

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659080

研究課題名(和文) 内臓感覚性ニューロンの発生制御機構の解明

研究課題名(英文) Developmental mechanisms of viscerosensory neurons

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：Runxファミリー転写因子の内臓感覚性ニューロンの発生における役割を明らかにするために、遺伝子欠損マウスを用い、迷走神経の節神経節(NG)と食道に注目して解析した。マウスではNGは迷走神経と舌咽神経の上神経節(JG)と癒合している(NG-JG)場合が多く、Runx1はNG-JGに発現していた。Runx1は末梢組織では食道の筋層と筋層間神経叢の神経繊維におけるCGRPの発現の抑制性制御に関与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The roles of Runx transcription factor in the development of viscerosensory neurons were examined with special reference to nodose-jugular ganglia complex (NG-JG) and esophagus. Runx1 was expressed in medium- to large-sized neurons in NG-JG. Analysis using Runx1-deficient mice showed that runx1 inhibits the expression of CGRP in nerve fibers in the esophagus.

研究分野：発生神経生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：Runx転写因子 内臓感覚 迷走神経 細胞分化 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

Runtドメインを持つRunxファミリー転写因子は哺乳類ではRunx1~3の3種類が存在する。Runx1は造血細胞の分化、Runx2は骨細胞の分化、Runx3は胃粘膜上皮細胞の増殖と生存など、細胞の増殖・分化・生存を制御する転写因子であり、その異常によりそれぞれ急性骨髄性白血病、鎖骨頭蓋異形成症、胃癌といった疾患を引き起こすことが知られている。また、これらのうちRunx1とRunx3は神経系においても発生早期から発現が見られ、感覚性ニューロンの細胞分化と軸索投射を制御することが知られている。申請者も、Runxファミリー転写因子が脊髄神経節(DRG)の細胞分化と軸索投射に重要な役割を果たすことを明らかにしている。すなわち、Runx1はまずTrkA陽性DRGニューロンに発現し、その後ペプチド性侵害受容ニューロンと非ペプチド性侵害受容ニューロンの分化を制御する。一方、Runx3はまずTrkB/TrkC共陽性ニューロンに発現し、その後、機械受容性ニューロン(TrkB陽性/Runx3陰性)と固有感覚性ニューロン(TrkC/Runx3共陽性)への分化を制御する。ところで、感覚ニューロンは、機能的には侵害受容性、機械受容性、固有感覚性ニューロンの3つに分類される。DRGにはこれらすべてのニューロンが存在しており、侵害受容性ニューロンと機械受容性ニューロンは皮膚と内臓に投射しており、それぞれ皮膚感覚性ニューロンと内臓感覚性ニューロンを構成している。ところがこれまでの研究では、皮膚感覚性ニューロンと内臓感覚性ニューロンを区別せずに、あたかも全てが皮膚感覚性ニューロンであるかのように報告しており、内臓感覚性ニューロン発生におけるRunx転写因子の機能解析は行われていない。内臓感覚はDRGと迷走神経の節神経節(NG)によって脊髄と脳に伝達される。DRGは神経堤由来であるが、NGは上鰓プラコードに由来する。さらに、遺伝子欠損マウス等の解析からNGニューロンの大部分はTrkBを発現し、BDNFとNT4/5依存性であり、TrkA陽性ニューロンは極めて少ない。一方、DRGにはTrkA、TrkB、TrkCニューロンが存在することから、DRGと

NGではTrkA、TrkB、TrkCとRunx1、Runx3の発現が異なっている。NGニューロンの発生におけるRunx転写因子の役割は不明であり、さらにDRGとNGニューロンについて内臓感覚性と皮膚感覚性を区別して解析した研究は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、内臓感覚性ニューロン発生におけるRunx転写因子の機能解析の第一歩として、NGと食道に着目し、*Runx1*遺伝子欠損マウスを用いて内臓感覚性ニューロン発生におけるRunx1の役割を明らかにすることである。

本研究で内臓感覚性ニューロンの発生におけるRunx転写因子の役割を調べるにあたり、侵害受容性ニューロンの発生への関与が知られているRunx1に注目した。ところで、*Runx1*遺伝子欠損マウスは二次造血不全により、胎生12.5日(E12.5)までに死亡する。そこで、本研究ではGATA-1プロモーター制御下で血球細胞に*Runx1*を発現させ、造血細胞の*Runx1*のみをレスキューすることで、出生前後まで生存可能となった遺伝子組み換え*Runx1*欠損マウス(*Runx1*^{-/-}::*Tg*)を用いた。

