

鶏胚 Remak 神経節発生における細胞数の制御について

笹川健吾

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
生体機能調節医学専攻 機能再建医学大講座  
解剖学分野

(主任：佐藤 昇教授)

Regulation of cell number in the developing Remak's ganglion in the chick

Kengo Sasagawa

Division of Anatomy Department of Regenerative and Transplant Medicine, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Noboru Sato)

別刷請求先：951-8510

新潟市中央区旭町通 1 - 757

新潟大学大学院医歯学総合研究科解剖学分野 笹川健吾

Reprint requests to: Kengo Sasagawa

Division of Anatomy Department of Regenerative and Transplant Medicine, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku, Niigata 951-8510, Japan.

要旨

Remak 神経節は十二指腸から排泄腔の背側を並走する神経節であり、鳥類で認められる特異な自律神経節と考えられている。仙骨神経堤細胞に由来する排泄腔部においては、カテコールアミン陽性細胞とコリンアセチルトランスフェラーゼ陽性細胞が混在し、また、この神経節から後腸の腸管神経系に無髄線維を投射することが知られている。Remak 神経節の発生過程については報告が限定的で、他の神経系で確認されているようなニューロン数の増加と最終的な細胞数をコントロールするプログラム細胞死については詳細が不明である。

本研究では、Remak 神経節形成期における総細胞数が E6 から E14 にかけて増加する一方で、E10~E12 では増加傾向が一時的に停滞することが明らかになった。また、初期分化マーカーの Islet-1 陽性細胞が E12 でピークアウトするのと対照的に、Tyrosin Hydroxylase 陽性細胞やコリンアセチルトランスフェラーゼ陽性細胞が E8 から経時的に増加傾向を呈することが明らかになった。更に神経系の発生過程で観察される細胞死について検証したところ、E6~E14 の全てのステージで Remak 神経節における細胞死が観察された。この細胞死は 2 層性の推移を示しており、前半と後半で異なる細胞が除去されていることが示唆された。また細胞死で失われる細胞の規模は、他の神経系の発生で認められる 50%前後と比して、極めて限定的であることが明らかになった。プログラム細胞死の多くが標的由来シグナルの影響を受けることから、Remak 神経節の標的が ENS を含む点で通常の自律神経節後ニューロンのような細胞数のコントロールと異なっている可能性が考えられた。

キーワード：発育鶏胚, Remak 神経節, 後腸, 細胞死

#### 諸言

Remak 神経節は 1847 年に発育鶏胚の直腸間膜、結腸間膜、腸間膜で発見された<sup>1)</sup>。孵卵(E) 4 日 (Hamburger と Hamilton による stage 24)<sup>2)</sup>で排泄腔の背側に発生し、E5 で盲腸まで、E10 で十二指腸の尾側に至るまで発達する<sup>1)3)</sup>。Remak 神経節の起源は、第 28 体節レベル以降の仙骨神経堤細胞に由来すると考えられており、この細胞が E4 で後腸の腸間膜に移動し Remak 神経節を形成する<sup>4)</sup>。排泄腔や直腸部の Remak 神経節では、神経節の形成に伴いコリンエステラーゼの活性が急速に漸増し、排泄腔部においてはカテコールアミン(CA)を有する細胞もホルムアルデヒド蛍光組織化学法によってウズラ胚において観察されている<sup>4)</sup>。発育鶏胚においてもアセチルコリン合成に関与するアセチルコリントランスポーター(VAChT)やコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)に対する免疫組織化学によって、E13 の結腸、および直腸部の Remak 神経節で ChAT 陽性細胞が確認されている<sup>5)</sup>。また CA 合成に関与する tyrosine hydroxylase (TH) に対する免疫組織化学で、直腸部の Remak 神経節に TH 陽性細胞が孵化後の鶏において確認されている<sup>6)</sup>。Remak 神経節からは、後腸の腸管神経系 (Enteric nervous system: ENS) に投射線維を出すことが知られており、これは CA 軸索や非 CA 軸索から成る無髄神経線維である<sup>7)</sup>。このように Remak 神経節は、同一の自律神経節に交感神経細胞(CA 陽性細胞)と副交感神経細胞(ChAT 陽性細胞)を有する点や、節後神経線維の標的の少なくとも一部が ENS という神経系であるという点で極めて特異な神経節である。

