

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500417

研究課題名(和文) 神経前駆細胞の細胞弾性変動を介する神経発生制御機構

研究課題名(英文) Regulation of neurogenesis by the shift in stiffness of neural progenitor cells

## 研究代表者

小曾戸 陽一 (Kosodo, Yoichi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50425625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経前駆細胞の弾性率変動を主体とするメカノトランスダクションの解明を通し、胎生期脳構築の新規的な制御モデルを導出することを大局的な研究目的としている。本研究の実施期間では、神経発生初期・中期・後期のマウス胎仔脳の弾性率を原子間力顕微鏡を用いて測定した。大脳皮質生組織スライスを作製し、生理的条件下で脳の各層の弾性率を測定したところ、その数値に時空間的な変動があることを見出した。本研究の成果は、専門研究分野において広く認知されている国際学術誌に投稿し、受理されるなど(Iwashita et al 2014, Development)、国際的に高い評価を得ている。

研究成果の概要(英文)：Here, we present a systematic strategy to evaluate the shift in stiffness in a developing tissue using the mouse embryonic cerebral cortex as an experimental model. We combined atomic force microscopy measurements of tissue and cellular stiffness with immunostaining using specific markers of neural differentiation to annotate the value of stiffness by the characteristic features of tissues and cells in the developing brain. We revealed that the stiffness of the ventricular and subventricular zones increases gradually throughout the developing stage. These results indicate that tissue stiffness cannot be solely determined by the stiffness of cells that constitute the tissue. Taken together, our method profiles the stiffness of living tissue and cells with defined characteristics and can therefore be utilized to further understand the role of stiffness as a physical factor for cell fate determination in the formation of the cerebral cortex and other tissues.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：メカノトランスダクション 神経発生 幹細胞 弾性率 原子間力顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中枢神経系神経細胞は、胎生期に神経前駆細胞から産生される。進化過程の脳サイズの発達にともなう、神経前駆細胞の種類が増加することが報告されている。高等哺乳動物の胎生期の脳では、3種の神経前駆細胞である①神経上皮細胞②Basal Progenitor細胞③outer ラジアルグリア(oRG)細胞が存在する。神経前駆細胞に特徴的に見られる細胞突起は、それぞれの細胞の未分化性に関連していると考えられている。細胞突起の伸長性は①～③の3種の神経前駆細胞では異なっているが、その形成メカニズムはほとんど明らかになっていない(Fietz & Huttner, 2011)。

私らにより、脊椎動物の中枢神経系の神経前駆細胞の細胞生物学的な特性が明らかになってきた(Kosodo et al, 2004 EMBO J; Kosodo et al, 2008 EMBO J)。とりわけ、「エレベーター運動」と呼ばれる細胞周期に連動した細胞核運動によって、胎生期神経上皮組織の構造的恒常性が維持されることが明らかとなった(Kosodo et al, 2011 EMBO J)。私はこの研究により、脳組織内における細胞運動が、細胞の混み合いという外因性の物理的効果により制御されていることを示した。今回の研究では、これまでに確立した胎生期の神経発生研究に必要とされる技術を活用し、神経産生細胞の神経分化過程におけるメカノトランスダクションの解析を通じた胎生期脳構築の制御システムについて解明していくことを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究において、以下の理由から私は、神経前駆細胞の神経分化過程における機械的刺激応答(メカノトランスダクション)に着目し、精査することを試みた。細胞形態を高分子弾性体の変形と巨視的に見なすことで、上

述した3種の神経前駆細胞の形態の違いが、内因及び外因性の応力に対する「変形のしやすさ」、すなわち「弾性率」の違いで生じていることが考えられる。また、コラーゲンゲル等を用いた培養により、細胞の外的環境の「弾性率」が低いほど、神経細胞産生が起こる傾向が報告されており(Saha et al, 2008; Banerjee et al, 2009)、細胞外の弾性率が神経前駆細胞の細胞増殖・神経分化の運命選択に影響を与えうることが示唆されている。神経前駆細胞は胎生期脳組織内で互いに密接していることから、コラーゲンゲルの様な足場が影響するというよりも、むしろ神経前駆細胞自身の弾性率が変動することによって他の細胞の外的環境の弾性率が影響を受け、細胞運命の調整が行われることを提案した。この仮説は、神経新生が短期間の間に加速度的に進行する胎生期脳形成システムに上手く合致する。

