの動態を時間経過とともに詳細に追跡するのは難しく、GnRHニューロンの最終目的地への移動経路の特定や定着機構についての研究は非常に少ない。

(2) ニワトリ胚において、GnRHニューロンと移動のガイド構造に相当すると考えられる神経線維との相互関係を組織学的に観察した結果、脳内に進入したGnRHニューロンは、神経線維依存性に前脳奥の中隔背側部へ移動し、この地点で神経線維非依存性にかつ腹側方向へと進路を変更することを見いだした(図1, Murakami et al., 2010)。脳内におけるGnRHニューロンの腹側方向への経路選択はマウスでも見られ、種を越えた共通事項と考えられる。経路変更における分子メカニズムの解明は、GnRHニューロンの移動と定着機構を理解する上で重要である。



(3) 標的組織近傍に存在する液性の軸索ガイダンス分子は誘引あるいは反発活性によってニューロンや神経突起を正しい標的に導き、中枢神経系の神経回路形成に関与する。反発性軸索ガイダンス分子として知られるセマフォリン 3A (Sema3A) は胎生期の脊髄神経節や嗅神経などの軸索伸長を阻害する分子として知られている。ニワトリ胚での観察から、GnRHニューロンの脳内進入部位近くの嗅球と、前脳内側部の進路変更地点近傍に、Sema3A mRNA が限局して発現し(図1)移動中のGnRHニューロンの多くが受容体ニューロピリン1を発現することがわかった。Sema3AはGnRHニューロンの移動方向の分岐点で作用する反発因子候補であると想定し、組織培養を用いた移動アッセイ系で解析した結果、GnRHニューロンに対するSema3Aの

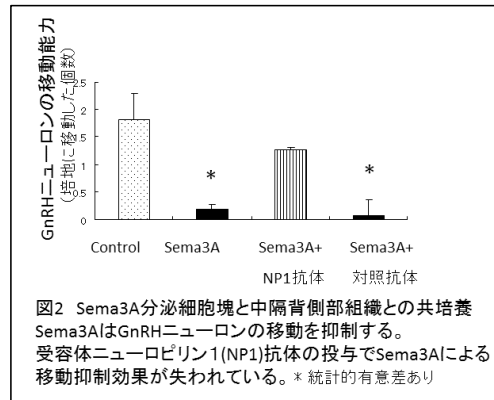


図2 Sema3A分泌細胞塊と中隔背側部組織との共培養
Sema3AはGnRHニューロンの移動を抑制する。
受容体ニューロピリン1(NP1)抗体の投与でSema3Aによる移動抑制効果が失われている。* 統計的有意差あり

反発活性が証明された(図2)。これらは、GnRHニューロン移動における脳内Sema3Aの役割を示唆する結果である。

(4) Sema3Aおよびニューロピリン1,2分子のノックアウトマウスではGnRHニューロンの移動異常が報告されている(Cariboni et al., 2011)。しかし、移動異常は脳外で生じているため、脳内に発現しているSema3AのGnRHニューロンに対する機能はこれらのノックアウトマウスでは解析できない。GnRHニューロンの脳内移動における反発性軸索ガイダンス分子の機能を生体で検証するには、ニワトリ胚を用いた領域・時期特異的な遺伝子導入実験が有用である。生体におけるSema3AのGnRHニューロンに対する反発活性を検証するために、ニワトリ胚生体内への遺伝子導入によりGnRHニューロンの移動に対するSema3Aの機能を調べることで、GnRHニューロンの脳内進路変更におけるSema3Aの役割の解明を計画した。

2. 研究の目的

(1) GnRHニューロンの脳内移動にSema3Aが反発性に作用する可能性を生体で検証し、脳内におけるSema3Aの局所的発現はGnRHニューロンの進路変更に関与することを示す。培養系では移動中のGnRHニューロンの移動能はSema3Aの存在下で低下しており、同様の作用が生体でも生じるかを確認する。そのために、脳内の移動経路上にSema3A遺伝子を異所性導入し、Sema3Aに対するGnRHニューロンの反応性を調べる。

