

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08135

研究課題名(和文) 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子が脳組織形成に及ぼす作用の発生工学的解析

研究課題名(英文) The effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor on histogenesis of the brain of mouse embryos

研究代表者

松本 暁洋 (Matsumoto, Akihiro)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：70346378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF)の生体内における脳組織発生におよぼす影響を解明すべく研究を行った。胎齢13日のマウス胎仔大脳の側脳室にGM-CSFを注入し、2日後の脳組織を解析した。結果、大脳の内側基底核隆起の脳室面に配列不整な細胞群が形成され、細胞群は神経幹細胞から神経前駆細胞へと分化を始めた細胞が移動できずに脳室表面側に蓄積されたものと考えられた。従って、過剰GM-CSFが神経幹細胞の増殖・分化・移動に部位特異的に影響し、脳の組織形成に異常をきたすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) is a multifunctional cytokine. In this study, we examined the effect of exogenously added GM-CSF in the brain development of mouse embryos. We injected GM-CSF into the lateral ventricle of embryos on embryonic day (E) 13 and let them develop until E15 by exo utero development system. From histological analysis, a part of luminal surface of ganglionic eminence became irregular and formed 'bulge' by disarrangement of the neuroepithelial cells in the GM-CSF-injected brain. These irregular cells were the neuronal precursor cells which lost proliferative activity and the apico-basal cell polarity. These results suggest that excess GM-CSF in cerebrospinal fluid may affect proliferation of neuroepithelial cells, migration of post-mitotic neuronal precursor cells, and disturb the apico-basal cell polarity at the luminal side of the ganglionic eminence of mouse embryonic brain.

研究分野：発生生物学

キーワード：脳・神経 発生・分化 GM-CSF サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1)近年の研究報告により、いくつかの造血系サイトカインが神経幹細胞の増殖・分化にも作用していることがわかってきた。なかでも顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF) については、神経系の幹細胞や前駆細胞の増殖・分化にも機能することが主に培養系を用いた (*in vitro*) の研究で報告されてきている (Metcalf D, *Nature* 339: 27-30, 1989; Gasson JC, *Blood* 77: 1131-1145, 1991; Kim JK et al., *Neuroreport* 15: 2161-2165, 2004; Krüger C et al., *BMC Neuroscience* 8: 88 (1-7), 2007)。しかし、胎生期の生体内 (*in vivo*) の脳組織形成における GM-CSF の機能についてはまだ不明な点が多い。

(2)当研究室では、「子宮外発生法」というマウス胎仔手術を用いた実験手法を確立し、これまでに妊娠中期のマウス胎仔に、局所的な薬剤や生理活性物質の投与 (Hatta T et al., *J Neurosci* 22: 5516-5524, 20002; Udagawa J et al., *Congenit Anom* 47: 77-83, 2007)、ホルモン産生細胞の移植 (Kawamoto M et al., *Congenit Anom* 51: 62-69, 2011)、顎関節の結紮による運動制限 (Jahan E et al., *Arch Oral Biol* 59: 1108-1118, 2014) などの処置を行い、母体内で胎盤を介した栄養を受けてマウス胎仔の発生を継続したのち、処置によって生じた変化を解析してきた (実験手法の詳細については、「3. 研究の方法」参照)。

(3)これまでに我々は胎生期におけるマウス胎仔血清、脳脊髄液および羊水中の GM-CSF の推移を明らかにして、脳組織形成に重要な胎生中期において脳脊髄液中の GM-CSF が増加することを報告した (Matsumoto A et al., *Congenit Anom* 51: 183-186, 2011)。また、予備実験により、マウス胎仔の大脳発生過程において神経上皮が活発に増殖する時期である胎齢 13 日から胎齢 15 日にかけての脳組織における GM-CSF および GM-CSF 受容体の発現を免疫組織化学的手法により確認した。

## 2. 研究の目的

当研究室で確立した子宮外発生法を用いて、マウス胎仔の脳 (側脳室) に、脳組織の発生が活発に起こる妊娠中期にサイトカイン GM-CSF の局所注入を行うことにより、胎生期の生体内 (*in vivo*) の脳組織形成に GM-CSF がどのような影響をおよぼすのかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)子宮外発生法を用いた GM-CSF の胎仔脳への局所注入実験

所属機関の動物実験施設において、国の定める実験動物取扱いの指針に従い適切に飼育されている実験用マウスを用い、雌雄を交

配させ、受精後 (胎齢) 13 日目まで飼育する。

胎齢 13 日の妊娠マウスに対して、深麻酔下で開腹手術を行う。この際、母マウスの子宮の筋層のみを切開すると、透明な胎膜越しに胎仔の全身が観察できる。

先端の直径が 50 マイクロメートル程度のガラス製マイクロピペットを作製し、このマイクロピペットを用いてマウス胎仔の脳 (側脳室) にマウス胎仔 1 個体あたり 10 ng (1  $\mu$ l の生理食塩水を溶媒とする) を注入する。

注入を行わなかった一部の胎仔を注入時の対照群として摘出した後、マウス胎仔を母マウスの腹腔内に戻し、切開していた腹壁を縫合する。皮膚切開創部分はマウス手術用ステープラーで留める。

母マウスが麻酔から覚めたら、再び専用の飼育室にて飼育を継続する。このとき、母マウスの腹腔内では、胎仔が胎盤を介した栄養を受け、発生を継続できることが本実験方法の利点である。

本研究においては、マウス胎仔への GM-CSF 注入手術の 2 日後 (胎齢 15 日) に、マウス胎仔を採材し、脳組織の解析を行った。

(2)得られたマウス胎仔脳組織の解析方法  
マウス胎仔脳の薄切切片を作製し組織形態学および免疫組織化学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1)組織形態学的変化の解析結果

胎齢 13 日に胎仔脳 (側脳室) への GM-CSF 局所注入と子宮外発生法を組み合わせた発生工学的実験を行い、胎齢 15 日に採材した脳を組織形態学的に観察した結果、大脳皮質には特に変化を認めなかった。一方で、大脳の内側基底核隆起と呼ばれる部位に局限して細胞配列不整な細胞群の形成および側脳室の内腔側への突出が観察された (図 1)。

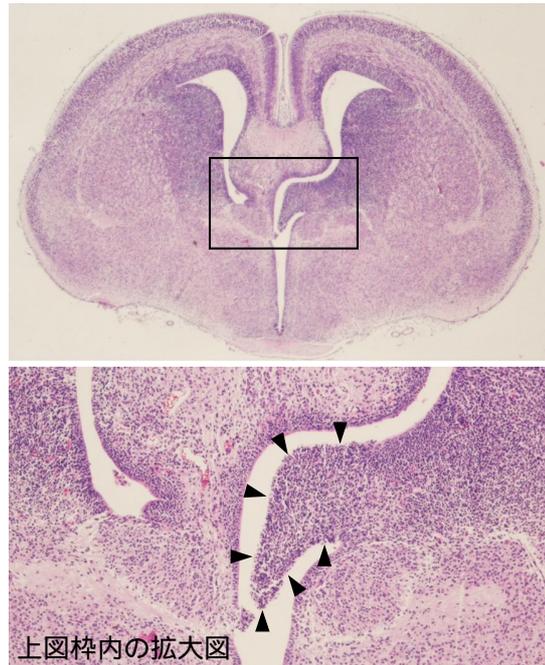


図 1 細胞配列不整な細胞群の形成 (HE 染色)

## (2)免疫組織化学的解析結果

GM-CSF および GM-CSF 受容体の発現  
採材した脳組織切片においては、全体的に GM-CSF および GM-CSF 受容体の発現を認めたが、どちらもやや脳室表面側における発現がより強い傾向がみられた。また、図1で示したような細胞配列不正な細胞群の部位においても GM-CSF および GM-CSF 受容体の発現傾向は同様であった。

