

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18953

研究課題名(和文) 神経上皮偽重層化構造の維持機構

研究課題名(英文) Mechanism for the maintenance of pseudostratified neuroepithelium

研究代表者

篠田 友靖 (Shinoda, Tomoyasu)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80505652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経組織の発生時に認められる神経上皮は、細長い神経系前駆細胞が束なりつつ細胞体が細胞周期に応じて動くという極めて動的な上皮組織である。本研究では何故このような動的構造が成立しうるのかを調べた。これまでにない高時間・空間分解能の全細胞動態観察によって大脳原基の脳室面に存在する応力を推定し、数理シミュレーションおよび実験的に検証した結果、ある細胞周期の前駆細胞の動きがその周囲の前駆細胞の変形・復元する力を巧みに利用していることが明らかとなった。この結果は、神経上皮という構造自体がその経時的維持に重要な役割をはたしていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Neuroepithelium is widely observed in developing central nervous systems including cerebral cortex. Neural progenitor cells in neuroepithelium show cell cycle-dependent somatic motion called interkinetic nuclear migration (INM) in apico-basal direction. The purpose of this study is to elucidate how neuroepithelium keep its pseudostratified structure over time in spite of every cell shows INM. We hypothesized stresses in neuroepithelium by in toto time-lapse observation of all nuclei in developing cerebral cortex. Mathematical simulations and in vivo experiments revealed that newborn G1-phase cells in subapical area utilize the restoring force of its surrounding cells for their basal-directed nucleokinesis. These results suggest that the physical properties arised from the neuroepithelial structure assist the displacement of somata/nuclei in subapical area to sustain the pseudostratification.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経発生 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の中樞神経系組織の発生では、神経系前駆細胞（以下、前駆細胞と記す）からなる上皮構造組織が神経細胞産生の「場」として重要な役割を果たしていることが良く知られている。個々の前駆細胞は髄膜側をBasal側、脳室面側をApical側とした細胞極性を持ち、Apical面で周囲の細胞とadherens junctionを形成することで上皮構造を形成している。また前駆細胞は胞周期と連動した核運動(Interkinetic Nuclear Migration, INM)を行う。すなわち細胞体/細胞核は、S期は脳室帯Basal側領域で過ごし、G2期に脳室面側へ移動し、脳室面に隣接した場所で細胞分裂し娘細胞ペアを生み出す。誕生した娘細胞は髄膜方向への核運動を経て、あるものは親細胞と同様の前駆細胞となり、またあるものはG0期に入り神経細胞やグリア細胞に分化する。つまり脳室帯には細胞周期、すなわち細胞核の位置が異なる細長い細胞が高密度で「詰め込まれた」ように配置していることになり、これは偽重層化構造と呼ばれる。しかし、前駆細胞集団がどのようにして経時的に偽重層化構造を成立させているかは不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では前述の問いに答えを得ることを目的とし、そのために以下のような新しい観点から検証を行った。

(1) 前駆細胞集団の動きを正確に捉える

これまで行われてきた研究は、単一もしくは散発的に前駆細胞を可視化し、その細胞の動態を記述するものであった。この方法では、細胞が隙間無く詰め込まれた状態で生じる細胞同士の物理相互作用、言い換えれば「押したり、押されたり」を観測することはほぼ不可能であった。そこで本研究では神経上皮を構成するすべての前駆細胞集団の細胞体/細胞核を可視化・経時測定し、細胞間の物理相互作用の実体を捉えることを試みた。これには長時間培養下で組織を維持しつつ、優れた時間・空間分解能で観察を行える実験系の確立も含まれる。

(2) 偽重層化構造成立条件の検討

細胞集団がどのようにして一定の再現性のある組織構造を形成しうるのかは、発生学における重要な研究対象である。本研究では(1)にて見出された前駆細胞の集団動態の中の、どの要素が偽重層化構造維持に重要であるかを検証する。これは必然的に細胞間に働く力、および神経上皮組織に存在する力を変化させその結果を観測することになる。この際に従来の薬剤を使ったタンパク機能阻害や遺伝子導入法を用いた実験だけでは不十分である。なぜならばこれらの手法は細胞お

