

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890016

研究課題名(和文) 発生早期の頸髄神経で観察される細胞分化とリンクしたアポトーシスに関する研究

研究課題名(英文) A study on the differentiation-linked apoptosis of the motor neurons in the cervical spinal cord of the developing chick embryo.

研究代表者

向笠 勝貴 (MUKAIGASA, Katsuki)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60706349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：発生早期ニワトリ胚の頸髄で特異的に観察される運動神経細胞死は、他の運動神経細胞死とは異なる特有の細胞死であると示唆されているが、実態は明らかではない。本研究では、頸髄特異的な細胞死と発現領域が重複しているが、細胞死との関連がまだ明らかではないFoxP1の機能解析を行った。解析の結果、FoxP1が細胞死を直接誘導しているという結果は得られず、むしろFoxP1は、脊髄の上腕部と同じく、頸髄においても上肢筋を支配する運動神経の誘導に働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Motor neuron cell death observed specifically in the cervical spinal cord of the developing chick embryo is suggested to be a unique cell death compared to the other motor neurons, however, characteristics of this motor neuron cell death is largely unknown. In the present study, we examined the function of FoxP1, because the relation between FoxP1 and motor neuron cell death is unclear, though the expression of FoxP1 overlaps with the cell death region in the cervical spinal cord. As a result of functional analysis of FoxP1, the direct induction of cell death by FoxP1 was not confirmed, but rather the role of FoxP1 was suggested to be the induction of motor neurons innervating limb also in the cervical spinal cord similarly to the brachial spinal cord.

研究分野：発生生物学

キーワード：アポトーシス FoxP1 ニワトリ 脊髄 神経

1. 研究開始当初の背景

脊髄の運動神経細胞は、その発生過程において、一旦過剰に産生された後、投射先由来の栄養因子に依存して一定数が生き残り、残りは細胞死に至る。この細胞死は、正常な発生過程の一時期（ニワトリ胚では6～10日胚）に脊髄全体で観察され、筋に対して適切な量の運動神経を形成するために必要な機構である。

一方、ニワトリ胚発生過程のより早期（4～5日胚）では、上肢筋を支配しない頸髄領域のみで細胞死が観察される。ここで見られる細胞死は、前述の栄養因子に関連した細胞死と比べ、細胞死の期間が異なる、細胞死の領域が頸髄に限局する、神経栄養因子に依存しない、といった違いがあり、栄養因子に関連した細胞死とは明確に区別できる。しかし、発生早期に起こる頸髄特異的な細胞死がどのような分子機構で制御されているかほとんどわかっておらず、さらにこの細胞死にどのような意義があるのかについても不明なままである。

我々の研究グループでは、この「発生早期に起こる頸髄特異的な細胞死」に着目してこれまで解析を行ってきており、この細胞死の進行には caspase が関与していること、抗アポトーシス因子である Bcl-2 の強制発現で細胞死が抑制されることなどを報告してきた。また、運動神経細胞は軸索の投射パターンからいくつかのサブグループに分けられるが、最近の知見では、個々のサブグループを特徴付ける転写因子（Isl1, Isl2, Lhx1, Lhx3, Hb9, FoxP1 など）の発現パターンも明らかになってきた。我々の解析でも、これらの転写因子の発現パターンを調べ、細胞死のパターンと比較したところ、頸髄で細胞死に至る細胞は Lhx3 陰性 FoxP1 陽性のパターンを示すこともわかってきた。この結果から、「発生早期に起こる頸髄特異的な細胞死」は細胞分化とリンクして細胞自律的に起こることが予想されたが、その証明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、ニワトリ胚の発生早期に起こる頸髄特異的な細胞死に着目して、この細胞死を制御している分子基盤を明らかにすることを目的とする。特に、細胞死を起こす細胞は FoxP1 陽性であることから、FoxP1 と細胞死の関連性を調べる。

3. 研究の方法

(1) エレクトロポレーション法による脊髄への遺伝子導入

FoxP1 の機能解析では、ニワトリ胚神経管内に DNA を注入し、電圧で細胞内に DNA を入れるエレクトロポレーション法を利用して、FoxP1、あるいは FoxP1 発現抑制に働く遺伝子を脊髄に導入し、その影響を観察した。

(2) 組織切片での免疫染色と細胞死の検出

エレクトロポレーションの後、目的の発生段階に達した時点で組織切片を作製し、免疫染色を行い、神経細胞の分化に関わる Isl1/2, Lhx1, Lhx3, Hb9, FoxP1, Phox2b, Oc1, Raldh2, アポトーシスの進行に関わる caspase3, 神経細胞マーカー β -tubulin, SC-1 などの発現パターンを調べた。また、アポトーシスに伴う断片化 DNA を検出する TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) 法により、細胞死を検出した。

