

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590256

研究課題名(和文) 網羅的スクリーニングから得られた新規軸索誘導候補分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses of novel candidate genes involved in axonal guidance obtained by comprehensive genetic screening

研究代表者

増田 知之(MASUDA, TOMOYUKI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70372828

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)：発生期の脊髄神経節細胞(DRG)から伸び出す神経軸索のうち、中枢枝は脊髄背側からの軸索誘引作用によって脊髄に侵入することが知られているが、その分子実体はわかっていない。また、運動神経軸索と合流し、背筋・真皮に伸長する末梢枝(脊髄神経後枝)の投射路形成メカニズムも、依然としてその詳細は不明である。私たちは、電気穿孔法による生体内への遺伝子導入システムおよびアデノ随伴ウイルスベクターを用いた解析を通じて、5つの軸索誘導候補分子の生体内での機能を解析・評価した。その結果、中枢枝および末梢枝は別々の軸索誘導因子によってガイドされる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：During development, dorsal root ganglion (DRG) neurons extend their axons both centrally and peripherally. However, the molecular mechanism underlying this phenomenon is less clear. By using in-vivo electroporation and adeno-associated virus vectors, we examined the in-vivo functions of 5 candidate molecules in DRG axonal guidance. Our study revealed the fact that one of the candidate molecules may attract centrally projecting DRG fibers and that the other molecule may attract peripherally projecting DRG ones.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞・組織 発生・分化 神経科学 脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

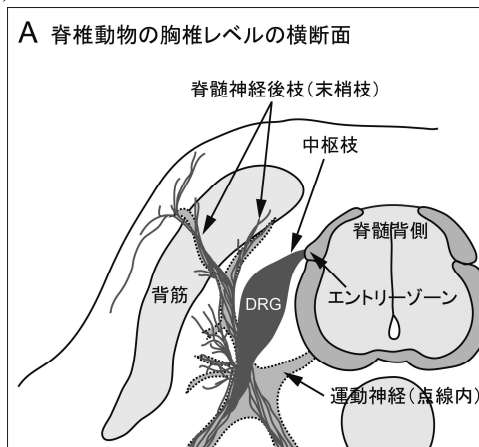
発生初期、脊髄神経節細胞 (DRG) は中枢と末梢に向けて中枢枝と末梢枝を伸ばすが、その制御メカニズムはよくわかっていなかった。私たちは、脊索等の非標的組織が出す軸索反発因子が軸索を「通せんぼ」することで、このガイダンスに重要な役割を果たすこと、およびその分子メカニズムを明らかにしてきた。さらに私たちは、DRG の中枢枝が脊髄背側のエントリーゾーンに向かう現象に軸索誘引因子が関与することも明らかにしたが、その分子実体は未だ不明である。

そこで私たちは、脊髄背側からの軸索誘引作用の実体解明を目指し、レーザーマイクロダイセクション法によって脊髄背側片を切り出し、その cDNA を用いたマイクロアレイで候補遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、脊髄背側に発現を有する 25 個の新規遺伝子を得た。さらに、脊髄神経後枝 (末梢枝) のガイダンス機構の解明を目指して、DNA データベースに基づいたスクリーニングを行った結果、軸索誘導に関連するモチーフを有する遺伝子を 20 個同定した。

これら 45 個の遺伝子産物について培養法による予備実験を進めた結果、DRG 軸索を誘引・反発する可能性を有する分子が 5 個見付き、現在これら 5 個の分子のさらなる解析に向けて準備を整えている。

## 2. 研究の目的

発生期の DRG の中枢枝は脊髄背側からの軸索誘引作用によって脊髄に侵入するが、その分子実体はわかっていない。また、運動神経軸索と合流し、背筋・真皮に伸長する末梢枝 (脊髄神経後枝) の投射路形成メカニズムも、依然としてその詳細は不明である (図 A 参照)。



