

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月25日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300130

研究課題名（和文）Runx ファミリー転写因子の神経発生における機能の包括的解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the roles of Runx family transcription factors in the neural development

研究代表者

志賀 隆 (SHIGA TAKASHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50178860

研究成果の概要（和文）：遺伝子欠損マウスを用いて転写因子 Runx1 と Runx3 の末梢神経系と中枢神経系での神経発生における機能を解析し、脊髄神経節では Runx1 が細胞増殖を抑制し、ニューロンへの分化を促進すること、三叉神経節では Runx3 が機械受容性ニューロンの細胞分化と軸索投射に必須であること、舌下神経核では Runx1 が運動ニューロンの舌筋への軸索投射や終末形成に関与することを示し、Runx ファミリー転写因子の神経発生における新しい機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We examined the roles of Runx1 and Runx3 transcription factors in the neural development. We showed (1) Runx1 promotes the neuronal differentiation of dorsal root ganglion cells, (2) Runx3 regulates the subtype specification and axonal projection of mechanoreceptive sensory neurons in the trigeminal ganglion, and (3) Runx1 is involved in the axonal projection and synapse formation of the hypoglossal motoneurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：転写因子、細胞分化、細胞増殖、軸索投射、神経発生、遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

Runx ファミリー転写因子は、ショウジョウバエの segmentation gene の runt と高いホモロジーを示す DNA 結合ドメインを持ち、無脊椎動物から哺乳類まで進化的に保存されている。哺乳類では Runx1～Runx3 の3つが同定され、細胞分裂、細胞分化、アポトーシスなどの発生現象において非常に重要な役割を果たしている。すなわち、Runx1 は

造血幹細胞に発現して血球細胞の分化に関与し、急性骨髄性白血病の原因因子の1つである。Runx2 は骨芽細胞に発現し、鎖骨頭蓋異形成症の原因因子である。また、Runx3 は種々の細胞のアポトーシスや細胞分化に関与し、特に胃粘膜上皮ではアポトーシスの促進によって、胃癌抑制因子として働く。Runx3 は、さらに大腸がんや肺がんなど種々のがんにおいてもがん抑制因子として作用

することが明らかになった。このように、Runxは様々な細胞の発生を制御し、その異常がヒトの疾患の原因となることが示されたが、神経系での機能解析は遅れていた(総説として、Inoue, Shiga, Ito, 2008)。2001年にRunx1とRunx3がそれぞれ脊髄神経節(DRG)の皮膚感覚性ニューロンと固有感覚性ニューロンに選択的に発現するという興味深い発現パターンが報告され、神経発生における役割が注目されるようになった。そして、申請者を含めて2つのグループが遺伝子欠損マウスを用いた解析によってRunx3が固有感覚性DRGニューロンの発生に重要な役割をはたすことを報告した。その後、申請者らはRunx3/Bax double knockoutマウスなどを用いた解析から、Runx3が固有感覚性ニューロンの生存ではなく、ニューロンの発生運命を機械受容ニューロンに変換させると同時に、軸索投射を制御することを明らかにした(Nakamura et al., 2008)。この間、申請者らを含めて複数のグループによって、Runx1が皮膚感覚性DRGニューロンの細胞分化や軸索投射を制御することが報告された(Chen et al., Neuron 49(2006)365-377; Kramer et al., Neuron 49(2006)379-393); Yoshikawa et al., (2007))。これらの研究から、Runx1とRunx3がDRGニューロンの細胞分化と軸索投射を制御することが徐々に明らかになってきたが、Runxの神経発生における機能解析は未だ不十分であった。特にRunx1とRunx3はDRG以外のニューロンにも発現するがそれらのニューロンの発生における機能は不明であった。

## 2. 研究の目的

Runx1とRunx3がDRGニューロンの細胞分化と投射路形成に重要な役割を果たすことが明らかになったが、DRG以外の部位の神経発生における役割は不明である。またRunxによる投射路形成の制御機構は明らかにされていない。本研究では、DRGに加えてRunx1やRunx3が発現する三叉神経節と舌下神経核に注目し、Runx1とRunx3が制御する投射路形成を含めて、神経発生における役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

