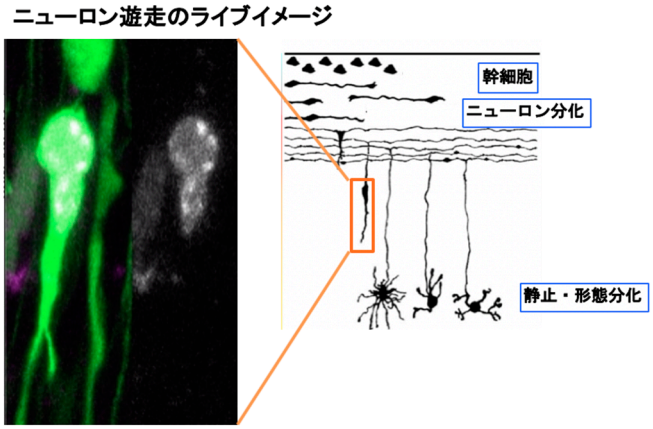
39　皮質ニューロン遊走に伴う細胞損傷と修復の分子基盤	見学　美根子

【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



39. 皮質ニューロン遊走に伴う細胞損傷と修復の分子基盤

見学　美根子

京都大学 高等研究院 物質－細胞統合システム拠点

Key words：小脳顆粒細胞，脳皮質形成，ニューロン遊走，核ラミナ，DNA 損傷

緒　言

細胞遊走は、組織の形態形成、免疫監視、がん転移など多くの生理・病理機構に必須の過程である。遊走細胞は自身の直径より遥かに狭い組織や細胞間隙をすり抜けることが可能で、その際、細胞中最も大きなオルガネラである核が著しいくびれや歪みを示すことが知られていた。最近の研究で、培養下で遊走するリンパ球に生体内と同等に狭い間隙を通過させると高い頻度で核膜が破裂し、細胞はその修復を繰り返して生存することが明らかになった［1，2］。現在までこの現象の普遍性や詳細な機構は不明である。またこれらの研究は単純化した人工的環境での現象論にとどまり、生理的意義については推論の域を出ない。

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。ニューロン移動の破綻は重篤な脳奇形の原因となるほか、双極性障害や統合失調症との関係も指摘されており、長年神経発生学の中心的課題の一つである［3，4］。我々は脳皮質形成におけるニューロン遊走の分子機構に取り組み、小脳皮質形成過程で移動するニューロン核の動態制御機構を解析してきた［5，6］。最近、脳組織の高解像ライブ観察で、移動中の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様子を捉えた［7］。細胞核の硬さは組織により 2 桁オーダー（Pa 単位）異なり、筋細胞など機能上機械的ストレスに晒される細胞の核は硬いのに対し、遊走能の高いニューロンやリンパ球は柔らかい核を持つという報告がある［8］。これらの知見から、正常発生においてニューロンは核の柔軟性を維持して組織を移動するが、移動に伴う機械的ストレスにより核が損傷を受ける可能性があると考えた。

本研究では、小脳皮質形成における顆粒細胞のニューロン遊走をモデルに、生理条件下での機械的ストレスに対する細胞の適応的戦略を明らかにすることを目的とする。顆粒細胞遊走の培養再構築系および分子・オルガネラ動態の可視化・解析技術を用い、核の硬さと核ラミナ構造、ニューロン遊走能の相関関係を調べた。さらに移動に伴う機械的ストレスがクロマチンに与える影響を解析した。

方法および結果

1.　顆粒細胞は遊走期に柔らかく、核ラミナ分子 Lamin A の発現が低い

皮質形成期の小脳顆粒細胞が遊走する際、柔軟に変形する核の物性を解析した。生後 15 日齢のマウス小脳を取り出し、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、ポリリジン塗布した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。小脳顆粒細胞の細胞体は細胞質が少なくほぼ核で占められており、細胞の中心部の弾性率は核の値を反映すると考えられる。生後 15 日の顆粒細胞の弾性率は 0.417±0.0692 kPa であり、対照群として用いた筋芽細胞 C2C12（2.68±0.1673 kPa、$p < 0.0001$, Student の t 検定）と比して顕著に柔らかかった。また顆粒細胞遊走が起こる生後 4 日齢、9 日齢の顆粒細胞は遊走を完了している 15 日齢より有意に柔らかかった（4 日齢 0.127±0.00996 kPa、9 日齢 0.173±0.0152 kPa、15 日齢 0.417±0.0692 kPa、$p < 0.0001$、Tukey-Kramer 法による多重比較）。

次にこの時期の顆粒細胞における核ラミナ分子の発現を解析した。単離した顆粒細胞のタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析を行ったところ、Lamin B1 と B2 は安定的に発現しているのに対し、Lamin A は生後

12 日齢まで発現が殆ど見られず、15 日齢に上昇していた。Lamin B Receptor は逆に 4〜12 日齢で強く発現し、15 日齢で減少する傾向を示した（図 1）。各分子の mRNA の量を qPCR で評価したところ、タンパク質発現とほぼ平行関係にあることから、核ラミナ分子の発現は転写レベルで調節されていることが示唆された。これらの結果から、遊走期の顆粒細胞では Lamin A の発現が抑制されて核が柔らかく、遊走を終えると Lamin A が発現上昇し、核が硬くなることが示唆された。

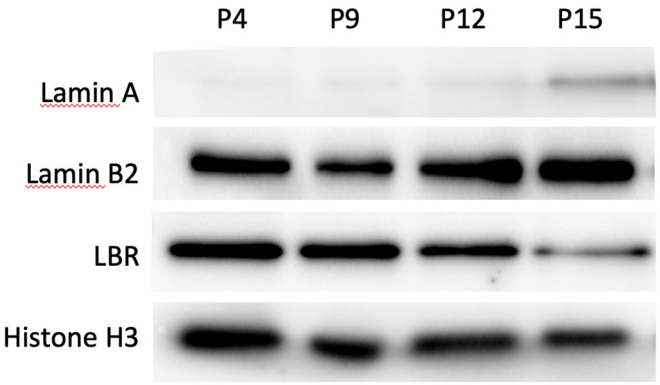


図 1. 皮質形成期の小脳顆粒細胞におけるラミン分子種の発現解析
生後 4 日から 15 日の小脳顆粒細胞を単離し、核タンパク質を抽出してラミン A, B2, ラミン B 受容体（LBR）の抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。Histone H3 は内在コントロール。

2. Lamin A の発現はニューロン核移動を妨げる

Lamin A の発現がニューロンの遊走能に及ぼす影響を調べるため、遊走期の小脳顆粒細胞に Lamin A の強制発現を行った。出生 8 日齢のマウスを氷上麻酔して小脳上部の頭骨を穿孔した後、マイクロシリンジ（33 ゲージ）を挿入して Lamin A-EGFP 融合分子 cDNA（pCAG-LMNA-EGFP） または EGFP cDNA（pCAG-EGFP）を小脳溝に注入した。パルス電流発生装置 CUY21 （Nepagene）を用いて 70 mV 50 ミリ秒のパルス電流を 150 m 秒間隔で 6 回与えて遺伝子導入を行った後、親元に返して生後 12 日まで飼育した。脳を 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 μ m 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。

pCAG-EGFP を導入した対照群では、EGFP を発現する小脳顆粒細胞はほぼ内顆粒層（IGL）に移動を完了していたのに対し、Lamin A を強制発現させた顆粒細胞は一部分子層（ML）に残り、また IGL に到達した細胞も上層に蓄積する傾向があり IGL 深部へ到達するものが少なかった（図 2）。この結果から、Lamin A の発現は皮質形成期のニューロン核移動を妨げることが示唆された。

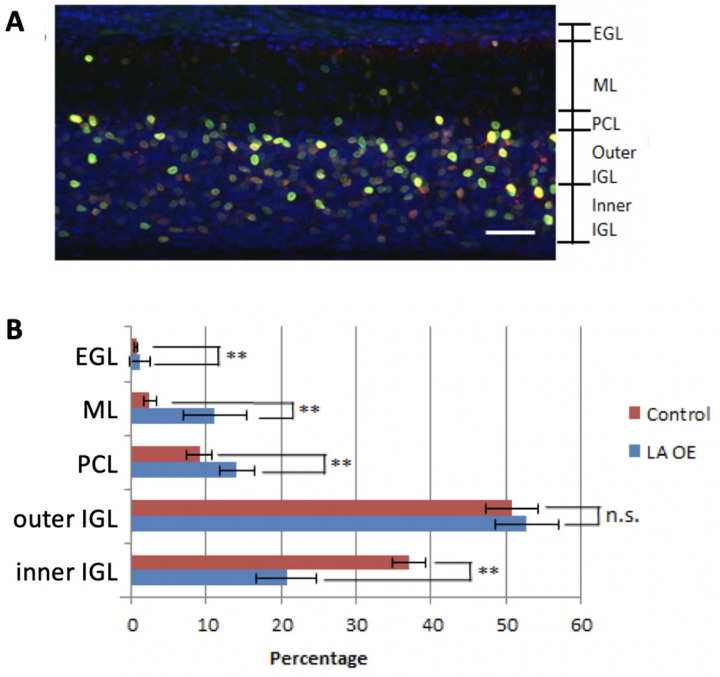


図 2. Lamin A 強制発現は小脳顆粒細胞遊走を阻害する。

A）生後 8 日の EGL の小脳顆粒細胞前駆細胞に Lamin A cDNA を強制発現し、生後 12 日目に小脳皮質切片を作製して顆粒細胞の分布を観察した。青は核染色、赤はボリュームマーカーとして共発現させた mCherry、緑が LaminA-EGFP のシグナル。EGL = 外顆粒層；ML = 分子層；PCL =プルキンエ細胞層；IGL = 内顆粒層。スケールバー 66 μ m。

B）EGFP を発現した対照群（赤）と Lamin A-EGFP 発現細胞（青）の各層における割合。カイ 2 乗検定を行なった。** $P < 0.05$.