4. 研究成果

(1) microRNA-9 を利用した FoxP1 発現抑制

microRNA は、タンパク質に翻訳されず、他の遺伝子の発現抑制に働く non-coding RNA であり、そのうちの microRNA-9 (miR-9) は FoxP1 の翻訳抑制を行うことが報告されている。この miR-9 をエレクトロポレーション法で頸髄に過剰発現させ、FoxP1 を抑制した時に、頸髄の細胞死にどのような影響があるかを調べた。miR-9 過剰発現後、頸髄細胞死が最も顕著に見られる 4.5 日胚にて TUNEL 法により細胞死を検出したところ、細胞死の数が減少していた。免疫染色を行ったところ、FoxP1 陽性細胞の数も減少しており、運動神経全体で発現する Isl1/2 を発現している細胞も減少していた。さらに、細胞死が起こる前の段階でも調べてみると、やはり FoxP1 陽性、Isl1/2 陽性細胞の数は減少していた。TUNEL 法により細胞死を調べたが、miR-9 過剰発現で通常より早い段階で細胞死が誘導されていることはなかった。つまり、miR-9 を過剰発現させると、FoxP1 陽性の運動神経細胞の産生が抑制され、FoxP1 陽性細胞がないと細胞死も観察されなくなることがわかった (図 1)。

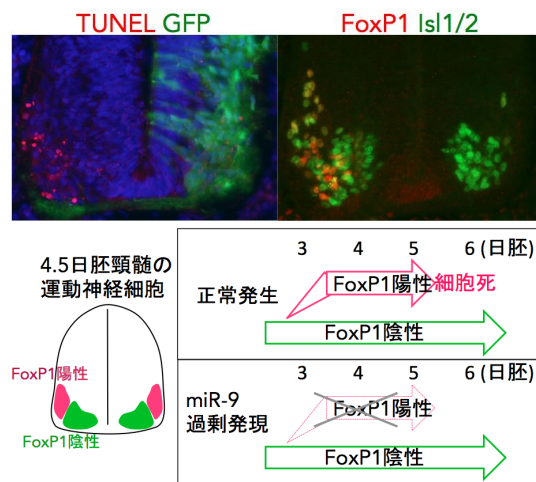


図 1. (上段) ニワトリ胚 4.5 日胚の頸髄横断切片。右側に miR-9 を過剰発現させた。miR-9 過剰発現により細胞死の減少と FoxP1 陽性細胞の減少が観察された。

(下段) 正常発生と miR-9 過剰発現時のニワトリ胚頸髄における運動神経細胞の発生の模式図。

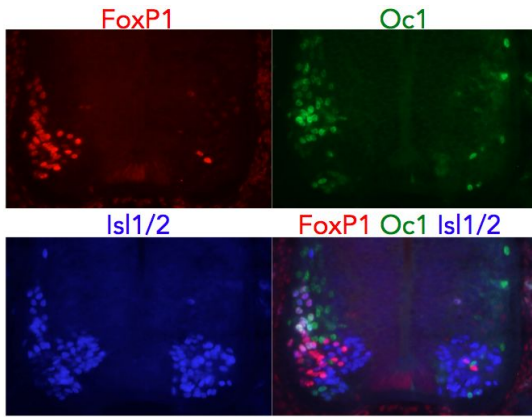


図 2. ニワトリ胚 4.5 日胚の頸髄横断切片。右側に miR-9 を過剰発現させた。FoxP1 だけでなく Oc1 の発現も減少している。

(2) shRNA による FoxP1 特異的発現抑制

miR-9 に関する最近の報告では、miR-9 が FoxP1 以外にも様々な遺伝子を抑制することがわかってきている。特に、Onecut1(Oc1)は、FoxP1 と発現領域が一部重なっているが、FoxP1 同様 miR-9 により発現抑制を受けることが確認された(図 2)。そのため、miR-9 過剰発現の実験では、FoxP1 と細胞死の直接の関係を検証することができないと考えられた。そこで次に、RNA 干渉を利用した FoxP1 特異的な機能阻害を試みた。今回は FoxP1 特異的な配列で short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを作製し、このベクターをエレクトロポレーションで脊髄へ導入する方法をとった。FoxP1shRNA を発現させた後、細胞死が起こる前から終了後(4~6 日胚)にかけて、頸髄運動神経における遺伝子発現と細胞死のパターンを免疫染色により詳細に観察した。まず、細胞死の前の時期(4 日胚)で観察したところ、実際に FoxP1 の発現低下を確認することができ、FoxP1 陰性の運動神経で発現している Lhx3 の発現は特に変化なかった。細胞死のピーク時(4.5 日胚)で、細胞死の進行に関わる caspase3 の活性化を調べてみると、FoxP1shRNA によりやや減少していたものの、はっきりとした差は認められなかった。FoxP1shRNA により細胞死が抑制されたかどうかを確認するために、通常では細胞死でなくなってしまう細胞が、細胞死が終了した後も残っているかどうかを調べた。細胞死を起こす細胞は、Isl1/2 陽性/Lhx3 陰性/Phox2b 陰性であることがわかっている。このパターンを示す細胞の数を、細胞死の終了時期である 5 日胚で調べたところ、FoxP1shRNA を発現させた側と対照側とで差は見られなかった。つまり、少なくとも今回作製した FoxP1shRNA を用いた条件においては、FoxP1 の発現抑制で細胞死は抑制されないことがわかった。