中枢神経系(脳神経核)と末梢神経系(DRGと三叉神経節)のニューロンの多様性形成と軸索ガイダンスにおけるRunx1とRunx3の機能について遺伝子欠損マウスを用いて解析する。

### (1) アポトーシスと細胞分裂

Runx1またはRunx3遺伝子欠損マウスを用い、アポトーシスと細胞分裂について、それぞれcaspase 3抗体と、BrdUやKi67抗体を用いて形態学的に解析する。

### (2) ニューロンの多様性形成

①野生型マウス胎仔の脳神経核や三叉神経節におけるRunx1やRunx3と各種ニューロンサブタイプに特異的なマーカー分子(神経ペプチド、神経栄養因子受容体、カルシウム結合蛋白など)との共発現を免疫多重染色によって解析する。

②Runx1遺伝子欠損マウスまたはRunx3遺伝子欠損マウスを用い、脳神経核(特に舌下神経核)と三叉神経節でのニューロンサブタイプマーカー分子の発現変化を免疫組織化学法によって解析する。さらに、gain-of-function解析を行なう。胎生9.5日(E9.5)の野生型マウス胎児に子宮内electroporation法によってRunx1遺伝子導入を行なう。E13.5-E17.5で灌流固定し、各種マーカー分子の発現について、mockベクター導入コントロール群と比較する。

### (3) 軸索投射の制御

①Runx1またはRunx3ニューロンの軸索の可視化

Runx1またはRunx3を発現するニューロンの軸索を可視化するために、Runx1またはRunx3遺伝子のプロモーター制御下で、膜移行型Venusを発現するトランスジェニックマウスを作成する。

②軸索投射の分子機構: DNAマイクロアレイ解析

Runx1遺伝子欠損マウスまたはRunx3遺伝子欠損マウスDRGのDNAマイクロアレイ解析によって、軸索投射に関連すると思われる候補標的遺伝子を探索する。次いでRunx1またはRunx3が発現調節する候補標

的遺伝子について、リアルタイムPCR法と *in situ* hybridization法を用いて発現解析を行なう。

#### 4. 研究成果

転写因子 Runx1 と Runx3 の中枢神経系(特に舌下神経核)と末梢神経系(DRG と三叉神経核)の神経発生における細胞増殖、ニューロンへの分化、ニューロンのサブタイプ形成、および軸索投射路の形成における機能解析を行ない、以下のことを明らかにした。

##### (1) 細胞増殖と細胞分化

Runx1 遺伝子欠損マウスの DRG では胎生 12.5 日 (E12.5) でニューロンのマーカー (NeuN、Islet-1、Hu) を発現する DRG ニューロン数が野生型マウスと比べて減少していた。しかし、caspase 3 陽性細胞数に変化が見られなかったため、これらニューロン数の減少はアポトーシスによるものではないことが示唆された。それに対し、BrdU の取り込みが Runx1 遺伝子欠損マウスでは増加し、細胞分裂の増加が示された。従って、Runx1 は細胞分裂を抑制し、ニューロンへの分化を促進する機能を持つことが示された。さらに、Runx1 遺伝子欠損マウスの DRG ではニューロンへの分化を抑制する Hes-1 陽性細胞数が野生型マウスと比べ増加していた。また、Runx1 と Hes-1 の共陽性細胞が認められ、Hes-1 の発現を制御することが知られる Notch1 細胞内領域(NICD)発現細胞において Runx1 が発現していた。したがって、Runx1 がニューロンへの分化を促進する機構の1つとして、Notch1 を介して Hes-1 を抑制することによって、DRG ニューロンへの分化を促進する可能性が示された(発表論文①、学会発表④)。