組織が形成される際には、幹細胞の増殖と機能細胞への分化、分化した細胞の生存、更にプログラムされた細胞死(Programmed cell death: PCD)による適正な細胞数への調整が重要である<sup>8)</sup>。自律神経節においてもニューロンは神経幹細胞の増殖と主に標的からの生死を決定するシグナルによって細胞数はコントロールされている。発育鶏胚の毛様体神経節では E6-7

に細胞数は一旦ピークに達し、その後 E15 までに 50%程度は PCD によって除かれ、最終的に 3,000 程度の細胞数になる<sup>9</sup>。また交感神経節においては、主要な標的由来因子である神経栄養因子投与によって交感神経幹での細胞数が増加し、核萎縮の細胞数が減少することが観察されている<sup>10</sup>。Remak 神経節形成期における細胞数がどのようにコントロールされるかは全くのところ不明である。前述のように CA 陽性細胞と ChAT 陽性細胞といった異なるニューロンが発生する点や、標的が ENS を含む点で通常の自律神経節後ニューロンのような細胞数のコントロールと異なる可能性が考えられる。そこで本研究では、後腸 Remak 神経節における細胞数の推移、細胞死の有無や規模を明らかにして、Remak 神経節で如何に細胞数のコントロールが行われているのか検討した。

## 材料と方法

### 1. 鶏胚

研究には白色レグホン種の鶏胚を用い、その種卵はヤマギシズム（三重県）より入手した。種卵を 37.6°C に設定した孵卵器（showa 孵卵器）にて培養し、E3 で注射針を使用し卵白のみを約 3ml 抜き取った。その後、卵殻にハサミにて穴を開け実体顕微鏡下で胚を確認した。胚の発育ステージは Hamburger and Hamilton の分類に従った<sup>2</sup>。

### 2. Whole-mount 免疫染色

E4~E20 の後腸を単離し、4%PFA で一晩浸漬固定（4°C）を行った。メタノールで脱水後、メタノールで希釈した 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 2 時間震盪し脱色した。その後メタノールで洗浄し、Tris-Saline with Triton (TST) で水和した。神経の標識には神経細胞の微小管を構成するタンパク質に対して TUJ1 抗体 (Anti-βIII tubulin mAb, Promega) を用いた。ブロッキングの為、スキムミルクと混合した TST (TSTM) で 1/2000 に希釈した TUJ1 抗体に浸漬し、3 日間震盪した。TST で洗浄後、二次抗体として F (ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti mouse IgG (H+L) を TSTM で 1/800 に希釈し、浸漬し 3 日間震盪した。TST で洗浄し 20~30 分 DAB (3,3'-diaminobenzidine, Pierce) を添加し発色した<sup>11</sup>。

### 3. イメージングと細胞数の定量化

発育鶏胚を E4-14 で取り出し、後腸を単離した。中腸と後腸の境界を明瞭にする為、盲腸基部が一部残るように切り出した。切り出した後腸は 4%PFA により一晩浸漬固定（4°C）を行った。続いて胚を 5%、10%、20%の各種濃度の Sucrose に順に 4°C で浸漬した後、Tissu-tek (Sakura) と 20% Sucrose 混合液（1:1）にて一晩浸漬した。その後、Tissue-tek にて -80°C で包埋した。凍結試料を盲腸基部から肛門までクリオスタット (CM1520, Leica) にて薄切りし（厚さ 12μm）、後腸の Remak 神経節の横断切片を作成した。中腸と後腸の神経節が切片に混合することを防ぐため、盲腸基部の横断面が水平となる様に調整した。

横断切片に対して Hematoxylin (WAKO) and eosin (MUTO PURE CHEMICALS) stain

(HE 染色)を行った。また、免疫染色の為、横断切片に熱処理による抗原賦活化を行い、TUJ1 抗体, Islet-1 抗体 (mouse, Islet-1 & Islet-2 homeobox, DSHB)・Tyrosin Hydroxylase (TH) 抗体 (rabbit, Chemicon) にて Avidin-biotin complex method (以下 ABC 法) を用い DAB (Metal Enhanced DAB Substrate Kit, Thermo Scientific) で発色した。また, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) 法の染色と Choline Acetyltransferase (ChAT) (goat, AB144P, Chemicon) 抗体の染色のみ抗原賦活化を行わず同様に ABC 法で標識した。明視野顕微鏡 (BX-50, OLYMPUS) にてイメージングを行なった。