私たちは、マイクロアレイとデータベースを用いたスクリーニングによって、軸索誘導

に関与する可能性のある新規・既知遺伝子を多数同定した。その後の解析を通じて、対象を 5 つの分子に絞り込みつつある。本研究では生体内での解析を軸とした機能解析を進め、これらの分子の作用機序を詳細に検討する。本研究を推し進めることで、DRG 軸索を含む脊髄神経の投射路を形成する分子メカニズムの全容解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気穿孔法による mF1 と mF2 の *in vivo* における機能の解明

新規分子 mF1 は発生初期マウス・ニワトリ胚の脊髄背側に発現する分泌型の分子である。一方で、新規分子 mF2 は脊髄底板に局限して発現する分泌型の分子であり、DRG 軸索の反発因子ネトリン-1 とよく似た発現様式を有している。

これら 2 つの分子の生体内における機能を明らかにするため、電気穿孔法によるニワトリ胚への遺伝子導入および遺伝子抑制を行う。具体的には、ニワトリ胚脊髄片側に異所性に各遺伝子を発現させる。または RNA 干渉によってその発現を抑制する。遺伝子導入・抑制後、一定期間ののちに胚を固定し、導入側の DRG 軸索の走行を解析し、操作した遺伝子の軸索ガイダンスにおける機能を評価する。発現実験には各遺伝子の発現ベクターを使用し、RNA 干渉実験には業者の作製した siRNA を使用する。

### (2) 3 つの軸索ガイダンス候補分子の *in vitro* における機能の解明

脊髄神経後枝のガイダンスには、皮筋節 (将来の真皮・背筋) の分泌する軸索反発因子セマフォリン 3A と誘引因子 Fibroblast growth factor 8 (FGF8) が働くことが、私たちの研究から明らかとなっている。しかしながら、両分子の存在のみで複雑な現象を十分に説明することはできない。そこで私たちは、公開されているデータベースを基にして、軸索誘導に関連したモチーフを有し、脊髄周辺に発現する遺伝子を 20 個選び出した。次に、培養法によって各遺伝子産物の DRG 軸索への作用を調べ、DRG 軸索に対して誘導活性を有する可能性のある 3 つの分子を対象を絞り込んだ。これらの分子はいずれもセマフォリンファミリーに属し、脊髄神経後枝の投射経路または投射部位に発現しており、脊髄神経後枝のガイダンスに何らかの重要な機能を持つことが予想される。

これらの分子のさらなる機能を明らかにするため、脊髄運動神経の組織片と各分子を分泌する HEK293 細胞塊を共培養し、運動神経軸索への各分子の作用を調べる。

### (3) ウイルスベクターによる 3 つの候補分子の *in vivo* における機能の解明

脊髄神経後枝のガイダンスにおける上記 3 つの分子の役割を *in vivo* で検討するため、脊髄周辺の組織に効率よく遺伝子を導入できるアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた遺伝子導入を行う。まず、各遺伝子の全長配列を AAV ベクターに挿入した発現ベクターを作製し、増殖・精製を行う。その後、精製した AAV ベクターを用いて、ニワトリ胚脊髄周辺の組織へのウイルス感染実験を行う。解析方法は電気穿孔法による遺伝子導入実験に準ずる。具体的には、ウイルスを感染させたのち、一定期間後に胚を固定する。免疫染色法で脊髄神経後枝の走行を解析し、各遺伝子の軸索ガイダンスにおける機能を評価する。

## 4. 研究成果

後日公表可能となった際に再提出し、公表する。

## 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 6 件)

Tomoyuki Masuda, Masahiko Taniguchi. Congenital diseases and semaphorin signaling: Overview to date of the evidence linking them. *Congenital Anomalies* 55, 2015, 26-30, 査読有  
DOI: 10.1111/cga.12095.

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Hiroyuki Yaginuma, Masahiko Taniguchi. Attractive and permissive activities of semaphorin 5A toward dorsal root ganglion axons in higher vertebrate embryos. *Cell Adhesion and Migration* 8, 2014, 603-606, 査読有  
DOI:10.4161/19336918.2014.972770.