##### (2) ニューロンの多様性形成と軸索投射

###### ①三叉神経節

胎生早期の三叉神経節では Runx3 は TrkB と TrkC を共発現するニューロンで発現が見られた。次いで、Runx3 の機能について胎仔期の Runx3 遺伝子欠損マウスを用いて解析したところ、E17.5 の Runx3 遺伝子欠損マウスでは TrkB 陽性ニューロンが増加し、TrkC 陽性ニューロンが減少していた。一方、軸索投射を調べたところ、末梢では鼻部洞毛外根鞘のメルケル細胞へ、中枢では三叉神経脊髄路核中間亜核へ投射する TrkC 陽性線維が消失していた。従って、Runx3 は DRG では TrkC 陽性の固有感覚性ニ

ューロンの分化と軸索投射を制御するが、三叉神経節では TrkB 陽性の機械受容性ニューロンの分化と軸索投射に必須であることが示され、(発表論文②、学会発表⑤、⑥)。

###### ②舌下神経核

Runx1 の中枢神経系における発現部位について発生段階を追って解析した。その結果、E10.5 の脳幹の外套層で Runx1 陽性細胞が帯状に分布していた。その後、三叉神経運動核や舌下神経核などの脳幹の限られた神経核に発現が認められるようになった(学会発表⑥、⑧)。

舌下神経核では Runx1 とカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が相補的に発現するため、Runx1 が CGRP の発現を抑制する可能性が示唆された。しかし、Runx1 遺伝子欠損マウスで CGRP 陽性細胞数に変化が認められなかったため、Runx1 が単独で CGRP の発現を抑制する可能性はないと考えられる(学会発表③)。

Runx1 は舌下神経核では神経核の腹尾側部に局限して発現する。一方、腹尾側部の運動ニューロンは舌前部の舌筋に投射することが示されている。そこで neurofilament M、CGRP と小胞アセチルコリン輸送体(VAChT)を用い、舌体前部、舌体後部、舌根部への軸索投射と終末(シナプス)形成を調べた。その結果、Runx1 を発現するニューロンの軸索は舌体前部に多く投射し、Runx1 遺伝子欠損マウスでは軸索と終末が有意に減少していた。一方、Runx1 遺伝子欠損マウスの舌下神経核でニューロン数に顕著な減少が見られなかったことから、軸索と終末の減少は細胞死によるものではなく、Runx1 が舌筋への軸索投射や終末形成に関与する可能性が示唆された。現在、子宮内 electroporation 法によって、Runx1 遺伝子の過剰発現による軸索投射の影響を解析中である(学会発表①、②)。

###### ③Runx1 と Runx3 を共発現する DRG ニューロン

胎生早期の DRG では Runx1 は TrkA 陽性のニューロンに発現し、その後の皮膚感覚性ニューロンの分化を調節するのに対し、Runx3 は TrkB/TrkC 共陽性のニューロンに発現し、固有感覚性ニューロンの分化を調節する。しかしながら、少数ではあるが Runx1 と Runx3 を共発現するニューロンが存在する。それらのニューロンの性質を検討するために、種々の

マーカー分子を用いて多重免疫染色を行ったところ、Runx1 と Runx3 を共発現するニューロンは成体では機械受容性ニューロンに発現することが明らかになり、Runx1 と Runx3 がこのニューロンの成熟や生存維持に関与することが示唆された。

### (3) マイクロアレイ解析

E12.5 の Runx1 遺伝子欠損マウスと野生型、および E12.5 と E13.5 の Runx3 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの DRG から抽出した mRNA を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果、Runx1 遺伝子欠損マウスや Runx3 遺伝子欠損マウスの DRG において発現量が増加または減少する遺伝子が多数認められた。例えば、E12.5 の Runx3 遺伝子欠損 DRG において TrkC などの減少や、cadherin 1 や annexin A8 などの増加、また Runx1 遺伝子欠損マウスで synaptotagmin X などの増加や mu 1 opioid receptor などの減少などの軸索ガイダンスに関与すると考えられる遺伝子の発現量変化が明らかになった。これらの発現量の変化が示された遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーション法と定量 PCR 法によって解析中である。

### (4) Runx1ニューロンとRunx3ニューロンの軸索の可視化

Runx1 または Runx3 を発現するニューロンの軸索を可視化するために、*Runx 1* 遺伝子または *Runx3* 遺伝子のプロモーター制御下で、膜移行型 Venus を発現するトランスジェニックマウスを作成中である。