TUJ1 抗体, Islet1 抗体, TH 抗体, ChAT 抗体の免疫染色における ABC 法では, 一次抗体を添加し 4°C で一晩インキュベートした後, TST に 20 分間浸漬し, ビオチン化二次抗体にて室温で 2 時間インキュベートした。その後, アビジン-ビオチン混合 HRP 複合体 (ABC Elite kit, Vector Labs) を使用し室温で 2 時間インキュベートし, DAB で発色した<sup>12)</sup>。

細胞数の定量化のため, HE 染色, TUNEL 法, Islet1 抗体, TH 抗体, ChAT 抗体で標識した細胞に対して描画装置 (Y-IDT, Nikon) を接続した明視野顕微鏡 (E600, Nikon) で計測した。計測は E4, E6, E8 で 6 切片ごと, E10, E12, E14 では 10 切片ごとにサンプリングし, 切片の総数の積で細胞数を算出した。その際, 隣接切片を TUJ1 抗体で免疫染色し, 神経節の領域を明確にした。HE 染色で標識した細胞, TUNEL 陽性細胞, Islet1 陽性細胞は核を確認し計測した。TH 陽性細胞, ChAT 陽性細胞は細胞体を確認し計測した。

蛍光二重染色では, 免疫染色の二次抗体として Islet-1 抗体 (anti-mouse 1:500, Invitrogen), TH 抗体 (anti-rabbit 1:500, Invitrogen), ChAT 抗体 (Donkey anti-goat 1:1000, Abcam) には Alexa594 を使用した。核の染色には 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:500, 同仁化学) を使用した。TUNEL 法の標識では Alexa 488 (Streptavidin 1:500, Invitrogen) を使用した。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 710NLO, Carl Zeiss) にて観察し, 共発現している細胞の蛍光画像を取得し, その細胞数を計測した。

#### 4. 統計学的処理

測定値は平均値と標準偏差で表現した。2 群間の比較は Student's *t* 検定を行い,  $p < 0.05$  を有意水準とした。

### 結果

#### 1. Remak 神経節細胞の経時的変化

後腸 Remak 神経節の発生を観察するため TUJ1 抗体を用いて Whole-mount 免疫染色を行い実体顕微鏡レベルで観察した。また, 後腸の横断切片を作成し, 同様の抗体で免疫染色を行い顕微鏡レベルでも観察した。Whole-mount 染色では腸管に平行し, 頭尾軸に走る神経細胞が観察される (図 1 A)。横断切片では腸間膜内に凝集しつつある神経細胞が E4 で確認できる (図 1 A')。この時期に腸管の背側に細胞が集積・領域化してくる。E8 では一つの集合体が確認でき, Remak 神経節からの軸索が腸管に伸びている (図 1 B)。横断切片で

は腸壁に軸索を伸ばしているのが認められる (図 1 B')。その後, E14 と E20 では腸の頭尾長の発達に伴い神経節も伸びていくことが観察できるが, 一つの切片における断面積には大きな変化は認めない (図 1 C-D, C'-D')。

