

コンパートメント境界形成モデルにおける細胞表面張力の の実測

[1] 組織

代表者：井上 高良

(国立研究開発法人 国立精神・神経医療
研究センター：以下 NCNP 神経研究所)

対応者：小椋 利彦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

浅見 淳子 (NCNP 神経研究所)

久保 純 (東北大学加齢医学研究所)

宮坂 恒太 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 25 万 2 千円，旅費 4 万 8 千円

[2] 研究経過

個体の加齢・発生・分化に関わる研究・開発は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、脊椎動物の脳・中枢神経系の発生過程できわめて重要な役割を果たすコンパートメントユニット (neuromeres：詳細は図 1 A 参照) の境界形成・維持メカニズムを独自のモデルシステムや実験系を駆使して明確にすることを目的として研究を行った (詳細は図 1 B 参照)。以下、研究活動状況の概要を記す。

研究代表者らはまず、マウス初期胚コンパートメントユニット間で異なる発現様式を示す細胞間接着分子カドヘリン (参考文献 1-3) に着目し、異なるカドヘリンサブクラスを発現する培養細胞を二次元で混和するだけでコンパートメント様境界が形成されることを見出している (論文未発表)。そこで本共同研究ではまず、この境界形成モデルをより脊椎動物生体の脳・神経系の状況へ近づけるため、すべての神経上皮細胞で発現している細胞間接着分子 N-cadherin を繊維芽細胞由来の L 細胞に安定導入した新規細胞株を樹立し、これら神経上皮様細胞への各種カドヘリン遺伝子導入を試みるとともに、それら多重カドヘリン導入細胞群を用いて二次元混和培養を行った際にコンパートメント様境界形成活性が認められるのか否かを確認する実験を計画した。

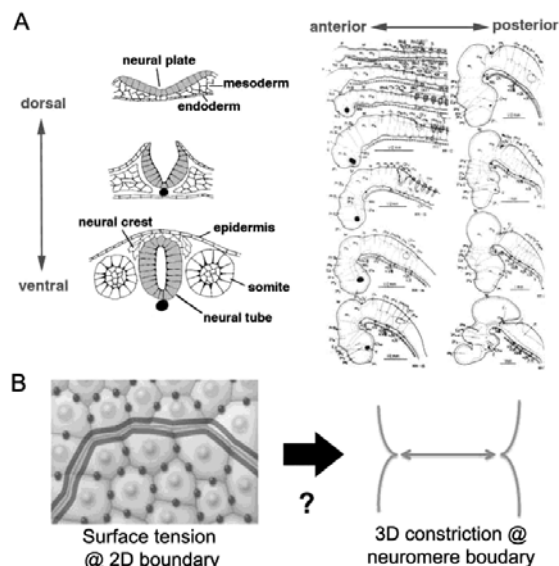


図1: A (左) 脊椎動物中枢神経系の発生は一層の細胞シートからなる神経板 neural plate が巻き上がって神経管 neural tube となってくびれ切れ、それが内部に陥入するところから始まる (時間的は図の上から下へ進行)。 (右) Hamburger・Hamilton によるニワトリ初期胚脳筋の発達様式 (時間的は図の左上から左下、そして右上から右下へ進行)。神経板/管には、前後軸に沿って順次『くびれ』が生じ、これらくびれを基点として神経管が精妙に折り畳まれることによって脳のプロトタイプ (右下) が創られる点に注目。これらくびれの變つかが互いに細胞が混和しないコンパートメントユニット neuromere の境界として定義できることがわかっている。 B (左) 研究代表者が構築した 2D 細胞シートモデルによると異なるカドヘリンサブクラスの発現境界部 (図の中央部) に太い 2 本のベルトで示したアクチン細胞骨格を基盤としたネットワークが形成され、これらが作用することで強い表面張力が生じるとともに、細胞同士の混和が制限され、コンパートメントユニットが産み出される可能性が示唆されている (研究代表者未発表データ)。 (右) 脊椎動物の中枢神経系発生過程で認められるコンパートメントユニット neuromere の境界部は必ずくびれており、これが神経管の折り畳みによってできる脳の 3D 形態表出の基盤となっている (A 右)。この『くびれ構造』が 2D 細胞シートモデルのコンパートメント境界部で認められる表面張力制御機序とどのような関係にあるのかを探るのが本研究の最終目標である。