以上、本研究では、神経前駆細胞の弾性率変動を主体とするメカノトランスダクションの解明を通じ、胎生期脳構築の新規的な制御モデルを導出することを大局的な研究目的とした。

## 3. 研究の方法

上述の「細胞弾性」を通じた神経発生制御系の存在・意義を検証するため、本研究では、**まず**、神経前駆細胞が各種神経細胞へと分化していく遷移状態に応じた「細胞突起伸長の経時観察」及び「細胞弾性」の定量的測定を試みた。「研究背景」の項で挙げた通り、胎生期脳で神経新生が進行するにつれて、神経前駆細胞の未分化性の維持と関連している「伸長した細胞突起」が失われていく。細胞の突起伸長は、細胞を高分子弾性体と見なすことで弾性体の変形と考えられる。すなわち、神経前駆細胞が持つ「弾性率」は発生段階につれて変動し、その結果が細胞突起の伸長能

力の違いとして現れることを示唆している。この過程を精査するため、本研究では、“発生中脳組織の神経前駆細胞”について、「脳組織・細胞の弾性率」を測定した。なお、本解析には研究協力者として岩下美里（大学院生・川崎医科大学）が参加した。具体的な手順として、

(1) 神経前駆細胞が中枢神経系の神経細胞に至る過程で示す生細胞の形態変化を、適切な培養条件のもとで経時的に測定した。神経前駆細胞の分化段階の進行状態については、大脳皮質の神経分化段階に応じて発現する内在性レポーター蛍光蛋白質（神経前駆細胞に順次発現する Neurogenin2、Tbr2、および NeuroD の各プロモーター下流に GFP を配置）のシグナルを指標とした。さらに培養後に大脳皮質の各種神経細胞のマーカー分子に対する抗体を用いた免疫染色を行い、神経前駆細胞の経時的形態変化量と神経細胞種の相関について検討することで、大脳皮質の神経細胞種の決定に前駆細胞の細胞突起の遷移が関連する可能性を解析した。

(2) (1) における細胞形態変化量の測定と合わせ、組織・細胞が持つ固有の物理的特性である弾性率の計測を行った。生組織・生細胞の弾性率の測定については、液中バイオ原子間力顕微鏡を用い、37°C・培養液中で行った(図1)。

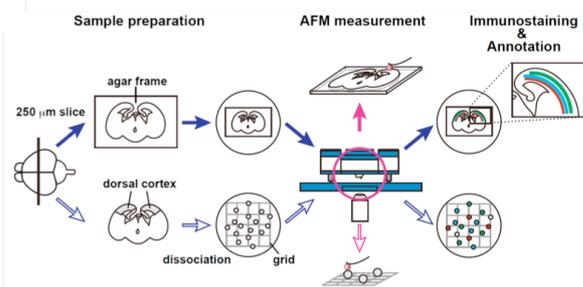


図1 原子間力顕微鏡 (AFM) による組織形成時の弾性率変動の解析システム

(上段) 生組織スライス

(下段) 同組織由来の細胞

それぞれ、弾性率測定後に分化マーカーを用いた染色を行い、組織および細胞種を確定できる。

(1) と同様に、材料として、発生各ステージの胎生期脳由来の神経前駆細胞を用い、原子間力顕微鏡の蛍光像同時観察機構を活用して、内在性レポーター蛍光蛋白質 (Neurogenin2-、Tbr2-、および NeuroD-GFP) の発現により前駆細胞の分化状態を同定した。得られた細胞弾性について、(1) で得られる細胞の形態変化量との対応について解析を行い、神経前駆細胞の増殖・神経分化に連れて生じる弾性率の変動について評価した。

#### 4. 研究成果

私の研究室では、大脳皮質生組織スライスを作製し、生理的条件下で原子間力顕微鏡を用いて神経発生初期・中期・後期のマウス胎仔脳の弾性率について、測定を行った。脳組織は、発生の過程において層構造を構築する。本研究では、組織各層の弾性率を求めるため、原子間力顕微鏡による測定後に抗体染色を行い、計測した各組織を特定した。同時に、各組織由来の細胞について、一細胞レベルでの弾性率を測定した。その結果、細胞レベルでの弾性率変動と、組織弾性率の変動は、必ずしも関連しないことが明らかとなった。このことは、細胞成分以外に、組織の弾性率を決定する因子が存在することを示すものである。