内臓感覚はDRGと迷走神経の節神経節(nodose ganglion, NG)によって内臓から中枢神経系に伝えられるが、迷走神経は、E12.5で食道、E16で小腸まで到達する一方で、大腸には到達していないとの報告があり、発達段階の早い時期の大腸では十分な解析が行えないことが予想される。そこで本研究では主に食道に着目して解析を行った。また、上述したように内臓感覚はDRGとNGによって内臓から中枢神経系に伝えられるが、DRGには内臓感覚性ニューロン以外にも皮膚感覚性ニューロンが存在している。それに対し、NGのニューロンには皮膚感覚性ニューロンが含まれないため、本研究ではNGに着目した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

Runx1^{+/-}::*Tg*を掛け合わせて*Runx1*^{+/+}::*Tg*と*Runx1*^{-/-}::*Tg*を得た。*Runx1*^{-/-}::*Tg*は出生前後

に死亡するため、解析にはE17.5を用いた。さらに、正常発生過程を解析するために、成体および生後1日目(P1)の*Runx1^{+/+}::Tg*も使用した。なお、本実験は筑波大学動物実験委員会の承認を得て行った。

(2) 凍結切片の作成

E17.5とP1のマウスを氷冷麻酔した後に、4%パラフォルムアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液で灌流固定を行い、その後4℃で1晩浸漬固定した。成体マウスは、頸椎脱臼後、食道および十二指腸を取り出し、同様に上述した固定液で浸漬固定を行った。E17.5とP1についてはNGを含む頭頸部と食道を含む胸部体幹を切り出し、成体の食道や十二指腸も同様にスクロース置換(10%、20%、30%各1晩・4℃)をした後、O.C.Tコンパウンドに凍結包埋した。その後クリオスタットを用いて12 μm厚の連続凍結切片を作成した。スライドガラス5枚で1シリーズとし、切片を1枚ずつ5枚のスライドガラスに順番に貼り付け、1個体につき約6シリーズ作成した。その後、各シリーズの1枚目のみにHE染色を行い、光学顕微鏡にてNGの有無を確認し、NGを含むシリーズのみ解析した。なお、NGの同定は、迷走神経が内頸静脈、総頸動脈とともに頸動脈鞘に包まれており、NGが頸静脈孔に存在しているという二つの基準をもとに行なった。

(3) 免疫組織化学染色

Dako REAL™ Target Retrieval Solutionで抗原の賦活化(オートクレーブ105℃、5分間)を行った。その後0.3% H_2O_2 /100%MeOHで室温30分間処理して内因性ペルオキシダーゼを失活させ、1%BSA/0.3%Triton X-100/リン酸緩衝生理食塩水で室温にて1時間ブロッキングを行い、一次抗体(表1)を4℃で一晩反応させた。ビオチン化抗ウサギIgG抗体(1:500希釈)、ビオチン化抗ヤギIgG抗体(1:500希釈)を二次抗体として室温1時間反応させた後Elite ABCを室温30分反応させ、ImmunoPure metal enhanced DAB substrate kit (Pierce)を用いてDAB (3,3'-Diaminobenzidin)の発色反応を行った。蛍光免疫二重染色は、同様に抗原賦活化を行った後、1%BSA/0.3%Triton X-100/リン酸緩衝生理食塩水で室温にて1時

間ブロッキングを行った。一次抗体は表1の4~13の抗体と表1の2の抗体を組み合わせる用い、Alexa Fluor 488標識ヤギ抗マウスIgG抗体(1:1000希釈/Invitrogen)とAlexa Fluor 594標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(1:1000希釈/Invitrogen)を二次抗体として室温90分反応させ、共焦点レーザー顕微鏡LSM 510 META (Carl Zeiss)にて画像を取得した。

