

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07223

研究課題名（和文）細胞膜動態に着目した神経系前駆細胞核運動の機構解明

研究課題名（英文）motion of neural progenitor cells by plasma membrane dynamics

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の脳は細胞でできた一層の「シート」が分厚くなっていくことにより形成される。このシートをつくっている細胞は神経系前駆細胞と呼ばれ、細胞分裂を繰り返して神経細胞を生み出すという重要な役割を持っている。本研究では、この神経系前駆細胞で作られたシートの「弾性」という物性をElastinというタンパクが担っていることを見出した。Elastinにより担保される脳の弾性は、脳の一番内側の部分における神経系前駆細胞の動きに欠かすことが出来ない役割を果たしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の発生は古くから研究者の興味の対象であり、膨大な研究がなされてきた分野である。しかしながら、脳に限らず生物の組織・器官自体が有する物性（たとえば柔らかいのか硬いのか）が、発生という現象に対していかなる役割を担っているのかはほとんど解っていなかった。本研究の成果は、脳が「程良い硬さ」を有することが、その発生に重要な役割を果たすことを示唆する点で重要な知見をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：Brain of vertebrata is developed from monolayer epithelial sheet. The epithelial sheet, which is called neuroepithelium, is composed of neural progenitor cells, which generate both progenitor cells and future neurons. I found that Elastin is responsible for the elasticity of the periventricular area of neuroepithelium. Moreover, the elasticity of periventricular area plays important role for the interkinetic nuclear migration of neural progenitor cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経細胞 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脳は巨大な器官であり、ほ乳類ともなればその形状・構造は一見かなり複雑に見える。しかし脳は神経系前駆細胞(以下、前駆細胞)が構成する「単層の上皮組織」という、単純な多細胞構造から造り出されることは知られていた。前駆細胞から生まれた神経細胞は脳原基の脳膜側に一方向的に送り出されて積み重なり、将来の脳壁の大部分を担う。一方、前駆細胞は上皮構造を維持しつつ、その核は脳室面側のある一定の幅の領域に存在することがわかっている。これは前駆細胞の核が細胞周期に応じてその位置を変化させることと深い関わりがある(図1)。この「細胞周期に応じた核の位置変化」こそが、脳原基という限られた空間にあらゆる細胞周期局面の前駆細胞を内包し、最大限の神経細胞生産能力を持たせる為の進化の帰結であり、このメカニズムを解明することこそが脳の発生を理解する上で極めて重要である。

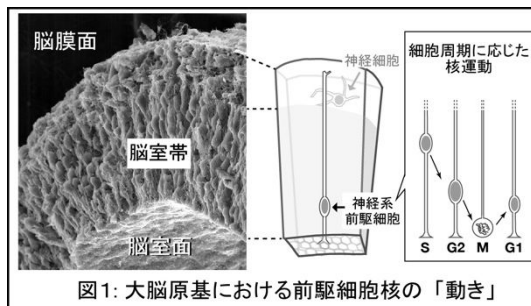


図1: 大脳原基における前駆細胞核の「動き」

2. 研究の目的

本研究では当初、「細胞周期に応じた核の位置変化」の鍵を握るのは前駆細胞の細胞膜の動体だと想定した。そして全く未知であった細胞膜動体の実態の把握、核の位置変化と細胞膜動体の関係性、および細胞膜動体の根底にあるメカニズムの解明を行うことで、極めて細い(核の直径の1/5~1/10)細胞体の中を核が行き来できているという謎を解明する予定であった。

ところが研究を進めるうちに、前駆細胞が上皮構造を形成した結果作られる「脳室面」の機械特性が elastin という細胞外タンパクにより担われており、この機械特性こそが前駆細胞の核運動の要であることが明らかになってきた。

3. 研究の方法

本研究では、脳室面近傍の機械特性とそれを担う未知のタンパクの同定、そしてそのタンパクがどのような機序で前駆細胞の核運動に寄与するのかを以下のような方法で検証した。