本測定系の確立、またその結果については、研究成果を専門研究分野において広く認知されている国際学術誌に投稿し、受理された (Iwashita et al 2014, Development)。本研究は、世界で初めて発生期体組織の弾性率の時空間変動を系統的に精査した論文として、当該掲載誌にハイライト記事が掲載されるなど、その新規性・独創性に高い評価を受けている。

## 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 4 件)

(Corresponding author であるものに○、すべて査読あり)

- 1) ○Iwashita M, Kataoka N, Toida K, and Kosodo Y. (2014) Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain. *Development*, 141:3793-98, doi: 10.1242/dev.109637. (および特集記事).
- 2) ○Nagashima F, Suzuki IK, Shitamukai A, Sakaguchi H, Iwashita M, Kobayashi T, Tone S, Toida K, Vanderhaeghen P, and Kosodo Y\*. (2014) Novel and robust transplantation reveals the acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 23:2129-42, doi: 10.1089/scd.2013.0251. (表紙)
- 3) Kawauchi T, Shikanai M and Kosodo Y. The extra-cell cycle regulatory functions of CDK proteins and CDK inhibitors contribute to brain development and neurological disorders. (2013) *Gene Cells*. 18: 176-194, doi: 10.1111/gtc.12029.
- 4) ○ Kosodo Y. Interkinetic nuclear migration: beyond a hallmark of neurogenesis. (2012) *Cell Mol Lif Sci*. 69: 2727-2738 doi: 10.1007/s00018-012-0952-2.

[学会発表] (計 8 件)

国内学会

1) 2013年10月28日 第51回日本生物物理学会 (京都・国立京都国際会館)

岩下美里、樋田 一徳、小曾戸陽一

「Spatiotemporal measurement of cell and tissue elasticity during brain development」

2) 2013年5月30日 第46回日本発生生物学会 (松江・くにびきメッセ)

長島史明、小曾戸陽一

「胚性幹細胞から誘導された神経前駆細胞は、胎生期脳の上皮極性に従い細胞突起を形成する」

3) 2013年3月30日 第118回日本解剖学会総会 (香川・香川国際会議場)

岩下美里、樋田 一徳、小曾戸陽一

「神経上皮組織の弾性率変動に基づいた大脳皮質形成機構」

国際学会

4) 2014年11月17日 The 62nd NIBB conference Force in development (岡崎・岡崎コンファレンスセンター)

岩下美里、片岡則之、小曾戸陽一

“Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain”

5) 2014年7月11日 The 5th international congress on stem cells and tissue formation (Dresden・Center for Regenerative Therapy Dresden, ドイツ)

岩下美里、片岡則之、樋田一徳、小曾戸陽一

“Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain”

6) 2014年7月10日 The 5th international congress on stem cells and tissue formation (Dresden・Center for Regenerative Therapy Dresden, ドイツ)

小曾戸陽一

“Novel and robust transplantation reveals the acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent cells”

7) 2014年7月8日 GSCN Satellite Symposium: Neural Stem Cells in Evolution (Dresden・Center for Regenerative Therapy Dresden, ドイツ)

小曾戸陽一

“Systematic profiling of the physical environment in the developing brain”

8) 2014年5月22日 International symposium on mechanobiology (岡山・岡山大学)

岩下美里、片岡則之、樋田一徳、小曾戸陽一

“Systematic profiling of spatiotemporal tissue and cellular stiffness in the developing brain”

[図書] (計 1 件)

1) Alexandra P, Clarke JDW, and **Kosodo Y.** (2014) Asymmetric cell divisions and nuclear migrations of neural progenitors: Two mechanisms that influence neurogenesis. In: Calegari F. and Wascow C. (eds.) “*Stem Cells*”. Vol 1. 23-52, Science Publishers.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/anatomy/Anatomy/Kosodo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小曾戸 陽一 (KOSODO YOICHI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 50425625

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :