

課題番号 6

2D コンパートメント境界モデルにおける 細胞皮質張力の実測とその3D化

[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)

野村 慎一郎 (東北大学工学部)

研究費：物件費 15万円

[2] 研究経過

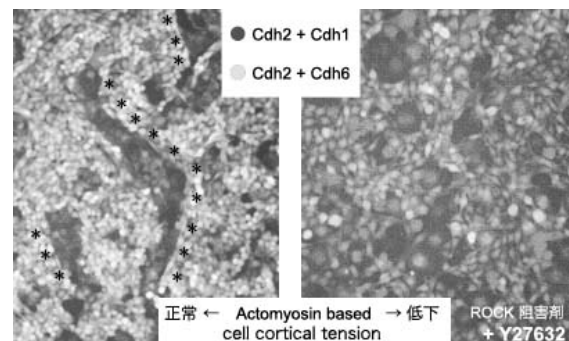
近年、個体の発生・分化・加齢に関わる研究開発は必要性を増しつつある。本共同研究課題では、脊椎動物の脳・中枢神経系の発生過程で共通に表出されるコンパートメントユニット (neuromeres) の境界形成・維持機構を独自のモデルシステムや実験系を駆使して細胞・分子レベルで明確にすることを目的とした。

これまでに研究代表者らは、マウス初期胚コンパートメント間で differential な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 (2D) 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)。本共同研究課題では、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 をマウス繊維芽細胞由来の L 細胞に安定導入した新規細胞株を樹立し、そこへ多重カドヘリンを誘導発現後、2D 混和培養を行った際にできるコンパートメント様境界形成モデル (図 1A) において細胞の表面張力がどのように分布するのかを、物理的手法や各種力覚関連遺伝子の動態観察によって初めて体系的に明らかにするとともに、この 2D モデルを 3D 化し、neuromere 境界とくびれ構造形成

機序の相関へ初めて体系的に迫ることをめざす。

以上の計画の立案・遂行に際しは、加齢研小椋研究室固有の研究基盤と小椋研が東北大学工学部野村研と共同開発した先端技術基盤の適用を中核に位置づけ、どのような技法が細胞皮質表面張力の実測や 3D 化に有効でどのような力覚関連遺伝子群の導入を行うべきかを勘案した。

A



B

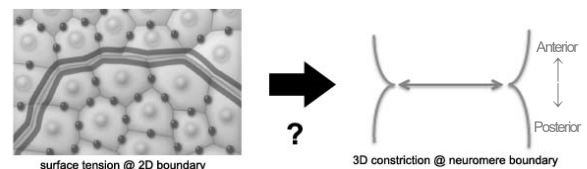


図1: (A) 2D コンパートメント境界形成のモデルの確立 (論文未発表)

細胞接着活性のないマウス繊維芽細胞由来 L 細胞に *Cdh2+Cdh6::EYFP* を tet-ON システムで安定誘導発現可能な細胞株 (白色) と *Cdh2+Cdh1::CFP* を同様の系で安定誘導可能な細胞株 (黒-灰色) を 2D で混合培養すると互いに選別し合い、コンパートメント境界様の界面が生じることがわかった (左*印)。ここで ROCK 阻害剤 Y27632 を添加するとシャープな境界形成が起こらないことも確認された (右)。このような界面は *Cdh2::EYFP* と *Cdh2::CFP* を発現する細胞同士を混和しても形成されないことから、異なるカドヘリンサブクラスが発現することに加え、アクチン細胞骨格に基づく細胞表面張力が 2D シート上での細胞境界形成に重要であることが推測される。

(B) (左) A のモデルでは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考えられる。(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。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細胞皮質表面張力の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。

[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。

① 新規モデル細胞株 (cadherin::XFP double transfectants : N-cadherin) をマウス繊維芽細胞由来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誘導系を用いて各種カドヘリンと蛍光分子を異なる組み合わせで同時発現可能とした細胞株群、もしくはcadherin-XFP transfectants : カドヘリン-蛍光分子融合蛋白を誘導発現可能とした細胞株群)を用いた2D混和培養でコンパートメント様境界が形成される過程をコンフォーカル顕微鏡下でタイムラプス観察した。その結果、境界付近でのカドヘリン分子動態や細胞分裂様式が初めて明確となり、境界面に沿って張力が発生する可能性が示唆された。現在上記モデル細胞株に力覚関連遺伝子のひとつであるYapのEGFP融合蛋白質導入を試み、境界形成に応じてどのような挙動を示すのかについて解析を行なっている。これと同時にストレッチチャンバー上で上記モデル細胞株を培養し、チャンバーに平面方向の張力をかけることによって境界部の細胞ダイナミクスやYapを含めた力覚関連遺伝子の発現動態を探る実験も開始した。さらにマイクロパーティクルを封入したゲル上でコンパートメント境界形成を促し、その過程におけるパーティクルの微弱な動態を追跡するtraction force microscopyの原理を適用することから細胞皮質張力の実測につなげる準備、あるいは上記2Dモデルを特殊ゲル等に埋め込んで管化したり、浮遊旋回培養してオルガノイド形成を促したりして立体 (=3D) / 多次元化する準備が進行中である。

② 細胞皮質表面張力の物理的実測を行うため、コンパートメント境界形成モデルへGiant Unilamellar Vesicleとの電氣的融合を用いたマイクロパーティクルの導入を試み、0.2および1 μ m径のものに関しては細胞あたり数十個のパーティクルが \sim 80%の細胞に取り込まれる条件を見出した。そこで磁気ビーズ導入後、光ピンセットによる細胞皮質張力測定を試みたが、熱の発生で細胞へのダメージが強かったため、現在ポリスチレンビーズ等の導入至適条件を検討中である。

以上で得られた結果は上記培養モデルのみならずマウス胚発生過程においても同様なのか、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)や全胚培養系への電気穿孔法(参考文献5,6)を用いて検討を施し、今後明確にしてゆく予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、研究者間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、平成31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等に結びつき、今後さらなる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、今後の研究展開の基盤となる成果として以下の論文を発表した(本研究課題参画者に下線)。

- (1) Inoue, Y. U., Morimoto, Y., Hoshino, M. and Inoue, T. (2018). Generation of Pax6-IRES-EGFP knock-in mouse via the cloning-free CRISPR/Cas9 system to reliably visualize neurodevelopmental dynamics. *Neurosci. Res.* 132, 1-7. (マウス前脳コンパートメントの可視化)

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.