(2) GnRHニューロンに発現するSema3A受容体の機能抑制実験を行う。ニューロピリン1はSema3Aのシグナル伝達を仲介する受容体である。RNAi(RNA interference; RNA干渉)法により移動中のGnRHニューロンにおけるニューロピリン1の遺伝子発現を抑制し、GnRHニューロンの移動動態を調べる。Sema3AのGnRHニューロンに対する反発活性がニューロピリン1を介するものであることを示し、GnRHニューロンの進路変更地点におけるSema3Aの作用機序の分子機構を調べる。

3. 研究の方法

(1) 前脳へのニワトリ Sema3A 遺伝子の異所性導入と GnRH ニューロンの移動動態解析
GnRH ニューロンの脳内進入がもっとも盛んに起こるのは E5.5-6 日からである。エレクトロポレーションによる遺伝子導入では、12-24 時間後には遺伝子発現がみられることと、胚の操作が比較的容易であることから、E3.5 日胚で導入を行った。導入するニワトリ Sema3A 遺伝子はゲノムに転移するメガカトランスポゾン Tol2 の発現ベクターに組み込まれているため、細胞分裂によって遺伝子の発現が低下することはない (Watanabe et al., 2014)。前脳内側部における Sema3A 遺伝子の導入部位は、GnRH ニューロンの進路変更地点よりも前方の移動経路に限定した。導入 3 日後の腹側方向への移動が盛んになる E6.5-7 日胚を 4% パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (4% PFA/PB) にて固定後、クリオスタット切片を作成し、GnRH ニューロン分布、GnRH ニューロンのガイド構造である嗅神経内側枝の走行について免疫組織化学染色や蛍光多重免疫組織化学染色を用いて、形態学的に調べた。正常発生において嗅神経内側枝は GnRH ニューロンの進路変更地点である中隔背側部で伸長を停止するので、GnRH ニューロンと同様に Sema3A に反応している可能性がある。導入部位確認には pCAGGS-EGFP ベクターを共導入した。

(2) RNAi 法によるニューロピリン 1 遺伝子発現抑制

移動中の GnRH ニューロンにおける Sema3A 受容体ニューロピリン 1 の発現パターン
GnRH ニューロンにおけるニューロピリン 1 の発現は一時的で、脳内に進入する E5-7.5 日にかけて強く、E9 にはほとんど検出できなくなる。受容体の一時的な発現パターンから、GnRH ニューロンの脳内移動において Sema3A の反発活性はニューロピリン 1 を介して起こっていると思われる。移動経路変更の前後で GnRH ニューロン上のニューロピリン 1 の発現パターンが変化するかどうかが蛍光二重免疫組織染色にて観察した。

ニューロピリン 1 遺伝子発現抑制実験
遺伝子機能抑制効果を示す 20 塩基程度の短い siRNA (short interference RNA) は、相補的な配列をもつ標的 mRNA と結合し切断することで標的遺伝子の発現を抑制する。合成 siRNA オリゴヌクレオチドをエレクトロポレーションで細胞内に導入し、機能抑制が可能であることがニワトリ胚で報告されている。遺伝子機能抑制の効果は発現ベクターに siRNA を組み込んだ場合に比べると短い、5-7 日間持続するとされている。ヌクレアーゼであるダイサー (Dicer) の基質として認識され切断されるように設計された抑制効率の高い合成 siRNA (DsiRNA; 日本生物研究所) を用いた。ニワトリニューロピリン 1 mRNA