(1)脳室面近傍の機械特性を担うタンパクを同定した

脳壁は「脳室面側に巻く」という機械特性を持つことがすでに解っている。この性質は、前駆細胞同士が脳室面で接着結合を形成することにより脳室面が収縮力を持つことにより担われていると考えられていた(Shinoda et al., 2018)。本研究では脳室面の「外側」、すなわち前駆細胞の細胞外にも脳室面の収縮力を担う機構が存在すると想定し、各細胞外タンパクに特異的な分解酵素や阻害剤を培養化の脳壁に加えることで同定を試みた。

(2)そのタンパクが脳室面近傍のどのような機械特性に関与するかを調べた

(1)で同定したタンパクが脳室面近傍のどのような機械特性に関わるかを調べるために、そのタンパクを取り除いた状態の脳壁がどうなるのかを、これまでに私が確立した複数の手法によって検証した。

(3)脳壁の機械特性が変化した時に、前駆細胞の核運動はどうなるのか調べた

生きている細胞の細胞膜を特異的に染色する蛍光色素である FM4-64 を用いると、脳壁内部の前駆細胞の核運動をレーザー共焦点顕微鏡で観察することができる。この方法で脳室面近傍の機械特性を変化させた時の前駆細胞の核運動がどのように変化するかを調べる。これによって脳室面の機械特性と前駆細胞核運動の関係性を明らかにした。

4. 研究成果

(1)Elastin というタンパクが脳壁の機械特性に重要な役割を果たしていた

分解酵素や阻害剤によるスクリーニングの結果、Elastin というタンパクが脳室面に存在し、脳壁の脳室面近傍の機械特性に関与することが明らかになった。Elastin は繊維状の高次構造をもつタンパクで、生体内では他の架橋タンパクとの相互作用によって弾性繊維(Elastic fiber)という非常に太い繊維構造を細胞の外に作る事がすでに解っていた。マウス胎仔脳の免疫染色の結果、発生中の脳壁の脳室面近傍に Elastin タンパクが存在することが明らかになった(図2)。また Elastin は脳室面の外側に、あたかも脳室面を覆うように局在していることも明らかになった。興味深いことに弾性繊維を構成することが知られている他のタンパクは脳室面近傍には存在していなかった。したがって脳室面およびその近傍の Elastin は、おそらく弾性繊維ではない未知の構造をとって細胞外に存在することが示唆された。

次に Elastin が脳の機械特性に関与するかどうかを調べるために、Elastin の特異的分解酵素である Elastase を用いた実験をおこなった。マウス胎仔より切り出した脳壁を Elastase で処理したところ、脳壁の「20 分ほどかけて脳室面側に巻く」という性質が完全に抑制された(図 3)。この結果は、脳壁の「巻く」という機械特性が Elastin によって担われていることを示唆するものである。

脳壁の「巻く」という機械特性は、脳室面が「常に縮もうとしている」という特性を持つことに由来する (Shinoda et al., 2018)。したがってこの特性が Elastase 処理で失われたことが予想されたので、脳室面にフェムト秒パルスレーザーで「切れ目」を入れた時の脳室面の広がり方を調べた。この実験では、「切れ目」を入れた直後にそこからの広がり速度が大きければ大きいほど、「常に縮もうとしている」という力、すなわち収縮力が高いということがわかる。実験を行ったところ、Elastase 処理された脳は切断後の脳室面の広がりが遅い、すなわち脳室面の収縮力が小さくなっていることが明らかになった(図 4)。

脳室面の収縮力の低下は、脳室面の「かたさ」の低下をもたらすことがわかっている (Nagasaka et al., 2016)。生体組織の「かたさ」を定量的に調べる方法として、原子間力顕微鏡によって脳室面のヤング率 (= 弾性率、値が高ければ高いほど、「かたい」) を計測する方法がよく用いられている。Elastase で処理した脳壁の脳室面のヤング率で測定したところ、有意に低下していることがわかった(図 5)。