### まとめ

Runx ファミリー転写因子の機能解析はこれまで脊髄神経節のサブタイプニューロン形成と軸索投射が中心であった。本研究によって Runx1 による脊髄神経節の細胞分裂の抑制とニューロン分化の促進作用に Notch1 を介する Hes-1 の抑制が関与する可能性が示され、さらに三叉神経節では Runx3 が機械受容性ニューロンの分化と軸索投射の制御に関与し、さらに Runx1 が舌下神経核の運動ニューロンの軸索投射の制御に関与することを示し、Runx ファミリー転写因子の新規の機能を明らかにすることができた。今後は、軸索投射

における分子機構、特に Runx1 や Runx3 によって転写調節を受ける軸索ガイダンス関連因子の解明が重要な課題と考えられる。

### 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 2 件)

① Kobayashi A, Senzaki K, Ozaki S, Yoshikawa M, Shiga T. Runx1 promotes neuronal differentiation in dorsal root ganglion. *Molecular and Cellular Neuroscience*.

査読有, 49, 2012, 23-31.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2011.08.009>.

<http://hdl.handle.net/2241/115480> (つくばリポルトジ)

② Senzaki K, Ozaki S, Yoshikawa M, Ito Y, Shiga T. Runx3 is required for the specification of TrkC-expressing mechanoreceptive trigeminal ganglion neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*.

査読有, 43, 2010, 296-307.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2009.12.003>.

<http://hdl.handle.net/2241/104892> (つくばリポルトジ)

[学会発表] (計 8 件)

① 吉川雅朗、平林瑞紀、伊藤遼多、尾崎繁、先崎浩次、志賀隆. マウス胎仔舌下神経核ニューロンの軸索投射における Runx1 の役割. 第 117 回日本解剖学会全国学術集会. 2012. 3. 27. 山梨大学 (甲府市)

② 吉川雅朗、平林瑞紀、伊藤遼多、尾崎繁、先崎浩次、志賀隆. マウス胎仔の舌下神経核における Runx1 の発現と機能の解析. 第 99 回日本解剖学会関東支部学術集会. 2011. 10. 15. 日本大学松戸歯学部 (松戸市)

③ 志賀隆、伊藤遼多、平林瑞希、吉川雅朗、高橋智、尾崎繁、先崎浩次. 転写因子 Runx1 のマウス胎仔の脳幹における発現と機能解析. 第 116 回日本解剖学会全国学術集会. 2011. 3. 30. パシフィコ横浜 (横浜市)

- ④ 先崎浩次、小林梓、吉川雅朗、尾崎繁、高橋智、志賀隆。マウス脊髄神経節での神経細胞分化における Runx1 の役割。第 33 回日本神経科学大会。2010.9.4. 神戸コンベンションセンター(神戸市)
- ⑤ 先崎浩次。感覚神経発生における Runx 転写因子の機能解析。第 115 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム。2010.3.29. 岩手県民会館(盛岡市)
- ⑥ 平林瑞紀、伊藤遼多、尾崎繁、高橋智、先崎浩次、志賀隆。マウス胎仔脳神経核における転写因子 Runx1 の発現解析。日本解剖学会関東支部第 97 回学術集会。2009.9.16. 防衛医科大学(所沢市)
- ⑦ 先崎浩次、尾崎繁、吉川雅朗、伊藤嘉明、志賀隆。Runx3 is required for the specification of TrkC-positive mechanoreceptive neurons in the trigeminal ganglion。第 32 回日本神経科学大会。2009.9.17. 名古屋国際会議場(名古屋市)
- ⑧伊藤遼多、平林瑞紀、吉川雅朗、高橋智、先崎浩次、志賀隆。The expression and roles of Runx1 in the development of mouse embryo brainstem。第 32 回日本神経科学大会。2009.9.16. 名古屋国際会議場(名古屋市)。

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/shiga-group/anatmy3rd.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志賀 隆 (SHIGA TAKASHI)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：50178860

### (2) 研究分担者

先崎 浩次 (SENZAKI KOUJI)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：30333280