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Atsuko Nagaoka, Toshiyuki Yamagishi, Shuichi Ueda, Takahiro Nagase, Hiroyuki Yaginuma. *Follistatin-like 5 (Fstl5)* is expressed in restricted areas of the adult mouse brain: Implications for its function in the olfactory system. *Congenital Anomalies* 54, 2014, 63-66, 査読有  
DOI: 10.1111/cga.12022.

Takashi Namba, Yuji Kibe, Yasuhiro Funahashi, Shinichi Nakamuta, Tetsuya

Takano, Takuji Ueno, Akiko Shimada, Sachi Kozawa, Mayumi Okamoto, Yasushi Shimoda, Kanako Oda, Yoshino Wada, Tomoyuki Masuda, Akira Sakakibara, Michihiro Igarashi, Takaki Miyata, Catherine Faivre-Sarrailh, Kosei Takeuchi, Koza Kaibuchi. Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81, 2014, 814-829, 査読有  
DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.015.

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Takayuki Ueno, Yuriko Yamada, Hideki Ohmomo, Shuichi Ueda, Toshiyuki Yamagishi, Hiroyuki Yaginuma. Spatiotemporal patterns of the *Huntingtin-interacting protein 1-related (Hip1r)* gene in the mouse head. *Congenital Anomalies* 53, 2013, 141-148, 査読有  
DOI: 10.1111/cga.12023.

Tomoyuki Masuda, Masahiko Taniguchi, Chie Sakuma, Toshiyuki Yamagishi, Shuichi Ueda, Masahumi Kawaguchi, Hiroyuki Yaginuma. Development of the dorsal ramus of the spinal nerve in the mouse embryo: Involvement of semaphorin 3A in dorsal muscle innervation. *Congenital Anomalies* 53, 2013, 122-126, 査読有  
DOI: 10.1111/cga.12019.

### [学会発表](計 6 件)

増田知之, 志賀隆, 八木沼洋行. 分子生物学的観点からみた脊髄神経後枝の発生: 動物実験データからのヒント. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会・第 35 回肉眼解剖学懇話会, 2015 年 3 月 20 日, 神戸大学, 神戸市(兵庫県).

増田知之, 上田秀一, 八木沼洋行, 谷口雅彦. マウス長鎖遺伝子群の神経系における発現様式とその機能の解析: 方法論のパラダイムシフトの現場から. 日本解剖学会関東支部第 102 回学術集会シンポジウム, 2014 年 11 月 22 日, 東京医科大学, 新宿区(東京都).

増田知之, 山岸敏之, 佐久間千恵, 小林憲太, 大桃秀樹, 小林和人, 八木沼洋行. ハンチントン病関連遺伝子 *Hip1r* のマウス頭部における発現様式. 第 119 回日本解剖学会全国学術集会, 2014 年 3 月 27 日, 自治医科大学, 下野市(栃木県).

増田知之, 佐久間千恵, 上野孝之, 山岸敏之, 大桃秀樹, 八木沼洋行, 上田秀一. ハンチントン病モデルマウスにおける CAG リピートの不安定性と *hip1r* 遺伝子の発現様式の関連性について. 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日, 国立京都国際会館, 京都市(京都府).

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Hiroyuki Yaginuma, Shuichi Ueda. Molecular mechanisms of nerve wiring of the peripheral

nervous system. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム, 2013 年 3 月 30 日, サポートホール高松, 高松市(香川県).

Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Hiroyuki Yaginuma, Shuichi Ueda. Molecular analyses of the development of the spinal nerve in the higher vertebrate embryo. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012 年 8 月 29 日, 京都国際会館, 京都市(京都府).

[その他]

<http://www.masudatomoyuki.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 知之 (MASUDA, TOMOYUKI)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 70372828

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

加藤 成樹 (KATO, SHIGEKI)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90443879