

【目的】 発生過程の哺乳類脳は、神経幹細胞から誕生したニューロンとグリアが組織内を大規模に遊走することにより、多数の細胞が秩序正しく重層した皮質構造を形成する。我々はこれまでに、発生中の小脳脳皮質を遊走する顆粒細胞を高解像ライブ観察し、核が著しく変形して狭い組織空間をすり抜けるように前進することを見出した。また皮質形成期のニューロン核で DNA 損傷の標識分子の発現が見られた。これらの結果から、正常発生においてニューロン核は組織間隙を移動するために高い柔軟性を維持しており、その代償として移動に伴う機械的ストレスにより不可避の DNA 損傷を受けることが示唆された。本研究ではこの仮説を検証するべく、小脳皮質形成における顆粒細胞の遊走をモデルに、核の物性と運動能を制御する核ラミナ分子の発現機構を解析し、さらに機械的ストレスによるニューロン核損傷の実態と修復機構を明らかにすることを目標とした。

【方法】 <細胞の弾性測定> マウスの小脳を取り出し、トリプシン処理を施して細胞を分散させ、パーコール密度勾配遠心を行い小脳顆粒細胞を回収した。培地に懸濁後、ガラス培養皿に播種して原子間力顕微鏡による弾性率計測を行った。<マウス小脳への遺伝子導入と免疫蛍光観察> 出生 8 日齢のマウスを氷上麻酔した後、pCAG-LMNA-EGFP を小脳溝に注入し、パルス電流発生装置 CUY21 (Nepagene) を用いて電気穿孔法で遺伝子導入を行った。脳は 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、ビブラトームで 100 μm 厚の小脳矢状切片を作製して免疫蛍光染色を施し、共焦点顕微鏡 (FV1000) で観察した。<Transwell 遊走アッセイ> 分散した顆粒細胞を多孔性ポリカーボネート膜 (MilliCell) 上に培養し、5 時間後に固定して免疫蛍光染色し、DNA 損傷の有無を観察した。

【結果】 1. 核ラミナ分子が核の物性と移動を制御する機構：皮質発生期の小脳顆粒細胞は特に遊走期に柔らかく、核の弾性を制御するとされる核ラミナ分子ラミン A の発現が殆どないことが確かめられた。遊走前の小脳顆粒細胞にラミン A を強制発現させると細胞遊走が有意に抑制されることから、ラミン A の発現抑制が顆粒細胞遊走能の制御に必要であることが示唆された。2. 機械的ストレスによる核損傷の実態と修復機構：遊走に伴う機械的ストレスが核損傷を誘発する可能性を検証するため、組織間隙を模した数 μm の隘路を含む基質上で顆粒細胞を培養し、DNA 損傷マーカーの発現を調べたところ、隘路通過後に一過的に上昇することが確かめられた。すなわちニューロンは移動に伴う機械的ストレスにより核損傷を受けることが明らかになった。

ニューロン遊走に伴う核への機械的ストレス

ニューロン遊走のライブイメージ

