

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14837

研究課題名（和文）神経上皮の新規運命選択機構：細胞突起の遠隔的接触によるDelta-Notch制御

研究課題名（英文）Unexpectedly wide-range cell-cell contact via Delta-presenting lamellipodia-like protrusions in the mouse neuroepithelium

研究代表者

川上 巧（Kawaue, Takumi）

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：50793858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：胎生期の哺乳類大脳において、神経前駆細胞から生産された娘細胞は周囲の分化細胞との接触を介したDelta-Notchシグナル伝達を利用して、「分化」が「未分化」の運命選択を行う。従来、そのシグナル伝達は直近の隣接細胞間のみで行われる狭い範囲のものが想定されてきた。しかし、本研究によって、分化細胞においてDeltaを膜局在させた仮足様の構造物が発見され、その到達範囲は遠方の細胞にまで至ることが見出された。また、仮足を介した遠隔的な細胞間接触は、娘細胞の運命選択に影響を及ぼすひとつの要因であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、哺乳類の大脳が形成される過程における細胞の運命選択の仕組みについて理解が深まった。また、細胞が持つ微細構造とそのダイナミクスが、細胞間のシグナル伝達の範囲を規定する重要な要素であることが明らかとなった。発展的展望として、シグナル伝達が活性化されるために必要な実質的な細胞間接触（接触面積・時間）について理解する必要がある。これから得られる知見は細胞の運命選択のみならず発生（正常・がん）・再生・疾患のメカニズム解明の糸口となる期待がある。

研究成果の概要（英文）：During mammalian brain development, cell contact-mediated interactions, such as Delta-Notch signaling, are important for the cell fate choice of the newborn cells. Although the fundamental molecular mechanism of Delta-Notch signaling is well known, how Delta-presenting cells contact with the neighbors to induce their Notch activation in developing 3D tissues has been challenging to address. In this study, we demonstrated that membrane-bound Delta molecules were enriched in lamellipodia-like protrusions that were extended from the apical process of differentiating cells. In addition, the decrease in lamellipodia-like structures increased the number of differentiating cells in the cerebral cortex. These results suggest that cell-cell contacts through microstructures are involved in cell fate choice for newborn cells.

研究分野：神経発生

キーワード：発生・分化 細胞間相互作用 神経前駆細胞 Delta-Notchシグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

胎生期の脳原基では神経前駆細胞が細胞生産を担い、誕生した娘細胞は「分化」か「未分化」の運命選択を行う。この時、隣接した分化細胞との細胞間接触を介した側方抑制 (Delta-Notch システム) が細胞運命選択に重要であると考えられている。しかしこのことは、Delta-Notch システムの分子メカニズムのみで説明されてきたものであり、三次元組織中でいかにして細胞同士が接触し、その後、Notch シグナルが活性化され、運命が決定されるのか (未分化へ誘導されるのか)、その本質を問う研究は脳原基においてなされてこなかった。

細胞間接触を詳細に見ずに想定されてきた従来の側方抑制モデルは、単層上皮系と同様な直近の隣接細胞間だけで作用するものであった (旧モデル)。しかし、研究代表者らが見出した2つの新知見がこのモデルを一変させる可能性を示した。知見 1: 神経前駆細胞は脳室面付近で側方に伸びた仮足を有しており (Shinoda et al., PLoS Biol., 2018, 研究代表者共著者)、2~4 細胞先まで届く細胞間接触を有する。知見 2: 免疫電顕解析により、仮足が存在する脳室面付近にて、膜局在した Delta の集中が判明しており、Notch も同領域に分布している。つまり新仮説として、Delta を提示している仮足により、従来よりも広い範囲で側方抑制が行われている可能性が浮上した (新モデル)。そこで、仮足による細胞間接触がどの程度、娘細胞の運命選択に寄与するのか、を明らかにする必要がある。