(4) 食道におけるCGRP陽性線維率の解析

E17.5の*Runx1^{+/+}::Tg*と*Runx1^{-/-}::Tg*の食道の連続する2枚の切片に対して抗CGRP抗体と抗PGP9.5抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。それぞれ同じ条件で画像を取得し、ImageJを用いて陽性反応を自動2値化(Maxentropy)した。その後、Photoshopを用いて元画像と重ねて食道の部分の面積を求めた。また、CGRP陽性線維面積の、隣接切片におけるPGP9.5陽性線維面積に対する比率を計算して末梢神経線維のうちのCGRP陽性線維率を求めた。測定は1個体につき3~5枚の切片を用いて行い、その平均値を*Runx1^{+/+}::Tg*と*Runx1^{-/-}::Tg*の間で比較した(n=5)。統計解析にはMann-WhitneyのU検定を用い、 $p<0.05$ を有意差ありと判定した。

(5) 陽性ニューロン率の解析

NGに発現が見られたマーカー分子については、*Runx1^{+/+}::Tg*と*Runx1^{-/-}::Tg*で発現率の比較をした。NGのうちの陽性ニューロン数/NGの全ニューロン数×100により陽性ニューロン率を算出した。NGの全ニューロン数は、全ニューロンを染めるマーカーであるマウス抗Islet1抗体を用いた蛍光二重染色、またはヘマトキシリンを用いた核染色により求めた。また、食道に線維を伸ばす内臓感覚性ニューロンにNGにおける左右差が認められないことから⁽³⁾、解析には左右のNGそれぞれを1個体として用いた。統計解析にはWelchのt検定を用い、 $p<0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 成体の食道と十二指腸におけるマーカー分子の発現

免疫染色によって、成体の食道と十二指腸におけるPGP9.5、TRPファミリー(V1、V2、V4、

A1、M8)、CGRP、TrkA、TrkB、TrkCの発現を調べた。その結果、PGP9.5とCGRPは粘膜固有層・粘膜下組織、筋層及び筋層間神経叢に陽性線維が、TRPV2は筋層間神経叢に陽性細胞が存在していたが、それ以外の分子の発現は見られなかった。

(2) 発達期の食道におけるマーカー分子の発現

E17.5のRunx1^{+/+}::TgとRunx1^{-/-}::Tg、P1のRunx1^{+/+}::Tgの食道で免疫染色を行ったところ、PGP9.5は粘膜固有層・粘膜下組織、筋層及び筋層間神経叢に陽性線維が、CGRPは筋層及び筋層間に陽性線維が、TRPV2は筋層間神経叢に陽性細胞が見られた。その他の抗体を用いた染色では免疫陽性反応は認められなかった。なお、E17.5とP1での染色結果に大きな差は認められなかった。次に、食道の面積に対するPGP9.5陽性線維(全神経線維)の面積比率を求めたところ、Runx1^{+/+}::Tg (3.35 ± 0.66%)、Runx1^{-/-}::Tg (2.93 ± 0.53%)となり、有意な差は認められなかった(p=0.46)。さらに、CGRPの発現についてE17.5のRunx1^{+/+}::TgとRunx1^{-/-}::Tgで比較したところ、CGRP陽性線維率がRunx1^{+/+}::Tg (0.61 ± 0.07%)に比べRunx1^{-/-}::Tg (3.4 ± 0.81%)で有意に増加していた(p<0.05)。

(3) NGにおけるRunx1の発現

E17.5およびP1でのRunx1^{+/+}::TgのNGにおけるRunx1の発現を調べたところ、どちらもRunx1の発現が見られた。

(4) NGにおけるマーカー分子の発現

E17.5のNGにおいてTRPファミリー、CGRP、Calbindin D-28K、TrkA、TrkB、TrkCに対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、以下に述べるようにCGRP、Calbindin D-28KそしてTrkCを発現するニューロンが認められた。

