

## 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)

研究費：物件費 20 万円

### [2] 研究経過

個体の発生・分化・加齢に関わる研究開発は年々重要性を増している。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に共通の基本ユニット (= neuromeres) の境界形成・維持機構を独自のモデル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主目的とした。

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形成過程において動的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 (投稿準備中)。本課題では、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、そこへ様々なカドヘリンサブクラスを多重に誘導発現後、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-C) を用いる。そしてそれら境界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』形成機序の相関へ体系的に迫ることをめざした。

以上の計画立案や遂行に際しては、加齢研小椋研究室固有の研究基盤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半期毎に進捗を確認しつつ、統合的に勘案した。

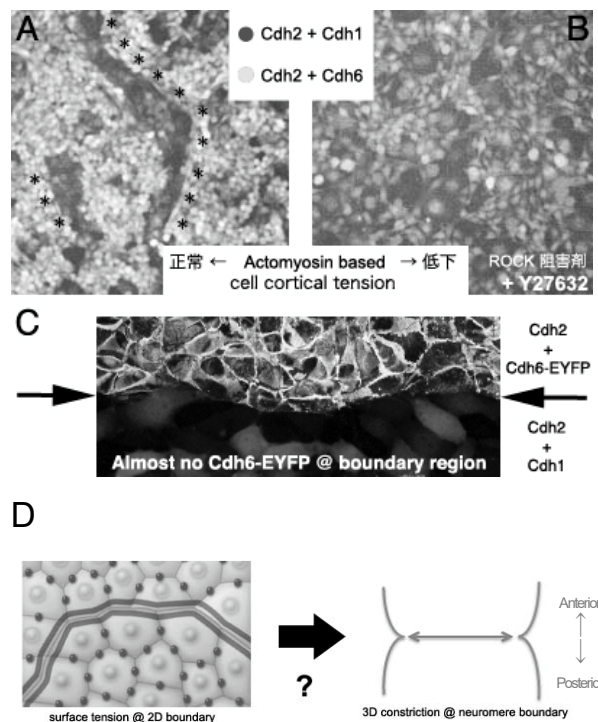


図1: (A-C) 2D コンパートメント境界形成モデルの確立 (投稿準備中)

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 (A\*印、C 矢印)。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 (B)。このような界面は *Cdh2*:EYFP と *Cdh2*:CFP を発現する細胞株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。

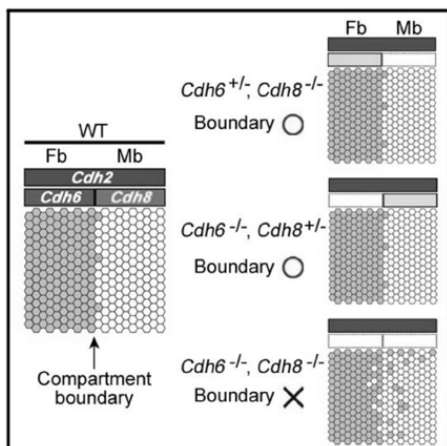
(D) (左) A-C のモデルでは異なるカドヘリンサブクラスが発現境界部 (図の中央部) に太い 2本のベルトで示したアクチン細胞骨格を基盤としたネットワークが形成され、これらが作用することで強い表面張力が生じるとともに、細胞同士の混和が制限され、コンパートメントが産み出される可能性が考えられる。(右) 脊椎動物の中枢神経系発生過程で認められるコンパートメントユニット neuromere の境界部は必ずくびれており、これが神経管の折り畳みによってできる脳の 3D 形態表出の基盤となっている。この『くびれ構造』が 2D 細胞シートモデルのコンパートメント境界部で認められる細胞皮質表面張力の制御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

これまでに、新規 *in vitro* モデル(図 1A-C)のタイムラプス観察によって、コンパートメント様境界付近でのカドヘリン分子動態や細胞分裂様式が明確となり、境界面に沿って張力が発生する可能性が示唆されている。本年度はまず、同モデル細胞株に力覚関連遺伝子や膜張力測定蛍光プローブの導入を試み、境界形成に応じてどのような挙動を示すのかについて計測を行なった(詳細を解析中)。また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つつ微弱なパーティクル動態を追跡する *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 *in vitro* モデル(=2D)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。さらには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  $\mu\text{m}$  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~80%の細胞に取り込まれる条件を見出している。現在光ピンセット操作による張力測定に向け、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が上記培養モデル(図 1A-C)のみならずマウス胚発生過程においても同様なのかについて、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、予備的なデータが得られつつある。本年度は、CRISPR/Cas9を用いた受精卵ゲノム編集により、マウス前脳(Fb)と中脳(Mb)コンパートメントで相補的に発現するカドヘリンサブクラス遺伝子(*Cdh6* と *Cdh8*)を二重ノックアウトした時にのみコンパートメント境界が乱れることを示



し、論文として公表した(左図; Hiraga et al., 2020)。この結果と図 1A-C の結果を併せて勘案すると、カドヘリンサブクラスの差次的

な発現がコンパートメント境界形成・維持に必要十分であることが初めて示されることとなるので、本研究をさらに発展させる上で、きわめて重要な成果が得られたと言える。

#### (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新規多次元 *in vitro* モデルや発生マウス個体で検証するステップへと進捗した。よって今後も共同研究体制を持続してゆく予定である。

### [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については投稿準備中であるが、本共同研究結果に基づいた議論に大いなるヒントを得て以下の論文を発表した(=本研究課題への謝辞付き)。

Hiraga, K., Inoue, Y. U., Asami, J., Hotta, M., Morimoto, Y., Tatsumoto, S., Hoshino, M., Go, Y. and Inoue, T. (2020). Redundant type II cadherins define neuroepithelial cell states for cytoarchitectonic robustness. *Commun. Biol.* 3, 574.

#### 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.