

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08526

研究課題名(和文) 神経系の細胞分化・増殖に細胞外マトリックスが及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Study on influences of the extracellular matrix on the growth and differentiation of neuronal progenitor cells

研究代表者

八木 秀司 (Hideshi, Yagi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10303372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞を外部から支えている細胞外マトリックスは体内の組織の違いや成長により、その種類が変化している。細胞内のアクチン線維に結合する分子群は、細胞外マトリックスの影響を受けてアクチン線維の動態を通じて細胞の形態、機能の変化に関与している。細胞外マトリックスから細胞内にシグナルを伝える分子の動態をFILIP分子が調節し、細胞骨格を調節するROCK分子の阻害によりその調節が阻害される事が判明した。さらに、ROCK分子による阻害は細胞外マトリックスの違いにより異なっていた。また、神経系の幹細胞に相当する細胞に対する細胞外マトリックスの増殖促進効果を検討したが、細胞密度の影響の方が強い結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外マトリックスは細胞の動向を制御し、組織構築や組織修復に重要な役割を果たしている。細胞外マトリックスには機能や種類に多様性があり、全て理解できると発生過程における意義を明らかにでき、再生における幹細胞の動態を生体内で制御できる可能性を見いだせることができる。今回、細胞外マトリックスによる細胞内の移動や接着に関わる分子の動態変化を明らかにした。さらに研究を進めることで発生過程や再生における機構の一端を明らかにできる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular matrix alters according to the tissues and its development. The actin-binding proteins involved in cell morphology and cell migration have a role in the functional and morphological changes of the cells depend on the differences in the extracellular matrix. One molecule that localizes at the intracellular membrane site adhesion to the extracellular matrix, bound to FILIP, one of the actin-binding proteins, and decreased in the existence of FILIP. The inhibition of ROCK function blocked the decrease of this molecule under the existence of FILIP. The blockage effect altered depends on the difference in the extracellular matrix. The extracellular matrix did not influence the growth rate of the brain-derived cells that have stemness. The cell density is important for the growth rate of the cells.

研究分野：解剖学

キーワード：アクチン線維 細胞骨格 細胞外マトリックス 神経発生

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系の細胞は、胎生期の脳室帯にある神経幹細胞から構築される。つまり、中枢神経系は、脳室帯という環境をニッチとする神経幹細胞が、新たな神経細胞を生み出している。ニッチは、その内部に存在する幹細胞などの増殖、維持に働くことが知られている。ニッチを構成する要素の一つである細胞外マトリックスには、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどが存在する。これらのニッチを構成する細胞外マトリックスがニッチ内に存在する細胞群にシグナルを与える。そのシグナルが、神経幹細胞の維持、増殖に重要である(Gattazzo et al. *Biochim Biophys Acta* 1840, 2506, 2014)。また、ニッチ内で分化した細胞が目的の場所に移動するためには、細胞外マトリックスから離脱することが必要である。我々は、中枢神経系の発達及び神経細胞の機能に関わる形態調節に重要な役割を果たしている分子 FILIP の解析を行ってきた。FILIP 分子は、アクチン線維結合蛋白質の一つである filamin A の分解に関与し、脳室帯からの新生神経細胞移動に関わる分子である(Nagano et al. *Nat Cell Biol* 4, 495, 2002)。一方、神経細胞では、FILIP 分子は細胞移動や細胞形態に関わる非筋肉型ミオシン B と結合し、ミオシンとアクチンの結合を阻害する(Yagi et al. *Sci Rep* 4, 6353, 2014)。filamin A は神経幹細胞の増殖に関わるとの報告(Lian et al. *J Neurosci* 32, 7672, 2012)があり、細胞増殖、細胞移動の切り替えにこの FILIP 分子に関わるカスケードが重要ではないかと考えている。

また、近年、血管周皮細胞が幹細胞としての能力を有しているとの報告が増えている(Dore-Duffy et al. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 613, 2006; Feng et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6503, 2011)。脳内の血管周皮細胞は、血管内皮細胞の基底膜に接し、星状膠細胞の血管に対して伸ばした小足の基底膜にも接している。この星状膠細胞の分泌する細胞外マトリックスであるラミニン 211、ラミニン 111 が血管周皮細胞としての機能維持に重要な役割を果たしている(Yao et al. *Nat Commun* 5, 3413, 2014; Menezes et al. *J Neurosci* 34, 15260, 2014)。一方、血管内皮細胞から作られ、その基底膜に豊富に存在するラミニン 511 は、ES 細胞や iPS 細胞の培養時に分化抑制に働いている(Domogatskaya et al. *Stem Cells* 25, 2800, 2008; Miyazaki et al. *Nat Commun* 3, 1236, 2012)。

## 2. 研究の目的

中枢神経系は、神経幹細胞が増殖分化することで構築される。その神経幹細胞の分化増殖を調節する一端を幹細胞周囲の環境、ニッチが担っている。このニッチを構成する細胞外マトリックスが神経幹細胞の分化増殖に関わる可能性を見出した。神経幹細胞に対する細胞外マトリックスの関与、及び、それが関わる細胞内シグナルカスケードを明らかにし、細胞外環境を整えることで、神経幹細胞の増殖分化を制御する方法を見いだせる可能性があると考え、本研究を計画した。また、将来的な臨床応用を考え、成体の脳内に存在する新たな多能性を有する細胞に対し、この細胞外マトリックスを用いた増殖、分化の制御法を応用出来るかを検討する。

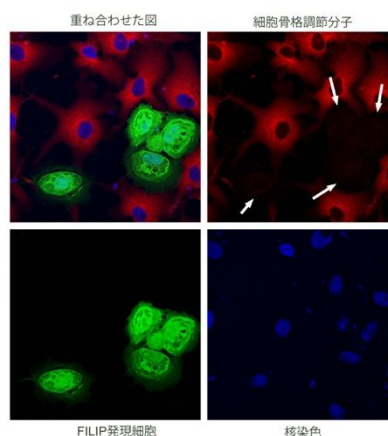
## 3. 研究の方法

(1) 細胞外マトリックスと細胞動態をつなぐ細胞内シグナルカスケードの解析を培養細胞を用いて行う。FILIP 分子が結合する分子の動向が細胞外マトリックスの違いによりどのように生じるかを検討した。また、神経系に発現する細胞外マトリックスの変化について免疫組織化学法により検討した。

(2) 脳虚血時に誘導される血管周皮細胞の分化および増殖に関わる細胞外マトリックスの関係について、細胞外マトリックスに結合する分子群の発現、および、多様な細胞外マトリックスを用いた時の増殖や分化の変化について検討した。

## 4. 研究成果

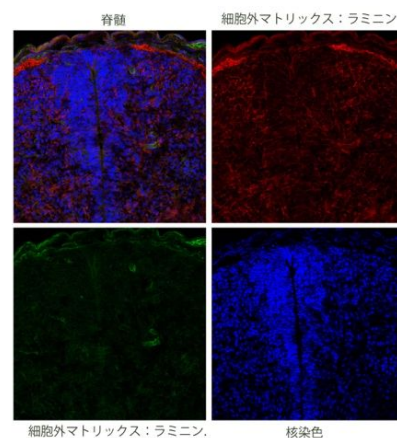
(1) 細胞外マトリックスと細胞動態をつなぐ細胞内シグナルカスケードの解析を行った。FILIP 分子による細胞内での filamin A の減少は以前に報告されていたが、その減少に関わる細胞内シグナル伝達系として細胞外マトリックスからのシグナル伝達に関わる small GTPase が関与しているか阻害剤を用いて検討した。その結果、Rac1 の阻害剤により FILIP 分子の影響による filamin A の減少が低下する可能性を見いだした。一方、細胞外マトリックスと結合するインテグリン等の細胞内ドメインと結合する別の細胞骨格調節分子が FILIP 分子の発現により減少することを見出した(右図参照)。この細胞骨格調節分子の減少の程度は細胞外マトリックスの違いにより変化する可能性を見出した。また、ROCK の阻害剤により、FILIP 分子による減少は阻害される可能性を見出した。FILIP 分子が



この細胞骨格調節分子に直接影響を与えるかを確認するため、免疫沈降法で検討したところ、この2つの分子は結合していることを見いだした。

細胞外マトリックスからのシグナル伝達に関わる small GTPase による影響が異なることから、どのような細胞外マトリックスが生体内で、これらの分子群の動態を調節しているかを明らかにすることを試みた。免疫組織化学法で発達期の中樞神経系での細胞外マトリックスの発現の変化を検討した。その結果、あるラミニンは幹細胞が多く存在する領域に少なく、神経細胞の移動や分化発達が起きている領域に多く存在することが判明した（右図参照）。

(2) 虚血周皮細胞の細胞外マトリックスとの関係では、虚血周皮細胞を異なる細胞外マトリックス上で培養し、幹細胞マーカーの発現の違いを検討した。あるマトリックスでは継代により1つの幹細胞マーカーの発現が減少したが、他のマトリックスではその幹細胞マーカーの発現は維持された。また、別のマトリックスでは継代とは関係なく、その幹細胞マーカーの発現は抑制された。細胞外マトリックスの違いにより発現するインテグリンの種類が変化する可能性を見いだした。しかしながら、細胞増殖については細胞外マトリックスの影響よりは細胞密度が大きく影響することを見いだした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yagi Hideshi, Sato Makoto
2. 発表標題 A novel in vivo role of the schizophrenia-related gene, FILIP
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society, The 13th World Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation CLEFT 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木秀司 佐藤真
2. 発表標題 Regulation of intra-spine distribution of myosin is associated with morphology of spine
3. 学会等名 第61回日本神経化学学会大会・第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minato Yusuke, Kuwahara-Otani Sachi, Maeda Seishi, Yagi Hideshi
2. 発表標題 Expression of Pdgfra transcripts in oligodendrocyte precursor cells
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
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
研究分担者	湊 雄介  (Minato Yusuke)  (00710245)	兵庫医科大学・医学部・助教    (34519)	

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
---------	---------