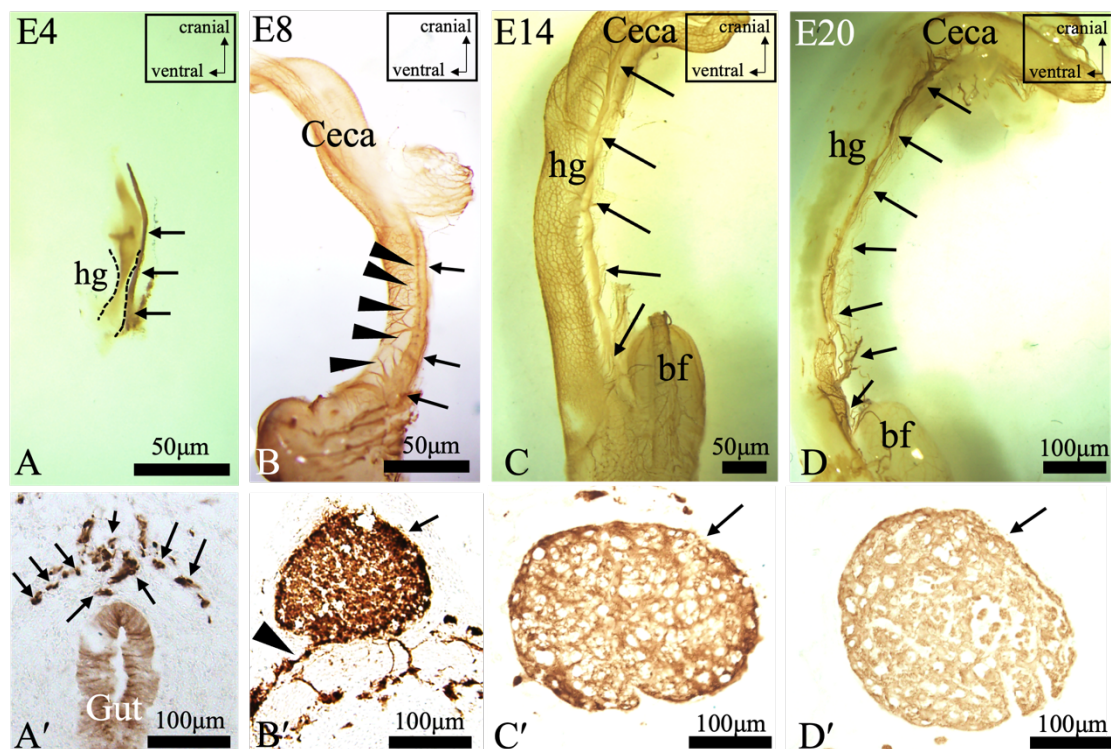


図 1. TUJ1 で標識した後腸の実体顕微鏡画像と横断切片の顕微鏡画像. A-D : 後腸の Whole-mount 免疫染色. Remak 神経節 (矢印). A'-D' : 後腸横断切片の免疫染色. Remak 神経節 (矢印). A : 後腸の腹側縁と背側縁 (点線部). B, B' : 腸壁への軸索 (矢頭). (hg) 後腸. (Gut) 腸管. (bf) ファブリキウス嚢. (Cecae) 盲腸.

続いて後腸 Remak 神経節の細胞数を定量的に解析した. HE 染色による染色像から総細胞数を計測し, 神経分化マーカーである抗 Islet-1 抗体, 抗 TH 抗体, 抗 ChAT 抗体で免疫染色した標本で標識された細胞を計測した (表 1). 神経節内の総細胞数は E14 まで増加するが, E10 から E12 では一時的に増加の遅滞が認められた (図 2). Islet-1 陽性細胞数は E6~E8 においては HE 染色で計測した細胞数と大きな差はなく増加していき, E12 をピークに緩やかに減少へと転じた (図 2). 対照的に TH 陽性細胞と ChAT 陽性細胞は E8 から細胞数が直線的に E14 まで増加していた (図 2).

表 1 後腸 Remak 神経節の細胞数

| 計測した細胞          | 胚齢                    |                        |                       |                       |                        |
|-----------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|                 | E6                    | E8                     | E10                   | E12                   | E14                    |
| HE染色で<br>標識した細胞 | 48592.5±495.5<br>(4)  | 104627.5±3520.5<br>(4) | 157532.5±717.2<br>(4) | 166710±295.9<br>(4)   | 278665±198.6<br>(4)    |
| Islet1陽性細胞      | 43855.2±6848.6<br>(8) | 99330±5568.1<br>(4)    | 125460±1139.7<br>(4)  | 141598.2±740.2<br>(5) | 131204.8±3102.9<br>(4) |
| TH陽性細胞          | 5724±283.8<br>(6)     | 15204±821.5<br>(4)     | 40912±684.3<br>(4)    | 87204±2444.1<br>(4)   | 126205.5±7048.7<br>(4) |
| ChAT陽性細胞        | 1053.5±33.6<br>(4)    | 2800±121.9<br>(4)      | 60785±519<br>(4)      | 81722.5±861.8<br>(4)  | 106510±5416.1<br>(4)   |

胚の数は ( ) に記載. 細胞数は平均値±標準偏差.