また、もし新規構築モデルが生体と同等の境界形成活性を持つ場合、細胞表面張力が培養平面上においてどのような様式で分布するのかを実測する手法やそれらを生体の状況と対応させる様々な実験をデザインした。

以上の計画に際し、東北大学小椋研において事前および事後の研究打ち合わせを行い、どのような遺伝子群の導入が効率的なのか、またどのような手法が細胞表面張力測定に有効なのかを画策した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、新規モデル細胞株 (=cadherin::XFP double transfectants : 脊椎動物において神経上皮接着の基盤となっている N-cadherin をマウス繊維芽細胞由来L細胞株で安定発現させることで神経上皮細胞様に変化したクローンを単離し、そこへ tet-ON 誘導ベクター系を用いて各種カドヘリン/蛍光分子の同時発現を可能とした細胞株群) の樹立に成功し、これらを二次元で混和培養すれば強固なコンパートメント様境界が形成されること、およびその境界形成ダイナミクスは ROCK 阻害剤添加によって完全に抑えられること、すなわちカドヘリンを基盤としたアクチン骨格系の動態制御がコンパートメント境界形成に必須であることを確認した。

第2に、最新式の SONY イメージングシステム SI8000 を用いて上記細胞株を混和・二次元培養した際に形成される境界部位をリアルタイム計測し、境界部と非境界領域の細胞微細動態を比較すると、前者のほうがより小さな速度で細胞膜ダイナミクスを変化させる傾向にあることを見出した。

さらには細胞表面張力の実測にむけてマイクロパーティクルをコンパートメント境界形成モデルに効率良く導入する条件検討およびコンパートメント境界部におけるカドヘリン分子動態の可視化を見据えたベクター構築を開始した。これらは上記培養モデルのみならずマウス胚においても独自に醸成したトランスジェニックシステム (参考文献3, 4) あるいは全胚培養系への電気穿孔法 (参考文献5, 6) によって導入準備中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、学外研究者との交流が飛躍的に活性化し、当初予定していたコンパートメント境界モデルにおける細胞表面張力の実測に留まらず、小椋研で機能解析が進行中の力覚関連遺伝子群の役割をコンパートメント境界モデルもしくは発生マウス個体で新たに考察するステップへと進捗した。また、本共同研究で得られた結果は、『神経系 3D 形態とコンパートメント境界構築原理の連関解析』(平成 28 年度新学術領域研究-公募研究) という新しい研究課題の提案や平成 28 年度東北大学加齢医学研究所共同利用・共同研究課題の継続申請に結びつき、今後の発展が期待されている。

[4] 成果資料

本年度において本共同研究からの直接的な成果論文は無いが、本研究課題で使用した誘導的発現システムを用いた成果として以下の論文が受理された。

- (1) Egusa, S. F., Inoue, Y. U., Asami, J., Terakawa, Y. W., Hoshino, M. and Inoue, T. (2016). Classic cadherin expressions balance postnatal neuronal positioning and dendrite dynamics to elaborate the specific cytoarchitecture of the mouse cortical area. *Neurosci. Res.* in press.

参考文献 (本研究課題参画者に下線)

1. Inoue, T., Chisaka, O., Matsunami, H. and Takeichi, M. (1997). Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions and neural crest subpopulations in mouse embryos. *Dev. Biol.* 183, 183-194.
2. Inoue, T., Nakamura, S. and Osumi, N. (2000). Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Dev. Biol.* 219, 373-383.
3. Inoue, Y. U., Asami, J. and Inoue, T. (2009). Genetic labeling of mouse rhombomeres by Cadherin-6::EGFP-BAC transgenesis underscores the role of cadherins in hindbrain compartmentalization. *Neurosci. Res.* 63, 2-9 [Cover Article].
4. Asami, J., Inoue, Y. U., Terakawa, Y. W., Egusa, S. F. and Inoue, T. (2011). Bacterial artificial chromosomes as analytical basis for gene transcriptional machineries. *Transgenic Res.* 20, 913-924.
5. Inoue, T. and Krumlauf, R. (2001). An impulse to the brain-using in vivo electroporation. *Nature Neurosci.* 4 Suppl., 1156-1158.
6. Osumi, N. and Inoue, T. (2001). Gene transfer into cultured mammalian embryos by electroporation. *Methods* 24, 35-42.