

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23755

研究課題名(和文)硬さによる神経前駆細胞の増殖制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of regulation of cell growth of neural progenitor cells by stiffness

研究代表者

徳永 雅之 (TOKUNAGA, Masayuki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10845043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外基質の硬さなどの力学刺激は細胞内に伝達され細胞増殖や分化が制御されている。転写共役因子YAPはこのメカノトランスダクションにおいて中心的な役割を担っている。しかし、細胞外の力学刺激がどうYAPに伝達されるかその詳細は不明である。本課題では、代表者が見出したYAP-ARHGAP11Aネガティブフィードバックが、1次繊毛を介した細胞増殖制御に関わることを明らかにした。また本研究成果より、ARHGAP11Aは細胞外の硬さを感知しYAPを抑制することで、細胞増殖を抑える、新規メカノトランスデューサー分子であることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、1次繊毛を介した細胞増殖制御にYAP-ARHGAP11Aネガティブフィードバックと細胞外の硬さが関与することを明らかにした。1次繊毛は水流の機械刺激に応答することは報告されているが、細胞外基質の硬さと1次繊毛を報告した例はこれまでにない。一部のがん細胞では1次繊毛が減少していることが報告されている。さらに、がん組織が周辺組織に比べ硬くなることは周知の事実である。これらのことから、YAP-ARHGAP11Aの破綻が、がん細胞において1次繊毛を介した細胞増殖抑制を阻害し、がんの悪性化に寄与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cells translate extracellular matrix stiffness into biochemical signals which regulate cell growth and differentiation. YAP, a transcription co-activator, plays a pivotal role in the mechanotransduction systems, but how rigidity mechanosensing is linked to activity of YAP remains poorly understood. Here I report YAP-ARHGAP11A negative feedback acts through primary cilia to regulate cell proliferation. These results suggest ARHGAP11A functions as a novel mechanotransducer.

研究分野：分子生物

キーワード：YAP ARHGAP11A 1次繊毛 硬さ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緻密に制御された脳組織が立体的に形作られるためには、神経前駆細胞が未分化のまま増殖することと発生の決まった時期に神経細胞を生み出すことが重要である。しかし、どのように神経前駆細胞の増殖と分化が適切に制御され、脳組織が形作られているのか詳細は不明である。研究代表者はこれまでの成果から、YAP-ARHGAP11A ネガティブフィードバックループが神経前駆細胞の増殖と分化のバランス制御に重要で、そのループの乱れは不安様行動に影響を与えることを見出している。しかし、このループがどう制御されているかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、組織内部の硬さと力の測定を可能にした方法(Serwane Nat Methods. 2017)を脳組織に応用して、神経前駆細胞の増殖・分化の制御メカニズムの解明から脳組織がどう立体構築されているかの理解および、うつや不安障害など精神疾患治療への発展を目指す。

またこれまでの研究成果をもとに、ARHGAP11A の細胞内局在制御のメカニズムをよび、YAP-ARHGAP11A ネガティブフィードバックの生理的意義を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 磁性流体を脳組織にインジェクションし、磁場をかけることで脳組織における硬さを測定する系の確立を目指した。

(2) ARHGAP11A ノックアウトマウスを用いて脳組織での神経前駆細胞の細胞増殖を解析した。

(3) ポリアクリルアミドゲルを用いて様々な硬さのゲルを作製し、そのゲル上で細胞を培養し、細胞外の硬さが ARHGAP11A の細胞内局在に与える影響を解析した。

(4) ARHGAP11A をノックダウン後の細胞から得られたトータル RNA を用いて、RNA シークエンス解析により YAP-ARHGAP11A ネガティブフィードバックが mRNA 発現に与える影響を解析した。

(5) 1次繊毛のマーカーである ARL13B 抗体による蛍光免疫染色法により ARHGAP11A の1次繊毛形成に与える影響を解析した。

### 4. 研究成果

(1) 脳組織を 100  $\mu\text{m}$  の厚さにマイクロトームを用いて切断し磁性流体をインジェクションした。その後、磁場を与えて Viscosity と Elasticity を測定した (図1)。これまでに、原子力間顕微鏡を用いて外部から脳組織の硬さを測定した研究はあるが、本研究で樹立した方法では組織内部から組織の硬さを測定することができる。今後のこの実験系を用いてノックアウトマウスにおける物理特性の違いを明らかにしていく。

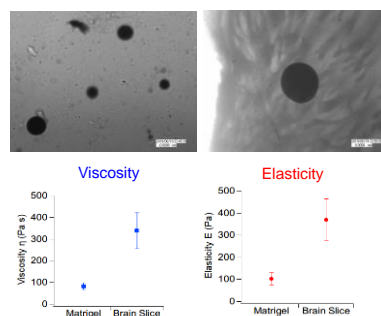


図1. 磁性流体をインジェクションした、Matrigel とマウス成体脳組織および Viscosity と Elasticity 測定結果

(2) ARHGAP11A のノックアウト (KO) マウスでは、YAP-ARHGAP11A ネガティブフィードバックが破綻しており、脳神経前駆細胞の増殖が予想された。そのため、KO マウスと野生型マウスの脳組織において蛍光免疫染色により細胞増殖と YAP の発現を比較した。しかしながら、有意な差が認められなかった。本研究ではおもに成体を用いて解析したため、今後胎児マウスにおいて神経前駆細胞の増殖期において同様の解析を行っていく予定である。