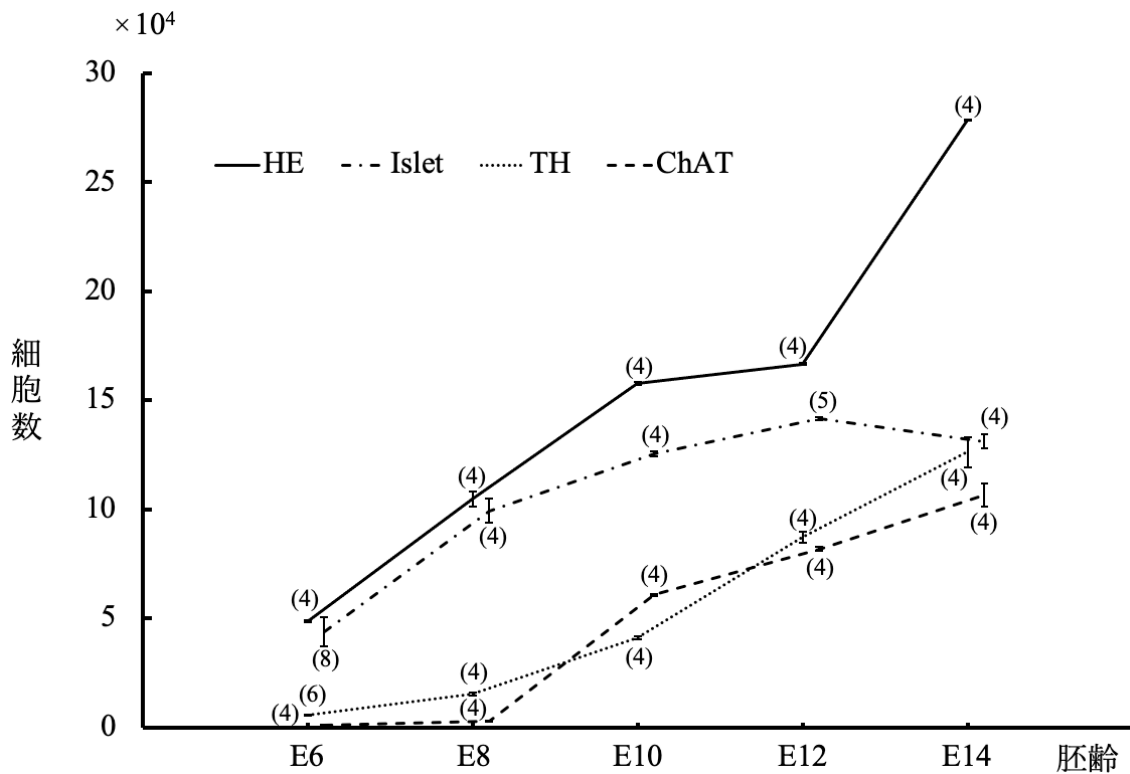


図 2. 後腸 Remak 神経節における細胞数の推移 (n)

## 2. Remak 神経節における PCD

次に後腸 Remak 神経節の発生中に PCD が認められるか, その場合の細胞死数の推移を定量的に解析した. TUNEL 法を用い DAB で標識した細胞数を各ステージで計測した. 細胞死数は E6 から E8 にかけて増加していき, E10 ではむしろやや減少する ( $245 \pm 22$ ,  $n=4$ ; E8 と E10 の統計学的有意差;  $*p < 0.01$ , student's  $t$  test: 図 3). その後 E12, E14 では再度増加した状態となり, ピークは E12 ( $836 \pm 122$ ) であった. E6 から E14 までの死細胞数の積算は E14 における後腸 Remak 神経節の細胞数の約 1% であった.

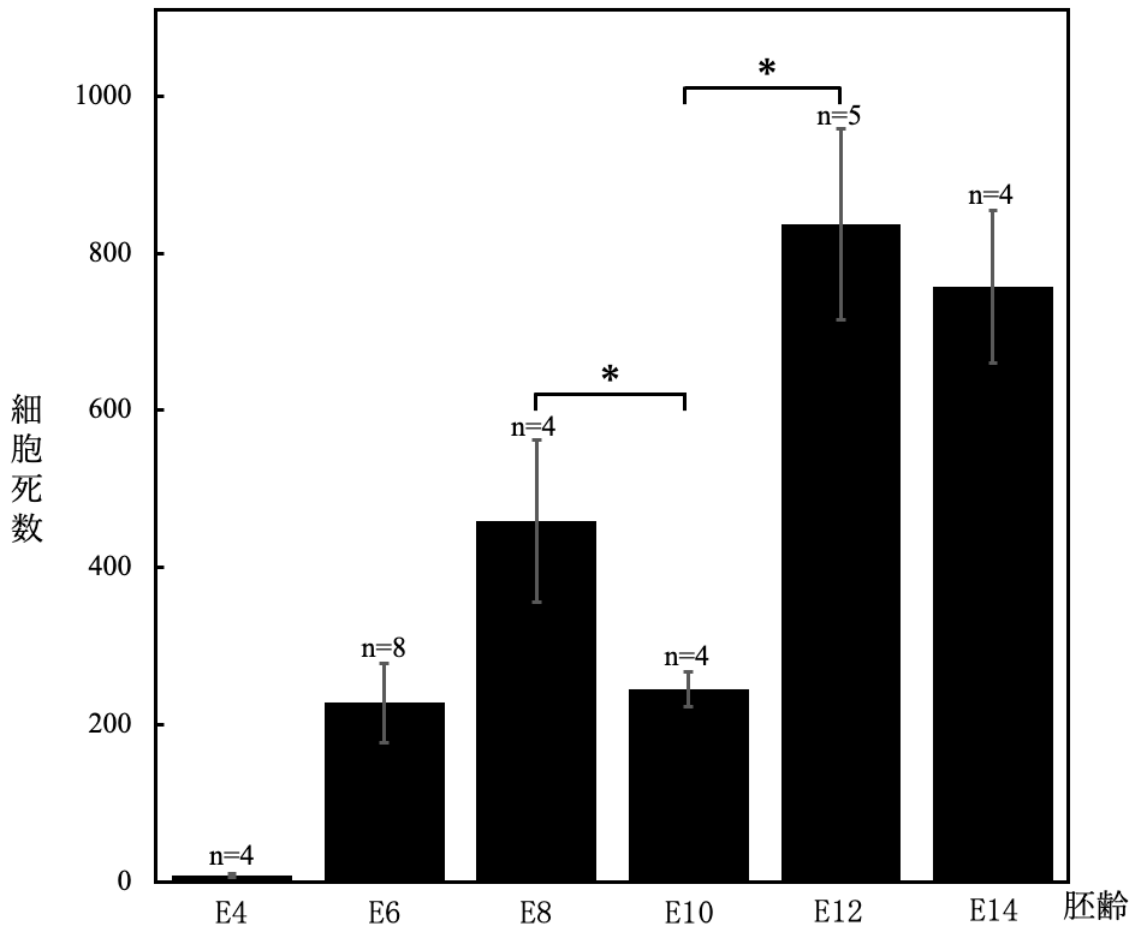


図3. 後腸 Remak 神経節における細胞死数の推移  
細胞死数の比較 \* $p < 0.01$  値は平均値. Error bars : 標準偏差  
胚の数は Error bar の上に記載

次にPCDで失われる細胞の性質を解析するため、TUNEL法と抗Islet-1抗体、抗TH抗体、抗ChAT抗体で蛍光二重染色をした。染色標本を共焦点レーザー顕微鏡で蛍光画像として取得し、TUNEL標識細胞と免疫染色で共発現している細胞数を計測した。E6からE14にかけてTUNELとIslet-1を共発現している細胞が観察された(表2)。E14までのIslet-1陽性細胞の細胞死数は全体の細胞死数の約13%であった。TUNELとTHを共発現している細胞はE10まで観察されず、E12、E14でわずかに認められる程度であった(表2)。E14までのTH陽性細胞の細胞死数は全体の細胞死数の約0.8%であった。TUNELとChATを共発現している細胞は、Islet-1を共発現している細胞よりわずかに下回る形でE6からE14まで認められた(表2)。E14までのChAT陽性細胞の細胞死数は全体の細胞死数の約10%であった。

表2 後腸 Remak 神経節における細胞死数

| 標識             | 胚齢              |                  |                   |                    |                   |
|----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                | E6              | E8               | E10               | E12                | E14               |
| TUNEL          | 228±50.7<br>(8) | 459±103.3<br>(4) | 244.5±22.1<br>(4) | 836.4±121.6<br>(5) | 757.5±97.5<br>(4) |
| TUNEL / Islet1 | 30±7.6<br>(4)   | 35±5.3<br>(4)    | 32±7.9<br>(5)     | 127.5±19.1<br>(4)  | 135±19.3<br>(4)   |
| TUNEL / TH     | 0<br>(4)        | 0<br>(4)         | 0<br>(5)          | 10±9.4<br>(4)      | 10.5±0.9<br>(4)   |
| TUNEL / ChAT   | 22.5±4.6<br>(4) | 22.5±4.6<br>(4)  | 25±5.3<br>(4)     | 97.5±15.8<br>(4)   | 107.5±13.9<br>(4) |

胚の数は ( ) に記載. 細胞数は平均値±標準偏差.

### 考察

本研究では後腸 Remak 神経節発生過程における細胞数の経時的变化と神経系発生で見られる PCD の有無と規模について解析を行い、後腸 Remak 神経節の細胞数がどのようにコントロールされているのか検討を行った。

後腸 Remak 神経節で認められる神経細胞は初期の分化マーカーである Islet-1 陽性細胞がほとんどを占める形で E6 から E8 にかけて増加し、それに続いて TH 陽性細胞と ChAT 陽性細胞は E8 から増加する (図 2)。TH 陽性細胞と ChAT 陽性細胞の増加に伴い、Islet-1 陽性細胞の増加は抑えられるように推移しており、これはより分化した細胞に置き換わっていることを意味していると思われる。興味深いことに、E10 から E12 にかけて、Remak 神経節の細胞数の増加がやや停滞しているのが認められた (図 2)。Remak 神経節からは、E7.5 から仙骨神経堤細胞に由来する細胞の後腸への移動が始まり、後腸内で筋層間神経節を形成し、続いて粘膜下神経節を形成することが知られている<sup>13)</sup>。さらに E10～E12 では Remak 神経節経由の仙骨神経堤細胞が ENS で増加することが報告されている<sup>13)</sup>。従って、Remak 神経節の細胞数の増加が E10～E12 でやや停滞するのは、後腸へ移動する細胞が増加することを表している可能性がある。

本研究によって Remak 神経節でも発生過程で PCD が見られることが明らかになった (図 3)。これは他の神経堤細胞由来の神経組織である毛様体神経節、脊髄交感神経節、そして後根神経節などの末梢神経で認められる点と一致している<sup>10) 13)</sup>。PCD による死細胞数は E10 で有為に減少しており、前半のピークと後半のピークでは異なる発生ステージの細胞が細胞死を起こしている可能性が考えられる。神経系で観察される PCD は、細胞の増殖、移動、分化、標的とのシナプス形成後の様々なステージで認められる<sup>14)</sup>。Remak 神経節からは、前述のように後腸へ細胞移動が起こるため、前半のピークは増殖、移動に伴う PCD で、後半の PCD は分化、シナプス形成に起因する可能性がある。それぞれの発生ステージのマーカーなどを用いてより詳細な検討が必要である。

また毛様体神経節など他の神経組織では 40%～50%程度のニューロンが PCD で失われるのに対して、Remak 神経節では約 1%程度が PCD で失われていた (表 1 及び表 2)。死細