### 細胞増殖能の解析

図1で示したような細胞配列不正な細胞群の性状を調べるために、神経幹細胞の増殖に関して核酸の類似体である 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)投与後の DNA への取り込み能の解析を行った。正常では脳室表面に近い脳室帯と呼ばれる領域において神経幹細胞が interkinetic nuclear migration (INM)(後述)により増殖するため、BrdU 取り込み細胞が多く観察される。本研究における実験群においては、組織構造が保たれている部位については、脳室帯の細胞の多くが BrdU 取り込み陽性であったが、図1で示したような細胞配列不正な細胞群においては脳室表面に面しているにもかかわらず BrdU 取り込み陽性細胞がほとんど認められなかった。したがって、これら細胞配列不正な細胞群は増殖能を失っていると考えられた。

### 神経前駆細胞の解析

正常な脳組織の発生過程においては、脳室帯で増殖を行い終えた細胞が神経前駆細胞となり脳室帯を離れていき、その多くが神経細胞(ニューロン)に分化する。そのため、図1で示したような細胞配列不正な細胞群の増殖能が低下していることから、この細胞群が神経前駆細胞に分化を始めている可能性を考え、Doublecortin (DCX; 細胞分裂を終えた神経前駆細胞および未分化なニューロンの微小管結合タンパク)陽性細胞の発現分布について検討を行った。結果、図1で示したような細胞配列不正な細胞群の多くが DCX を発現しており、神経前駆細胞の性質を持っていることが認められた。

### 細胞群の頂底極性の解析

正常な脳組織の発生過程においては、脳室帯の脳室表面側を頂表面、対側の髄膜側を基底面と呼び、その間を結ぶ方向の細胞軸に沿うように神経上皮細胞が並んでいる状態を頂底極性が保たれている、という。本研究の実験群においても組織構造が保たれている部分においては、組織形態学的にも頂底極性が保たれているようであった。頂底極性の状態についてより厳密に解析するため、脳室表面に面する全上皮細胞が脳室表面側に突き出すように1本ずつもつ一次線毛の局在を調べた。手法としては、一次線毛を構成する細胞骨格タンパクの一種であるガンマ・チューブリンに対する抗体を用いて免疫蛍光染色を

行い観察・検討した。結果、組織構造が保たれている部位においては、脳室表面側に一次線毛の局在による発現が見られたが、図1で示したような細胞配列不正な細胞群においてはガンマ・チューブリンの発現が不規則で、脳室表面側に出ている例が稀な状態であった。

上記の複数の免疫組織学的解析の結果から、図1で示したような細胞配列不正な細胞群は、細胞増殖を終えて神経前駆細胞へと分化を始めた細胞が、本来脳室表面から離れていくはずが、頂底極性の乱れとともに細胞移動が妨げられ、脳室表面側にとどまってしまう、脳室内へと突出するような組織像を呈したと考えられた。

## (3)研究成果のまとめ

本研究において、GM-CSF を胎齢 13 日のマウス脳(側脳室内)に注入し、母体内で2日間発生を継続した結果、大脳組織のうちの内側基底核隆起に限局して細胞配列不整な細胞群の形成および側脳室の内腔側への突出が観察された。この細胞群の性質としては、増殖能を失い、神経前駆細胞へと分化を開始した細胞が脳室表面側から基底側への移動が妨げられたために脳室表面側に貯留してしまい、突出するかのような形態をとったものと考えられた。細胞移動が妨げられた原因までは解明できなかったが、一次線毛の局在を観察することにより、この細胞群においては、脳(神経管)を含めた上皮管腔組織における頂底極性に乱れが生じていることが確認された。

我々の研究室では、脳(神経管)に加えて、消化管、尿管などの上皮管腔構造を有する組織発生における INM という現象について研究を進めている。

INM とは、もともと神経管(将来の脳・脊髄)の発生過程において発見された幹細胞の増殖・分化調節機構である。具体的には、発生段階における頂底極性をもつ偽重層上皮において、細胞周期に伴い細胞核が頂底軸に沿って移動し、頂表面側で細胞分裂(増殖)を行い、その後細胞核が基底側へ移動し、細胞核が基底側にあるときに細胞は DNA 合成期に入り、再び細胞核が頂表面側に移動し細胞分裂を行う、といったことを繰り返すことで効率よく幹細胞を増やす現象のことである。