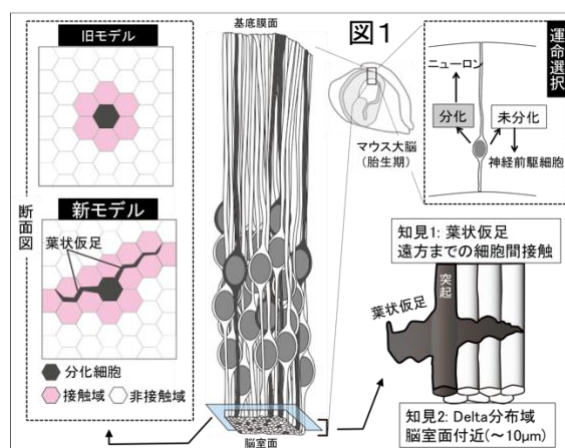


図 1. 遠隔的な細胞間接触と細胞運命選択

## 2. 研究の目的

本研究は、Delta-Notch システムに着目して、細胞運命選択が行われるための細胞間接触の法則性を理解すべく実施された。そのために、新たに着想に至った仮説「仮足を介した広範囲に渡る側方抑制」の検証を行った。

## 3. 研究の方法

まず Delta が膜局在する部位を特定するために、胎生期の Delta-like 1:Venus マウスの脳に対する免疫電顕を行い、その詳細な局在分布を解析した。次に仮足のダイナミクスを調べるために、電気穿孔法を用いて脳組織内の標的細胞へ膜局在型の緑色蛍光タンパクを導入し、スライス組織培養下でライブ観察を行った。仮足の形成・動態制御の仕組みを理解するために、組織培養下での阻害薬剤試験、組織内の標的細胞に対する shRNA による機能抑制 (KD) 操作、CRISPR/Cas9 システムを利用した機能欠損 (KO) 操作を行い、仮足関連因子の機能を検討した。最後に、仮足による細胞間接触と娘細胞の運命選択の関係を調べるために、仮足関連因子に対する KD および KO 操作を施し、仮足を退縮・消失させた後、免疫組織化学的手法を用いて組織内の細胞の分化度を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) Delta は分化細胞の仮足に顕著に膜局在している

Delta の局在を調べるために免疫組織化学染色を行った結果、分化細胞の apical プロセス全体に分布していることが分かった。次に、Notch と結合し得る膜局在の Delta の分布を調べるために Delta-like 1:Venus マウスの脳に対する免疫電顕 (Venus に対する染色) を行った。膜局在の Delta は脳室面から 30µm 以内の apical プロセスに分布し、特に仮足の存在が認められる 5~10µm 以内に高い分布を示した。免疫電顕画像を三次元再構成して 1 細胞レベルで Delta の分布を調べ

た結果、仮足での高い膜局在を示した。以上より、仮足は Delta-Notch シグナル伝達のホットスポットである可能性が示唆された。

## (2) 活発な動態を示す仮足

次に仮足を形成する細胞の種類を特定するために、分化細胞および未分化細胞へ膜局在型の緑色蛍光タンパクを導入し、スライス組織培養下で各々の微細構造を観察した。仮足は葉状仮足様の構造を示し、分化細胞に限らず未分化細胞にも認められ、その側方への伸長は双方とも 2~4 細胞先まで到達することが見出された。仮足を介した一時的な接触細胞数は、これまで想定されてきた apical プロセス同士の接触に対して平均して 2 倍以上に及んだ。さらにスライス組織培養下でのライブ観察によって、仮足の動きは活発で、常に伸長と退縮を頻繁に行い、突出位置も変化させることが分かった。

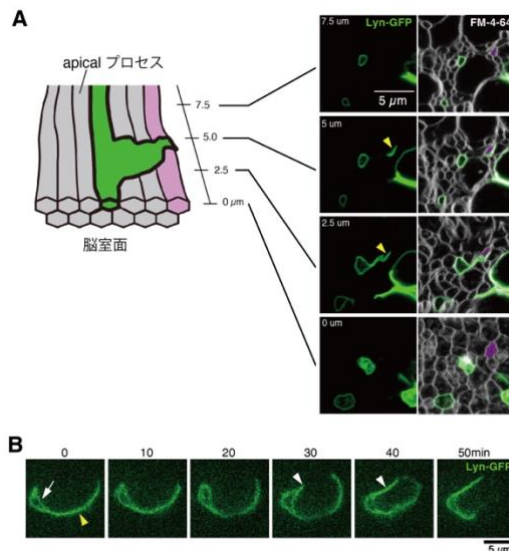


図 2. 仮足の形態と動態

- A. 大脳組織スライス培養下で観察された仮足 (黄色矢頭)。仮足は隣接していない細胞 (マゼンタ) とも接触している。全細胞膜は FM4-64 により可視化されている。
- B. 仮足のライブ観察画像。0 min 時には apical プロセス (白矢印) から伸びた 1 本の仮足 (黄色矢頭) が観測され、30 min を過ぎた頃に 2 本目の仮足 (白矢頭) が出現した。