胞数については2日毎にカウントしているため、全てを捉えきれていない可能性はあるが、他の神経組織では総細胞数がピークから40%~50%程度に減じており、Remak神経節において総細胞数が増加傾向を示している点からもPCDで除去されるニューロンは限定的であると思われる。Remak神経節の標的の一つはENSと考えられており、これは後腸内の筋層間神経節や粘膜下神経節から成る<sup>13)</sup>。通常は自律神経節の標的は特定の腺または平滑筋であり、標的と支配神経の関係は特異的かつ限定した対応関係にある。ニューロンは発生過程で標的からの限られた栄養因子等によるシグナルを競合しており、上手くシグナルを受け取れないニューロンはPCDにより除去される(神経栄養仮説)<sup>15)</sup>。ENSは後腸以外にも含めた腸管全体を支配する神経組織であり、迷走神経からも投射を受ける<sup>13)</sup>。また神経組織はネットワークを形成しており、迷走神経やRemak神経節からの投射が複数のENSニューロンから栄養因子を受け取る可能性が考えられる。実際、脊髄の介在ニューロンでは発生過程でほとんどPCDが観察されず、これは複数の標的から栄養因子を受け取る可能性があるためと考えられている<sup>14)</sup>。後腸Remak神経節でPCDが観察される一方で、死細胞の割合が少ないのは標的であるENSとの回路形成の複雑さに起因する可能性がある。

## 結論

後腸Remak神経節は、E6から細胞数が増加し、やや遅れてE8からTH陽性細胞とChAT陽性細胞が増加する。発生に伴ってPCDが認められるが、細胞死で除去されるニューロン数は他の神経組織に比して極めて限定的であった。これは標的であるENSとの複雑な回路形成に起因している可能性がある。

## 謝辞

ご指導いただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科、生体機能調節医学専攻、機能再生医学大講座、解剖学分野、佐藤昇教授に心より深謝申し上げます。また、日頃から研究を支えていただきました解剖学分野、長島寛准教授、渡辺啓介医学部准教授、相馬健一技術職員にも合わせて感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Remak R: Ueber ein selbständiges Darmnervensystem. G. Reimer. Berlin, 1847.
- 2) Hamburger V, Hamilton H L: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88: 49-92, 1951.
- 3) Romanoff A L: The avian embryo structural and functional development. The Macmillan company, New York, 346-349 1960.
- 4) Teillet M A: Evolution of the Lumbo-Sacral Neural Crest in the Avian Embryo: Origin and Differentiation of the Ganglionated Nerve of Remak Studied in Interspecific Quail-Chick Chimaerae. Wilhelm Roux's archives developmental biology 184: 251-268, 1978.

- 5) Watanabe T, Kiyomoto T, Tadokoro R, Takase Y, Takahashi Y: Newly raised anti-VACht and anti-ChAT antibodies detect cholinergic cells in chicken embryos. *Dev Growth Differ.* 59, 677-687. 2017.
- 6) Suzuki M., Ohmori Y, Watanabe T, Nagatsu I: Immunohistochemical studies on the intestinal nerve of Remak in the male chicken. *J Auton Nerv Syst.* 49, 207-216. 1994.
- 7) Nagasaki M, Takewaki T, Ohashi H: Nerve pathways in the rectal region of the nerve of Remak of the chicken. *Nihon Juigaku Zasshi.* 5, 443-452. 1983.
- 8) Raff M C: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400, 1992.
- 9) Landmesser L and Pilar G: Synapse formation during embryogenesis on ganglion cells lacking a periphery. *J Physiol* 241: 715-736, 1974.
- 10) Oppenheim R W, Maderdrut J L, Wells D J: Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. VI. Reduction of naturally occurring cell death in the thoracolumbar column of Terni by nerve growth factor. *J Comp Neurol* 210: 174-189, 1982.
- 11) Nagashima H, Koga D, Kusumi S, Mukaigasa K, Yaginuma H, Ushiki T, Sato N: Novel concept for the epaxial/hypaxial boundary based on neuronal development. *J Anat* 237: 427-438, 2020.
- 12) Chiba A, Soma K, Watanabe K, Nagashima H, Sato N: Development of fin-innervating motor neurons after peripheral target removal in medaka fish. *Dev Neurobiol* 81: 110-122, 2021.
- 13) Burns A J, Le Douarin N M: The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 125: 4335-4347, 1998.
- 14) Oppenheim R W: Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-50, 1991.
- 15) Oppenheim R W: The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12: 252-255, 1989.