これまでの我々の研究室における研究で、消化管のうちの食道において、一次線毛を内腔表面側にもつ偽重層上皮が、発生過程の中で一次線毛の配置の乱れを含む頂底極性の乱れを生じ、その後に重層扁平上皮へと分化する様子を確認している(発表論文 参照)。

以上のことから、本研究において観察された GM-CSF 注入マウス胎仔脳において観察された部位特異的な組織変化は、上皮管腔組織における頂底極性の乱れから神経幹細胞の増殖および神経前駆細胞の移動が妨げられた

結果生じた、すなわち GM-CSF によるシグナルが脳の組織形成において部位特異的に幹細胞の極性制御を介した増殖・分化・移動調節に関わる可能性が示唆された。

#### 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)

Interkinetic nuclear migration in the tracheal and esophageal epithelia of the mouse embryo: Possible implications for tracheo-esophageal anomalies.

Kaneda R, Saeki Y, Getachew D, Matsumoto A, Furuya M, Ogawa N, Motoya T, Rafiq AM, Jahan E, Udagawa J, Hashimoto R, Otani H

*Congenit Anom* 58: 62-70, 2018. 査読有 doi: 10.1111/cga.12241

Spatiotemporal difference in the mode of interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic intestinal epithelium.

Nitta T, Ogawa N, Getachew D, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H

*Shimane J Med Sci* 33: 79-85, 2017.

査読有

Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium: Possible implication for congenital anomalies of the kidney and urinary tract.

Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H

*Congenit Anom* 56: 127-134, 2016.

査読有 doi: 10.1111/cga.12150

[学会発表](計18件)

大谷 浩、松本 暁洋、小川 典子、Rafiq AM、Regassa DG

“上皮幹細胞の増殖分化調節機構 interkinetic nuclear migration の上皮管腔臓器の器官・組織形成における役割”  
日本解剖学会第72回中国・四国支部学術集会、広島大学霞キャンパス 広仁会館 (広島県広島市) 2017年10月28日~29日

松本 暁洋、Regassa DG、古屋 智英、小川 典子、佐藤 文夫、橋本 龍樹、八田 稔久、大谷 浩

“顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子のマウス胎仔脳組織形成における作用の解析”

第57回日本先天異常学会学術集会・第6回日本 DOHaD 学会学術集会、早稲田大学理工学術院 西早稲田キャンパス(東京都新宿区) 2017年8月26日~8月28日

Regassa DG、兼田 稜、佐伯 祐子、松本 暁洋、大谷 浩

“Morphologic changes in cytoskeletal and cell adhesion apparatus during the conversion of pseudostratified columnar to stratified squamous epithelium in the developing mouse esophagus”

第57回日本先天異常学会学術集会・第6回日本 DOHaD 学会学術集会、早稲田大学理工学術院 西早稲田キャンパス(東京都新宿区) 2017年8月26日~8月28日

大谷 浩、新田 哲哉、小川 典子、兼田 稜、佐伯 祐子、Rafiq AM、Jahan E、Regassa DG、古屋 智英、松本 暁洋、宇田川 潤、八田 稔久

“Interkinetic nuclear migration in the developing esophageal, tracheal, and intestinal epithelia”

第122回日本解剖学会全国学術集会、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市) 2017年3月28日~3月30日

松本 暁洋、古屋 智英、小川 典子、佐藤 文夫、橋本 龍樹、八田 稔久、大谷 浩

“マウス胎仔脳組織形成における顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の作用の解析”

第56回日本先天異常学会学術集会、姫路商工会議所(兵庫県姫路市) 2016年7月28日~7月30日

大谷 浩、元矢 知志、小川 典子、新田 哲哉、Rafiq AM、Jahan E、兼田 稜、古屋 智英、松本 暁洋、宇田川 潤、八田 稔久

“Interkinetic nuclear migration in the developing endoderm- and mesoderm-origin epithelial tubular structures”

第121回日本解剖学会全国学術集会、ビッグパレット福島(福島県郡山市) 2016年3月28日~3月30日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松本 暁洋 (MATSUMOTO, Akihiro)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 70346378

##### (2) 研究分担者

大谷 浩 (OTANI, Hiroki)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 20160533