## (3) 仮足のダイナミクスを制御する因子群

仮足の形状と運動性はアクチンに依存しており、ミオシンのモーター運動が仮足の形状変化の駆動力となることが知られている。大脳のスライス組織培養下で、ミオシン II の阻害剤である blebbistatin を添加すると、仮足の運動停止と退縮が認められた。さらに、葉状仮足のアクチンリモデリングに関連する因子として知られる Lamellipodin と SHIP2 の KD および KO 操作により、仮足の退縮あるいは消失が認められた。これらを合わせると、仮足の形態形成は葉状仮足に関与する因子によって担われ、そのダイナミクスはアクトミオシンに依存していることが明らかとなった。



図 3. 仮足の退縮・消失

大脳組織スライス培養下で観察された apical プロセスと仮足の断面図。Lamellipodin の KD (中央) と KO (右) にて仮足の退縮と晶出が認められた。

## (4) 遠隔的な細胞間接触は娘細胞の運命選択に影響を及ぼす

仮説として、仮足を介した接触がシグナル伝達に寄与するのであれば、人為的に仮足を失わせた時に、やや遠方の娘細胞は Delta シグナルを受け取れず、娘細胞の多くが「分化」を選択する可能性がある。これを検証するために、先述した実験系を用いて仮足を消失させ、分化の初期段階で発現する転写因子 Tbr2 の陽性率を調べた。その結果、娘細胞が分化を呈する割合が有意に増加することが分かった。このことから、葉状仮足を介した遠隔的な細胞間接触は娘細胞の運命選択に影響を及ぼすひとつの要因であることが示唆された。

尚、本研究の成果は国内・国際学会等で報告を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawaue Takumi, Yow Ivan, Le Anh Phuong, Lou Yuting, Loberas Mavis, Shagirov Murat, Prost Jacques, Hiraiwa Tetsuya, Ladoux Benoit, Toyama Yusuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanics defines the spatial pattern of compensatory proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.07.04.451019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yuting Lou, Takumi Kawaue, Ivan Yow, Yusuke Toyama, Jacques Prost, Tetsuya Hiraiwa	4. 巻 -
2. 論文標題 Interfacial friction dictates long-range force propagation in tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 arXiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.48550/arXiv.2107.03074	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawaue T., Shitamukai A., Nagasaka A., Tsunekawa Y., Shinoda T., Saito K., Terada R., Bilgic M., Miyata T., Matsuzaki F., Kawaguchi A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-10730-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shinoda Tomoyasu, Nagasaka Arata, Inoue Yasuhiro, Higuchi Ryo, Minami Yoshiaki, Kato Kagayaki, Suzuki Makoto, Kondo Takefumi, Kawaue Takumi, Saito Kanako, Ueno Naoto, Fukazawa Yugo, Nagayama Masaharu, Miura Takashi, Adachi Taiji, Miyata Takaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2004426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.2004426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Yuto, Kawaue Takumi, Miyata Takaki	4. 巻 145
2. 論文標題 Differentiating cells mechanically limit the interkinetic nuclear migration of progenitor cells to secure apical cytotgenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev162883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.162883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takumi Kawaue, Yow Ying Ming Ivan, Yusuke Toyama
2. 発表標題 Mechanical impact of apoptosis in compensatory cell proliferation
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawaue T, Watanabe Y, Miyata T
2. 発表標題 Premigratory neurons mechanically limit interkinetic nuclear migration to secure progenitor cells' apical cytotgenesis
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaue T, Fukazawa Y, Miyata T
2. 発表標題 Unexpectedly wide-range cell-cell contact via Delta-presenting lamellipodia-like protrusions in the mouse neuroepithelium
3. 学会等名 Joint Meeting of JSCB 70th & JSDB 51st
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------