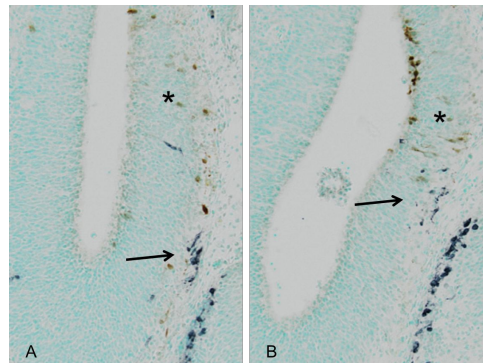


図3 前脳内側部における異所性 Sema3A 発現領域における GnRH ニューロンの動態。7 日胚の前脳前額断標本。(A) 前脳内へ進入した GnRH ニューロンが集団となって観察される (矢印)。背側部の移動経路には異所性 Sema3A が発現している (*、茶色)。(B) (A) から約 100 μm 後方の標本。移動中の GnRH ニューロン (矢印、青) は分散し、Sema3A 発現領域 (*) を越えない。遺伝子非導入の反対側では GnRH ニューロンが集団となって背側方向へと移動している。

に対する 27 塩基の DsiRNA (20 μM) と GFP 発現ベクターを 3.5 日胚の嗅上皮にエレクトロポレーションで導入し、3 日後の 6.5 日胚で GnRH ニューロンの移動動態を組織学的に観察した。

4. 研究成果

(1) 前脳内側部への Sema3A 遺伝子異所性導入による GnRH ニューロン移動抑制

GnRH ニューロンの進路変更地点である中隔背側部よりも前方の移動経路途中に異所性 Sema3A が発現した個体では、脳内に進入した GnRH ニューロンは異所性 Sema3A 発現領域の近傍で脳実質内に分散し、より後方の中隔背側部への移動が阻害された (図 3)。GnRH ニューロンの脳内進入部位である嗅球尾側近傍に異所性 Sema3A が発現した個体では、GnRH ニューロンの多くは前脳表層で塊状となって分布し、脳内への進入が阻害された。これらの結果は、生体において GnRH ニューロンは Sema3A に対し反発性に反応することを明らかに示している。

異所性 Sema3A に反応した GnRH ニューロンが脳実質内へ分散した結果は、正常発生において進路変更地点で GnRH ニューロンが腹側方向へ分散する現象とよく似ている。前脳の特定部位に発現する Sema3A は GnRH ニューロンの移動に対して反発性に作用することで、GnRH ニューロンの脳内移動経路の形成に関与していると考えられる。

GnRH ニューロンの移動とカルマン症候群は密接な関係がある事が知られているが、最近、カルマン症候群患者において、Sema3A 遺伝子の欠失が報告された (Young et al., 2012)。カルマン症候群は X 染色体にリンクした遺伝子疾患で、無嗅覚を伴った性腺機能低下症を示す。カルマン症候群の原因は多様であるが、胎生期における GnRH ニューロンの移動異常

が原因のひとつであるとされている。カルマン症候群では脳内に進入した GnRH ニューロンの脳内定着に障害があるかもしれない。

前脳腹側部に発現する軸索ガイダンス分子ネトリン 1 は、GnRH ニューロン移動に対し誘因性に作用することはすでに判明している (Deiner and Straven, 1999; Schwaltling et al., 2001; Murakami et al., 2010)。本研究の結果を併せると、GnRH ニューロンの進路変更と腹側方向への移動は、反発性と誘引性の 2 つの異なる軸索ガイダンス分子の協働作用によって調節されている可能性が示唆される。

脳内移動のガイド構造と考えられる嗅神経内側枝の一部はソマトスタチンを特異的に発現している。ソマトスタチン陽性線維束は前脳内側部表層直下に沿って中隔背側部まで伸長する。異所性 Sema3A 発現領域近傍にソマトスタチン陽性線維は伸長していたが、中隔背側部への伸長は認められなかった。GnRH ニューロンと同じく嗅神経内側枝も異所性 Sema3A に反発性に反応し、突起伸長が抑制されたと考えられる。しかし、移動経路途上の異所性 Sema3A に対し GnRH ニューロンは分散したが、ソマトスタチン陽性線維束の走行に乱れはなかった。異所性 Sema3A に対する GnRH ニューロンの分散は、嗅神経内側枝の伸長阻害による二次的効果というよりは Sema3A の GnRH ニューロンに対する直接効果の可能性が高いと考えられる。