これらの結果は、脳室面の外側を含む脳室面近傍に存在する Elastin タンパクが脳壁の機械特性に重要な役割を果たすことを示唆している。

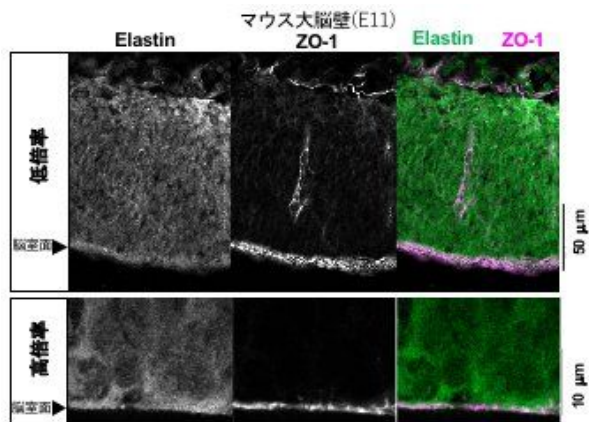


図 2 : Elastin タンパクが脳室面近傍を含む脳室に存在する

脳室面にフェムト秒パルスレーザーで「切れ目」を入れた時の脳室面の広がり方を調べた。この実験では、「切れ目」を入れた直後にそこからの広がり速度が大きければ大きいほど、「常に縮もうとしている」という力、すなわち収縮力が高いということがわかる。実験を行ったところ、Elastase 処理された脳は切断後の脳室面の広がりが遅い、すなわち脳室面の収縮力が小さくなっていることが明らかになった(図 4)。

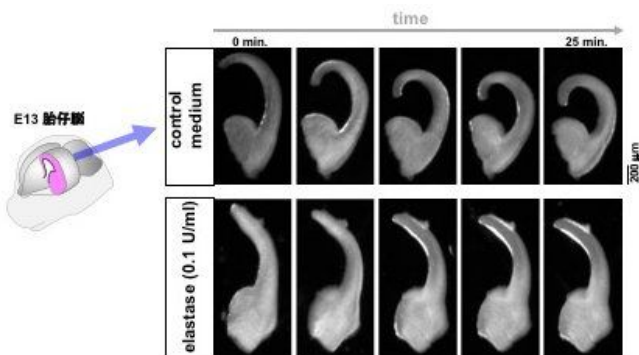


図 3 : Elastin は脳壁の「巻く」という機械特性に関与していた

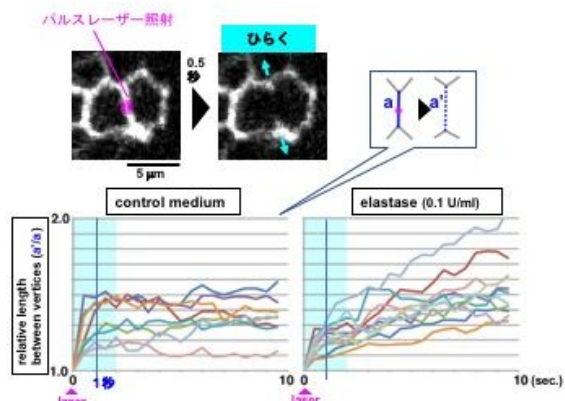


図 4 : Elastin は脳室面の収縮力を担っている

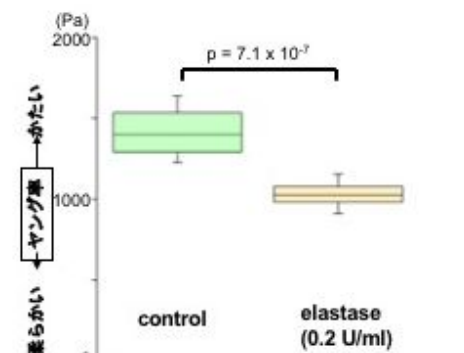


図 5 : Elastin は脳室面の「かたさ」を保つのに重要である

(2) Elastin が脳室面近傍での前駆細胞の核運動に関与していた

ここまでの研究結果から Elastin が脳壁、とくに脳室面とその近傍域の機械特性に深く関与することがわかった。では Elastin によって担われているこの機械特性は前駆細胞の「動き」、すなわち核運動にどのような役割をはたしているのだろうか。