CGRPはNGの上方(頭側)で強い発現が見られたのに対し、下方(尾側)での発現は弱かった。一方、Calbindin D-28KはNGの下方で発現が見られた。

TrkC陽性ニューロンはNG全体に均一に分布していた。また、TrkCは蛍光免疫染色より

もDABを用いた発色において、より強い陽性反応が認められた。そこでTrkC陽性ニューロン率の解析は蛍光免疫二重染色ではなく、TrkCの発現をDABで発色した後にヘマトキシリンを用いた核染色により行った。Runx1^{+/+}::TgとRunx1^{-/-}::Tgについて、それぞれ6個体(1個体につき3~6切片)ずつ解析したところ、Runx1^{+/+}::Tg(7.66 ± 0.40%)、Runx1^{-/-}::Tg(12.43 ± 0.27%)となり、TrkC陽性ニューロン率がRunx1^{-/-}::Tgで有意に増加していた(p<0.001)。次に、TrkCとRunx1の同一ニューロンにおける共存を調べるために、E17.5 Runx1^{+/+}::TgのNGにおいて蛍光免疫二重染色を行った。ところが、Runx1もTrkC同様、DAB発色では発現が確認できるのに対し、蛍光免疫染色では発現が極めて弱かった。TrkCは蛍光免疫染色でも弱い発現が見られたため、まずRunx1をDABにより発色させ、その後Alexa Fluor 594標識ロバ抗ヤギIgG抗体を用いてTrkCを蛍光標識した。その後、明視野と暗視野の画像を重ね合わせて解析したところ、Runx1陽性ニューロンの中にTrkCを発現するものが見られ、一方TrkCを発現するニューロンは全てRunx1を発現していた。

TRPファミリー(V1、V2、V4、A1、M8)

TRPファミリーは迷走神経で発現することが報告されているが、E17.5のNGにおいてTRPファミリー(V1、V2、V4、A1、M8)の発現は見られなかった。そこで、同様にTRPファミリーの発現が報告されているE17.5のDRGでも同じ条件で染色を行ったところ、TRPV1とTRPM8の弱い発現が見られた。このことから、DRGに比べてNGではこれらの発現量が少ないために、今回の染色条件では陽性反応が検出できないという可能性が考えられた。一次抗体の濃度や反応時間などの染色条件について様々な検討を試みたが、改善されなかったため、次に増感操作を行った。抗原の賦活化は既に行っているため、TSA増感キットの使用を試みたが、切片全体が非特異的に染まり、特異的な染色結果が得られなかった。そこで、感度が良いとされるElite ABC法を用いたDAB発色で発現を調べたところ、E17.5のNGでTRPM8のみ発現が見られた。次に、TRPM8陽性ニューロン率算出のために、TrkCと同様にDAB発色後のヘマトキシリンによる

核染色を行ったが、TrkC とは異なり、TRPM8の発現がそれほど強くないため、核染色との二重染色ではTRPM8発現ニューロン数の計測は困難であった。

(5) 考察

Runx1はDRGや三叉神経節などの感覚神経節に発現することが報告されていたが、本研究によってRunx1がNG・JGにも発現することが明らかになり、Runx1が内臓感覚性ニューロンの発生に關与する可能性が示された。

迷走神経の神経節の同定

迷走神経には上神経節(jugular ganglion、JG)と下神経節(NG)が存在する。発生過程ではJGは舌咽神経の上神経節と融合して複合神経節を形成することが多い。内臓感覚におけるRunx1の機能を解析するにあたり、本研究ではすべてのニューロンが内臓感覚性であるNGに注目した。ところが、CGRPとCalbindin-D28KのNGにおける発現の局在から、NGが他の神経節と融合している可能性が示唆された。ヒトやモルモットなどの中型～大型哺乳類ではJGとNGは明瞭に分離している。しかしマウスではJGとNGが融合しているとの報告もあり、マウスにおけるNGとJGに関する統一した見解は得られていない。JGは神経堤由来であるのに対し、NGは上鰓プラコード由来であるが、マウスでJG・NG複合体が見られる場合、複合体の上方部分に神経堤由来のニューロン(JG)が多いとの報告がある。一方、CGRPはNGよりもJGで強い発現が見られ、それに対してCalbindin-D28KはJGには発現せず、NGに発現しているという報告がある。今回CGRPの発現がNGの上方部分に、Calbindin-D28Kが下方部分に見られたことを考えると、本研究でNGとして解析した神経節は複合体を形成しており、NGは下方部分で、上方部分はJGである可能性が高い。NGとJGを同定するためには、神経堤や上鰓プラコードに特異的な分子の発現を用いた解析が必要である。一方、内臓感覚性ニューロンを同定するために、軸索トレーサーであるDiIを食道に注入して逆行性にNGやJGの内臓感覚性ニューロンの標識を試みたが、標識ニューロンは認められなかった。Incubationの温度や時間等の更なる実験条件の検討が必要と思