(3) Hb9 エンハンサーを使用した運動神経特異的な FoxP1 過剰発現

FoxP1shRNA による発現抑制では、細胞死に対する FoxP1 の関与が見出せなかったため、

次に、FoxP1 過剰発現を試みた。発現時期と領域を運動神経のみに限局するため、Hb9 遺伝子の転写制御領域下に FoxP1 を組み込んだ発現ベクターを作製した。このベクターをエレクトロポレーションにより頸髄へ導入した後、遺伝子発現のパターンを免疫染色で確認した。

まず細胞死が起こっている時期(4.5 日胚)で観察してみると、脊髄の前角の運動神経が存在する領域のみで外因性の FoxP1 が発現していることが確認できた。さらに、通常では FoxP1 が発現していない Lhx3 陽性運動神経にも異所性に FoxP1 の発現が見られた。活性化 caspase3 の発現により細胞死を調べてみたが、FoxP1 の過剰発現により顕著な変化は見られなかった。次に細胞死が終了した後の時期(5~6 日胚)での観察を行った。通常、この時期には FoxP1 陽性細胞は消失しているが、過剰発現させた場合、5~6 日胚においても FoxP1 陽性細胞が確認できた(図 3)。活性化 caspase3 の発現を調べたが、5~6 日胚で細胞死の誘導は確認できなかった。つまり、FoxP1 の過剰発現では細胞死の誘導は起こらないことがわかった。

FoxP1 過剰発現では細胞死の誘導ができなかったことから、頸髄での FoxP1 は細胞死の誘導以外の機能を持っていることが予想される。頸髄において FoxP1 がどのような機能をもっているかを確かめるため、過剰発現後、5~6 日胚で見られた FoxP1 陽性細胞がどのような細胞になっているか検証を行った。免疫染色により、脊髄運動神経で発現しているいくつかの遺伝子の発現を調べたところ、過剰発現後 5~6 日胚において FoxP1 を発現している細胞で、Raldh2 や Lhx1 の発現が誘導されていることがわかった。Raldh2 や Lhx1 は上肢筋を支配する運動神経で発現が見られる遺伝子であるため、FoxP1 過剰発現後、頸髄で見られる FoxP1 陽性細胞は、上肢筋を支配する運動神経へ分化していることが示唆された(図 3)。

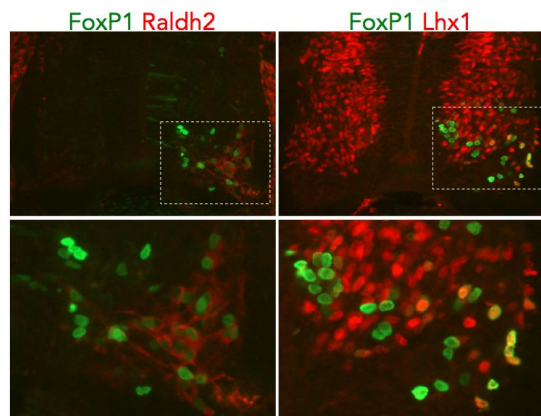


図 3. ニワトリ胚 5~6 日胚の頸髄横断切片。右側に FoxP1 を過剰発現させた。下段は、点線で囲った範囲の拡大図。FoxP1 陽性細胞では上肢筋支配神経で発現する Raldh2、Lhx1 の発現が確認された。

(4) 今後の展望

本研究において、頸髄運動神経における細胞死に FoxP1 が関与しているという当初想定していた仮説を支持する結果は得られなかった。むしろ、FoxP1 は、脊髄の上腕部だけでなく、頸髄でも上肢筋を支配する運動神経の誘導に関与し、細胞死は頸髄での上肢筋支配神経の形成を抑えるために起きているという新たな仮説が得られた。今後は、細胞死を制御する因子の特定、過剰発現実験を行った後の軸索の走行などの解析を進めていく予定である。

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3件)

Mukaigasa K, Yaginuma H. Transcription factor FoxP1 is involved in the induction of apoptosis specific to the cervical spinal cord of chick embryo (転写因子 FoxP1 はニワトリ胚において頸髄特異的なアポトーシス誘導に関与する) 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 22 日, 神戸

Mukaigasa K, Yaginuma H. FoxP1 contribute to the differentiation of the specific motoneurons committed to apoptosis in the cervical spinal cord of the developing chick embryo (発生期ニワトリ胚の頸髄において FoxP1 はアポトーシスに至る特異的な運動ニューロンの分化に関与する) 日本発生生物学会 第 47 回大会, 2014 年 5 月 28-29 日, 名古屋

向笠勝貴, 八木沼洋行. ニワトリ胚発生早期に見られる頸髄運動神経のアポトーシスに対する転写因子 FoxP1 の関与. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2014 年 3 月 29 日, 栃木

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/cms/anatomy1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向笠 勝貴 (MUKAIGASA, Katsuki)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60706349