これを調べるために、Elastase で処理した脳壁内部の前駆細胞の細胞膜を FM4-64 という蛍光色素で染色し、Nipkow disc レーザー共焦点顕微鏡を用いて生きた前駆細胞の核運動を観察した。脳室面近傍の脳壁には、分裂期の細胞体とその直前・直後の間期の細胞核が存在している(図 1)。ところが Elastase を含んだ培養液中で脳壁を 30 分間培養すると、脳室面近傍の分裂期の細胞体消失し、間期の細胞核のみが高密度で存在することが明らかになった。さらに興味深いことに、Elastase 処理によって脳室面が「緩んで」いることが ZO-1-EGFP トランスジェニックマウス脳を用いた実験によって判明した(図 6)。脳室面隣接域で前駆細胞の分裂により誕生した娘細胞は、脳室面の収縮性を巧みに利用して脳膜側に細胞核を動かすことがわかっている(Shinoda et al., 2018)。よってこの実験結果は、脳室面近傍の Elastin が除去されて脳室面の収縮力が

失われたことで、誕生直後の娘細胞の細胞核が脳膜方向に立ち去ることができなくなり、脳室面近傍域に溜まってしまったと解釈できる。これらの実験結果は、Elastin というタンパクが

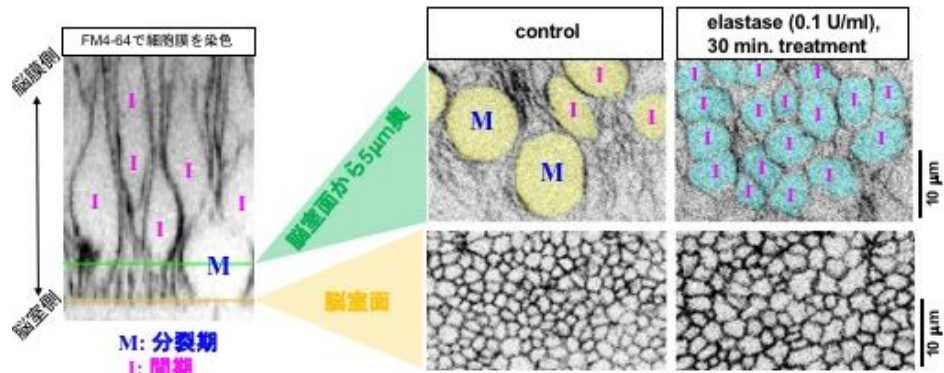


図6 : Elastinは脳室面近傍での前駆細胞の核運動に深く関与している

脳室面の機械特性を担保することによって前駆細胞の正常な核運動を担っていることを示唆している。

本研究結果は、脳壁の機械特性の担い手として細胞外に存在するタンパクの関与を示す初の研究成果である。

参考文献：

Shinoda T, Nagasaka A, Inoue Y, Higuchi R, Minami Y, Kato K, Suzuki M, Kondo T, Kawaue T, Saito K, Ueno N, Fukazawa Y, Nagayama M, Miura T, Adachi T, Miyata T. Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter. *PLoS Biol.* 2018 Apr 20;16(4):e2004426.

Nagasaka A, Shinoda T, Kawaue 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. *Front Cell Dev Biol.* 2016 Nov 25;4:139.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoyasu SHINODA |
| 2. 発表標題 Elastin controls the mechanical property of the subapical area of developing brain. |
| 3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoyasu Shinoda |
| 2. 発表標題 Elastin controls the mechanical property of the subapical area of developing brain. |
| 3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学大会、合同大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoyasu Shinoda |
| 2. 発表標題 Elasticity in the subapical area maintains neuroepithelial structure in mammalian developing cerebral cortex. |
| 3. 学会等名 第80回日本解剖学会中部支部学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 篠田友靖 |
| 2. 発表標題 発生期大脳の力学特性を担う新たな分子機構-脳室面近傍のElastinが必要な役割を果たしている??- |
| 3. 学会等名 第83回日本解剖学会中部支部学術集会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|