(2) RNAi による GnRH ニューロン上のニューロピリン 1 遺伝子発現抑制

移動中の GnRH ニューロンは Sema3A 受容体であるニューロピリン 1 mRNA を一時的に強く発現する。脳内移動過程における GnRH ニューロン上のニューロピリン 1 発現パターンの違いについて、脳内移動が盛んな E6-7 日胚で調べた。進路変更前では嗅神経内側枝に沿って移動中の多くの GnRH ニューロンは NP1 を共発現していたが、移動経路途上や進路変更地点で嗅神経内側枝から離れた GnRH ニューロンはニューロピリン 1 を発現していなかった。この結果は、GnRH ニューロンの進路変更に関与する可能性を示唆する。

siRNA を用いた GnRH ニューロン上のニューロピリン 1 発現抑制実験では、実験群および negative control siRNA を導入した対象群のいずれにおいても GnRH ニューロンの移動動態に差は認められなかった。siRNA の塩基配列デザインや投与時期など実験条件の検討が必要である。Sema3A の受容体は複数あることから、プレキシシン A1 など他の受容体の関与を考慮する必要がある、今後の課題である。

<引用文献>

Cariboni-A, Davidson K, Rakic S, Maggi R, Parnavelas JG, Ruhrberg C. Defective gonadotropin-releasing hormone neurons migration in mice lacking SEMA3A signaling through NRP1 and NRP2: implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Mol Genet*, 2011, 20:336-344.

Diner MS, Stravan DW. Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin 1- and DCC-deficient mice. *J Neurosci*, 1999, 19:9900-9912.

Murakami S, Ohki-Hamazaki H, Watanabe K, Ikenaka K, Ono K. Netrin 1 provides a chemoattractive cue for the ventral migration of GnRH neurons in the chick forebrain. *J Comp Neurol*, 2010, 518:2019-2034.

Schwartz GA, Kostek C, Bless EP, Ahmad N, Tobet SA. Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain. *J Neurosci*, 2001, 21:911-919.

Watanabe Y, Sakuma C, Yaginuma H. NRP1-mediated Sema3A signals coordinate laminar formation in the developing optic tectum. *Development*, 2014, 141:3572-3582.

Young J, Metay C, Bouligand J, Tou B, Francou B, et al., *Hum Reprod*, 2012, 27:1460-1465.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 6 件)

Shizuko Murakami, Yasuo Uchiyama: Somatostatin affects development of the GnRH neuron system in the chick olfactory-forebrain axis. Neuro2013(第 36 回日本神経科学学会、第 56 回日本神経化学大会、第 23 回日本神経回路学会大会)、2013 年 6 月 21 日(国立京都国際会館・京都府・京都市)

Shizuko Murakami, Yasuo Uchiyama: Facilitatory effects of somatostatin on GnRH neuron migration and olfactory axon fasciculation. Neuroscience2014 (第 37 回日本神経科学大会)、2014 年 9 月 12 日、(パシフィコ横浜・神奈川県・横浜市)

村上志津子・小野勝彦・内山安男、セマフォリン 3A 遺伝子異所性発現による GnRH ニューロンの脳内移動抑制、第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015 年 3 月 22 日、(神戸ポートピア・兵庫県・神戸市)
Shizuko Murakami, Katsuhiko Ono, Yasuo Uchiyama: Chemotropic effect of Semaphorin 3A on the Migration of GnRH

Neurons in the Chick Forebrain. 第 38
回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日、
(神戸ポートピア・兵庫県・神戸市)
村上志津子、GnRH ニューロンの脳内移動に
おける分泌性軸索ガイダンス分子の役割、
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2016 年 3 月 28 日、(ビックパレットふくし
ま・福島県・郡山市)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 志津子 (MURAKAMI, Shizuko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20255649

(2) 研究分担者

小池 正人 (KOIKE, Masato)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80347210

佐々木 光穂 (SASAKI, Mitsuho)

医薬基盤・健康・栄養研究所・疾患モデル

小動物研究室・プロジェクト研究員

研究者番号：20432536