よび組織の特定の部分のみで力を変化させることに向かないからである。そこで本研究では、力を自由に加減できる数理シミュレーションを積極的に用い、真に偽重層化構造成立に必要な条件を見出すことを試みた。

3. 研究の方法

(1) Transgenic マウスと nipkow disc 共焦点顕微鏡を組み合わせた全細胞挙動観察

神経上皮を構成するすべての前駆細胞の細胞体/細胞核を経時観察するために、H2B-mCherry を全細胞で発現するTransgenic マウス(Abe et al, 2008)を用いた。このマウスでは間期細胞の細胞核および分裂期細胞の染色体を蛍光観察する事が可能である。このマウス胎仔の脳原基を、深部撮影能力に優れた nipkow disc 共焦点顕微鏡(Yokogawa CSU-X1)を中核としたシステムにて撮影することにより、個々の細胞核が十分に視認できる解像度での全細胞運動を記録し解析した。

これに加えて、細胞膜に取り込まれると蛍光特性を発揮する色素であるFM4-64を用い、リアルタイムに細胞体の変形、すなわち細胞に力が加わり変形する様子を細胞集団レベルで記録し解析した。

(2) 数理シミュレーション

すでにプロトタイプを作製していた「全細胞体/細胞核の動態モデル」に、観察から導き出されたパラメーターを導入し、安定して偽重層化構造を経時的に保てる状態を確立した。これを用いて、ある条件を加減した際のシミュレーションを行い、偽重層化構造成立条件の検討を行った。

(3) 単一細胞もしくは細胞集団に力を加えた際の細胞挙動観察

数理シミュレーションで導かれた仮説の実験的な証明として、神経上皮そのもの、もしくは分離培養した単一の前駆細胞に力を加え変形させ、その上で細胞体/細胞核の挙動変化を検証した。

①市販のシリコンストレッチチャンバーに脳原基辺を載せコラーゲンゲルで包埋し、チャンバーのジオメトリーを変化させることで神経上皮を一定の方向に変形させた。この状況での細胞体/細胞核の運動を(1)の観察系と組み合わせて解析した。

②レーザー焼却装置を用いて神経上皮の特定の部分に切れ目をいれることで、その領域に存在していた応力を解放し、それに伴う細胞体/細胞核運動の変化を(1)の観察系と組み合わせて解析した。

③神経上皮から前駆細胞をその細長い形状を保ったままプラスチック皿の上に移し

とり、その細胞体をガラスキャピラリー先端で直接押した。これは神経上皮中で生じていると想定される細胞同士の物理的相互作用を模したものであり、細胞体が押された場合にその細胞体/細胞核がどう動きうるかを記録した。

4. 研究成果

(1) 神経上皮の変形・復元を伴う新規の細胞体/細胞核動態の発見

前述した方法により、神経上皮を構成する全前駆細胞の核運動を可視化したところ、全く新規の細胞体動態が見出された。これまでの報告では、脳室面隣接域での細胞分裂により誕生した娘細胞は周囲の細胞体との物理相互作用の結果 basal 方向に立ち去ると考えられていた。ところが、培養下の大脳原基を FM4-64 で染色し細胞輪郭を可視化すると、脳室面隣接域の細胞体密度はその深部 (= basal 側) よりもむしろ低く、従来の説では説明できないことが明らかになった(図 1)。

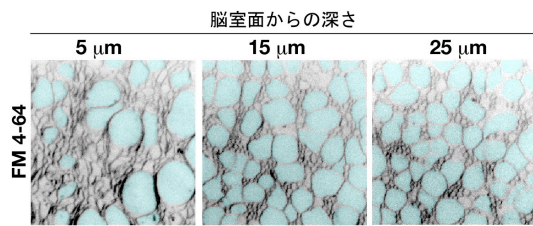


図 1 脳室面の近くは細胞体密度が低い。青色部分が細胞体の断面を、未着色の部分は前駆細胞の突起状の構造部を示す。

さらに経時観察結果を詳細に解析したところ、誕生直後の娘細胞は周囲の細胞体から「押され」ることなく basal 方向に核移動するケースが相次いで認められた。これらの結果から、脳室面近傍域の変形およびその復元力こそがこの核運動の原動力である可能性が示唆された(図 2)。