(3) ARHGAP11A は培養細胞では主に核内に局在しており、核局在配列 (NLS) を有していることを明らかにしている。さらに、NLS 欠失 ARHGAP11A を発現させると Hippo 経路を介して YAP を負に制御することを明らかにしている。しかし、ARHGAP11A が細胞質に移行するメカニズムは不明であった。YAP は細胞外の硬さにより細胞内局在が変化することが報告されているため、ARHGAP11A も同じく硬さにより細胞内局在が制御されていると予想し実験を行った。ポリアク

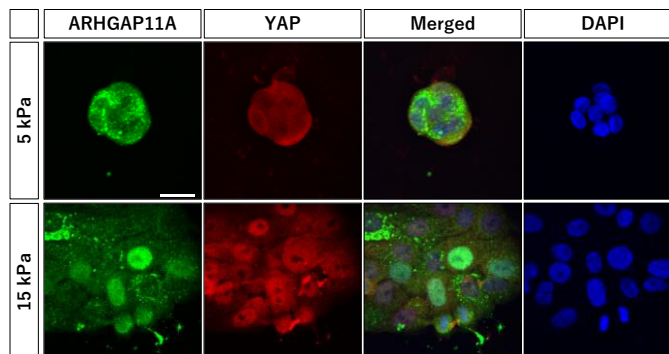


図2. 5 kPa または 15 kPa 上で培養した細胞の蛍光免疫染色スケールバーは 25  $\mu\text{m}$  を示す。

リルアミドゲルを用いて 5 kPa または 15 kPa の硬さのゲルを作製し、そのゲル上で細胞を培養した。その後、蛍光免疫染色を用いて YAP と ARHGAP11A の細胞内局在を比較した。その結果、5 kPa のゲル上では ARHGAP11A も YAP も細胞質に局在していた。一方で、15 kPa では ARHGAP11A も YAP も核内に局在していた (図 2)。YAP は 10 kPa の硬さを境に細胞内局在を変化させると報告されており、ARHGAP11A も同じ挙動を示すことが明らかとなった。細胞外の硬さにより YAP が細胞内局在を変化させる詳細なメカニズムは明らかになっていない。この結果は、ARHGAP11A が細胞外の硬さのシグナルを感知して YAP を負に制御する上流に因子であることが示唆される。今後は、ARHGAP11A の発現を抑えたうえで 5 kPa のゲル上で培養し YAP の細胞内局在が変化するかを解析する予定である。

(4) ARHGAP11A の発現を抑制することで YAP-ARHGAP11A ネガティブフィードバックが抑制され、YAP 活性が上昇することが予想されたため、ARHGAP11A を、siRNA を用いてノックダウン (KD) しその後、トータル RNA を回収した。回収した RNA を用いて RNA シークエンスを行い、mRNA の発現を網羅的に比較した。GO 解析とパスウェイ解析の結果、ARHGAP11A を KD した細胞において対照群と比較して、より細胞増殖が亢進している可能性が示された。また、1 次繊毛を負に制御する遺伝子の発現上昇も明らかとなった。今後は KD 細胞における細胞周期の状態をフローサイトメトリー法を用いて詳細に解析していく。

(5) ARHGAP11A は細胞質において YAP を負に制御することを明らかにしている。しかしながら、ARHGAP11A の生理的機能は不明である。これまでの研究成果から、ARHGAP11A は細胞質において、微小管関連タンパク質おもと、1 次繊毛に関わるタンパク質と相互作用することを明らかにしている。そこで、ARHGAP11A が 1 次繊毛の形成に関与するか蛍光免疫染色を用いて解析した。その結果、ARHGAP11A を KD した細胞において、1 次繊毛の数が有意に減少していた。ARHGAP11A が 1 次繊毛の形成を促進することで細胞増殖を抑制していることが示唆される。

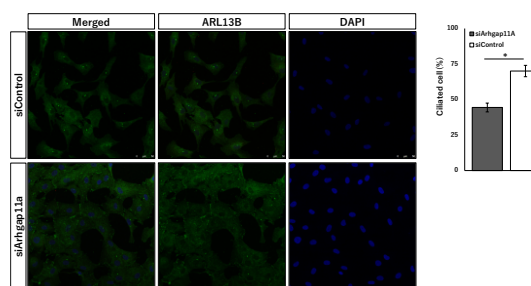


図 3. ARHGAP11A の KD により 1 次繊毛の数が減少した

これら (1)~(5) の研究成果により ARHGAP11A は細胞外の硬さを感知し YAP を抑制することで、細胞増殖を抑える、新規メカノトランスデューサー分子であることが示唆される。また、ARHGAP11A は 1 次繊毛形成促進にも関与している。1 次繊毛は水流の機械刺激に応答することは報告されているが、細胞外基質の硬さと 1 次繊毛を報告した例はこれまでにない。一部のがん細胞では 1 次繊毛が減少していることが報告されている。さらに、がん組織が周辺組織に比べ硬くなることは周知の事実である。これらのことから、YAP-ARHGAP11A の破綻が、がん細胞において 1 次繊毛を介した細胞増殖抑制を阻害し、がんの悪性化に寄与している可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳永雅之
2. 発表標題 YAP-メカノホメオスターシスによる脳構築の場と発生時計連携メカニズムの解明
3. 学会等名 脳構築における発生時計と場の連携 第5回領域班会議
4. 発表年 2020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
---------	---------