われる。

内臓感覚のマーカ分子の発現におけるRunx1の役割

本研究では、CGRP陽性線維が食道の粘膜固有層・粘膜下組織(成体)と筋層および筋層間神経叢(成体と胎仔)に、TRPV2陽性細胞が食道の筋層間神経叢(成体と胎仔)に見られた。また、胎仔期のNGではCGRP、Calbindin D-28K、TrkC、TRPM8を発現するニューロンが見られた。末梢組織に見られるニューロンは自律神経の節後ニューロンであるため、食道や十二指腸に見られたTRPV2陽性細胞は自律神経の節後ニューロンであり、感覚性ではないと考えられる。一方、末梢組織に見られる線維には感覚神経も含まれるため、食道のCGRP陽性線維も感覚神経の可能性もある。そこで、CGRP陽性線維率をRunx1^{+/+}::TgとRunx1^{-/-}::Tgで比較したところ、Runx1^{-/-}::Tgで有意に増加していた。ところが、上述したようにNG(本研究でNGとして解析した下方部)ではCGRPはほとんど発現していないため、このCGRP陽性線維はDRGまたはJG(本研究でNGとして解析した上方部)由来であると思われる。すでにRunx1^{-/-}::TgのDRGでは、CGRP陽性ニューロンが有意に増加することを当研究室が報告している。CGRPは侵害受容に關与するペプチドであることから、Runx1が侵害受容に關与しており、その過剰発現を抑えていると考えられる。これまでRunx1は皮膚感覚を担うCGRPの発現を抑制的に制御することが示されていたが、今回、食道においてもCGRP陽性線維が見られ、Runx1^{-/-}::TgでCGRP陽性線維率が増加していたことから、Runx1は内臓感覚を担うCGRPの発現も抑制している可能性が示唆された。ところで、CGRP陽性線維率はRunx1^{+/+}::Tg、Runx1^{-/-}::Tg共に5%未満と、低い値であったが、末梢組織に見られる神経には感覚神経に加えて運動神経なども存在しており、さらに感覚神経の中にもCGRP陽性線維以外の線維も存在するため、このような値になったと考えられる。

NGにおけるTrkC陽性ニューロンは、Runx1^{+/+}::Tgに比べRunx1^{-/-}::Tgで有意に増加していた。TrkCは機械受容に關与する神経成長因子受容体チロシンキナーゼであるため、Runx1が侵害受容のみならず機械受容にも關

与していることが示唆された。そこで、Runx1とTrkCの発現関係を調べるために、これらの共発現を調べたところ、E17.5のNGではTrkC発現ニューロンは全てRunx1も発現していた。ところで、Runx1はTrkAの発現を抑制することが知られているが、これらは発生初期に共発現した後にRunx1発現ニューロンでのTrkA発現が細胞自律性に抑制される。本研究ではE17.5でしか共発現を見ていないため、Runx1とTrkCの間にRunx1とTrkAのような発現制御関係があるのかは不明である。これらを解明するためには、E17.5より前の発達段階での解析が必要である。

TRPファミリーについては、上述したように迷走神経で発現が見られるとの報告があるのにもかかわらず、蛍光標識ではE17.5のNGではどれも発現が見られなかった。より感度の高いDAB発色ではTRPM8の発現が見られたことから、発現量が少ないために陽性反応が見られないという可能性は否定できない。また、TRPファミリーが迷走神経に発現すると報告している論文の多くで用いられているのが8~10週齢のマウスであるため、本研究で用いたE17.5のマウスとは発現様式が異なることも予想される。染色条件の更なる検討に加え、E17.5のみではなく様々なステージで解析を行うことが必要である。

以上よりマウスでは、内臓感覚性ニューロンが存在する迷走神経下神経節であるNGは、迷走神経の上神経節と舌咽神経の上神経節複合体であるJGと融合し複合体を形成している可能性が考えられ、内臓感覚性ニューロンを調べるにあたって、NGとJGを区別する必要があることが示唆された。また、Runx1は侵害受容に關与するCGRPおよび機械受容に關与するTrkCの発現に抑制的に作用し、Runx1が内臓感覚を担う機能分子の過剰発現を抑制している可能性が示唆された。Runx1によるCGRPおよびTrkCの発現制御機構を解明していくことで内臓感覚性ニューロン発生におけるRunx1の機能の解明につながると考える。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計1件)

志賀 隆、筑波大学出版会、感性認知脳科学への招待、2013、14

〔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

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/shiga-group/anatomy3rd.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

なし

(3) 連携研究者

なし