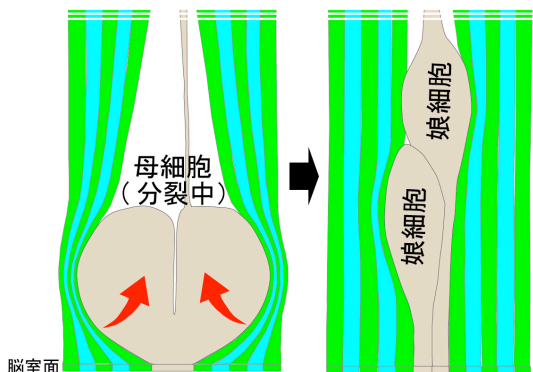


図 2 周囲の「変形・復元力」による娘細胞の核運動仮説

この仮説を証明するために、娘細胞もしくは母細胞の周囲の応力を変化させる実験を行った。シリコンストレッチチャンバーを用いて脳室面近傍域を圧縮変形させた状態を作り出したところ、娘細胞の basal 方向への

核移動は有意に速くなることが明らかになった(図 3)。

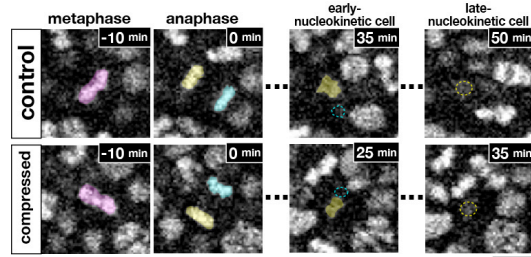


図 3 脳壁を圧縮変形させると娘細胞は素早く立ち去る

また、上記とは逆に娘細胞周辺の応力を取り除いた場合にどうなるかを調べるために、レーザーで娘細胞周囲の組織を破壊した。このレーザー焼却は娘細胞自体を破壊する事はなかったが、娘細胞の basal 方向への核運動はほぼ完全に抑制された(図 4)。

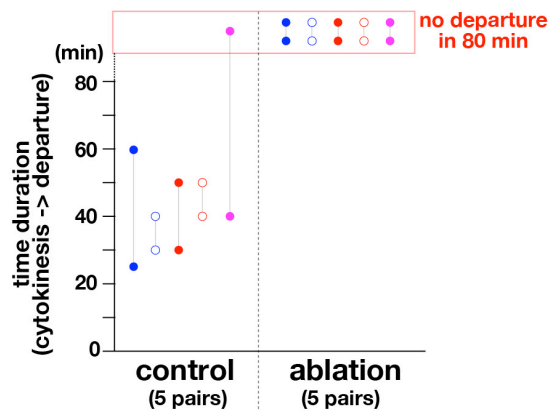


図 4 周囲の応力を取り去ると、娘細胞は立ち去る事が出来ない

さらに細胞体に外力が加わることで本当に核運動が生じうるかを調べるために、細長い形状を維持したまま前駆細胞をプラスチック皿に貼り付け、ガラスキャピラリーで細胞体を数マイクロメートル押し込んだ。その結果、細胞体/細胞核は押した方向と反対側に動くことが明らかになった(図 5)。

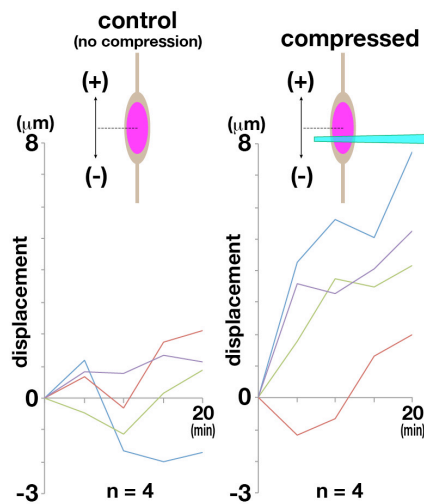


図 5 細胞体を外力で押しこむと、核移動を起こすことができる

これらの実験結果は、組織の弾性変形として娘細胞周囲に蓄えられた力こそが、娘細胞核運動の原動力であることを示している。

(2)娘細胞の細胞体/細胞核が脳室面隣接域を立ち去らないと、神経上皮構造自体が破綻する可能性がある。

(1)に記した娘細胞の立ち去りの意義を問うために、数理シミュレーションを行った。このモデルは個々の細胞体/細胞核を本研究および過去の研究に基づいて動かしており、脳室帯での細胞体/細胞核の集団的動態を再現することができるものである(図6)。