3. ニューロン遊走に伴い DNA 損傷マーカーが一過的に発現する

遊走に伴う核の著しい変形が核の損傷を誘発する可能性を検証するため、Transwell 遊走アッセイを行なった。分散した顆粒細胞を多孔性ポリカーボネート膜（MilliCell）上に培養すると、顆粒細胞は遊走して膜の小孔をくぐり抜け、反対の面へ移動するものが確認された。培養開始後 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。その結果、膜の小孔を通過した細胞で γ H2AX の核内での局在が有意に上昇していた。培養開始から 24 時間後に固定したものでは γ H2AX の局在は消失し、小孔を通過しなかった細胞と差は見られなかった。以上の結果から、小脳顆粒細胞は遊走に伴い核が受ける機械的ストレスにより DNA 損傷を受けること、この損傷は直ちに修復されることが示唆された。

考　察

本研究により、皮質形成期のニューロン核は特殊な核ラミナ構造を有し、成熟後に比して柔らかいことが明らかになった。また核の弾性に寄与する Lamin A を強制発現させるとニューロン遊走が阻害されることから、Lamin A 発現が低い柔らかい核は、ニューロン遊走の必要条件であることが示唆された。Lamin A の発現は生後 12 日目までほぼ抑制されているが、15 日になると低いながら発現が見られることから、可逆的な抑制機構が働いていると考えられる。Lamin A の発現調節機構の解明は今後の課題である。また、核の硬さと遊走性との相関についてもより詳細な解析が必要である。

遊走後のニューロン核では一過的に DNA 損傷マーカーの発現が上昇していた。Transwell 遊走アッセイにおいて、細胞直径より狭い小孔を潜って遊走したニューロンでは同様に損傷マーカーの発現が一過的に上昇していたことから、柔らかい核が狭い組織間隙をすり抜けて移動する際の機械的ストレスにより DNA 損傷が起こり、直ちに修復されることが示唆された。この事は、正常発生の過程で分裂後のニューロンに高い頻度で DNA 損傷が起こることを意味する。損傷しやすい特定のゲノム領域があるのか、またどの様な修復機構が作動するのかを明らかにする事は今後の課題である。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、原子間力顕微鏡による微小弾性測定は、京都大学高等研究院の田中求教授、鈴木量博士、同大学生命科学研究科の吉村成弘教授、姜子晛氏との共同研究で行いました。この場を借りて深謝いたします。

文　献

1） Denais, CM, Gilbert RM, Isermann P, McGregor AL, Lindert te M, Weigelin B, Davidson PM, Fried P, Wolf K, Lammerding J. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. Science. 2016; 352(6283):353–358. http://doi.org/10.1126/science.aad7297

2） Raab M, Gentili M, de Belly H, Thiam HR, Vargas P, Jimenez AJ, Lautenschlaeger F, Voituriez R, Lennon Duménil AM, Manel N, Piel M. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. Science. 2016; 352(6283):359–362. http://doi.org/10.1126/science.aad7611

3） Manzini MC, Walsh CA. What disorders of cortical development tell us about the cortex: one plus one does not always make two. Curr Opin Genet Dev. 2011;21(3):333–339. DOI:10.1016/j.gde.2011.01.006

4） Moon, HM, Wynshaw-Boris, A. Cytoskeleton in action: lissencephaly, a neuronal migration disorder. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013;2(2):229–245. DOI:10.1002/wdev.67

5） Umeshima H, Hirano T, Kengaku M. Microtubule-based nuclear movement occurs independently of cetrosome positioning in migrating neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(41):16182-16187. http://doi.org/10.1073/pnas.0708047104

6） Umeshima H, Kengaku M. Differential roles of cyclin-dependent kinase 5 in tangential and radial migration of cerebellar granule cells. Mol. Cell. Neurosci. 2013; 52:62–72. http://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.08.005

7） Wu YK, Umeshima H, Kurisu J, Kengaku M. Nesprins and opposing microtubule motors generate a point force that drives directional nuclear motion in migrating neurons. Development. 2018;145(5):dev158782. http://doi.org/10.1242/dev.158782

8） Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J et al. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. Science. 2013; 341(6149):1240104–1240104. http://doi.org/10.1126/science.1240104