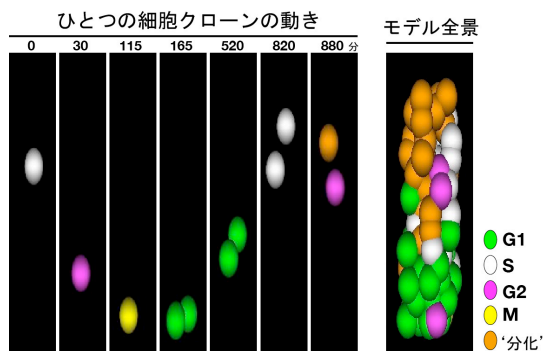


図6 細胞体 / 細胞核運動の数理モデル

このモデルを動かして、ある瞬間に娘細胞の「立ち去り」を失わせるシミュレーションを行った。その結果、脳室面隣接域で分裂・誕生した娘細胞は全く脳膜方向へ動くことができずその場に留まり続けた。言い換えれば、従来考えられていた「細胞体同士の押し合い」だけでは娘細胞は立ち去れないということである。また、これによって脳室面近傍域の細胞密度が急激に上昇し、脳室面近傍域の細胞体/細胞核の整然とした流れが失われた(図7)。

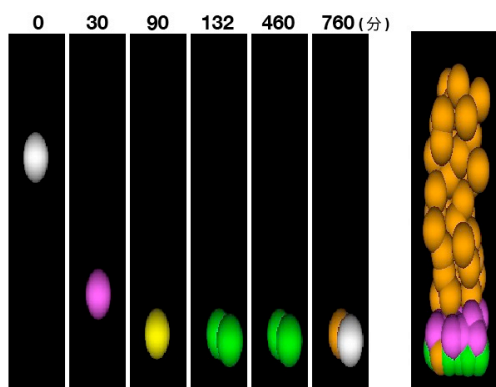


図7 娘細胞(緑)の「立ち去り」を除去したシミュレーション結果

これらの結果は、周囲の変形・復元力による娘細胞の細胞体/細胞核の脳膜方向への立ち去り、すなわち神経上皮という場における分裂期の細胞と間期の細胞の協調こそが、神経上皮の偽重層化構造が成立するための重要な要素であることを明確に示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

①Nagasaka A, Shinoda T, Kawae T, Suzuki M, Nagayama K, Matsumoto T, Ueno N, Kawaguchi A, Miyata T. Differences in the Mechanical Properties of the Developing Cerebral Cortical Proliferative Zone between Mice and Ferrets at both the Tissue and Single-Cell Levels. *Frontiers in Cell and developmental Biology* 4:139, 2016. doi: 10.3389/fcell.2016.00139., 査読有り

② Katsunuma S, Honda H, Shinoda T, Ishimoto Y, Miyata T, Kiyonari H, Abe T, Nibu K, Takai Y, Togashi H. Synergistic action of nectins and cadherins generates the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. *The Journal of Cell Biology* 212, 561-575, 2016. doi: 10.1083/jcb.201509020., 査読有り

[学会発表] (計4件)

①篠田友靖、大脳原基神経系前駆細胞で見出された新規の動的膜構造、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017年3月28日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

②篠田友靖、Novel mode of action for interkinetic nuclear migration., 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016年3月29日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

③ 篠田友靖、Novel Mechanism for Interkinetic nuclear migration of neural progenitor cell., 第38回日本神経科学大会、2015年7月28日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

④ 篠田友靖、Novel Mechanism for Interkinetic nuclear migration of neural progenitor cell., 第48回日本発生生物学会大会、2015年6月4日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)

[その他]

ホームページ等

<https://www.takaki-miyata-lab.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 友靖 (SHINODA, Tomoyasu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80505652

(2) 研究分担者

なし