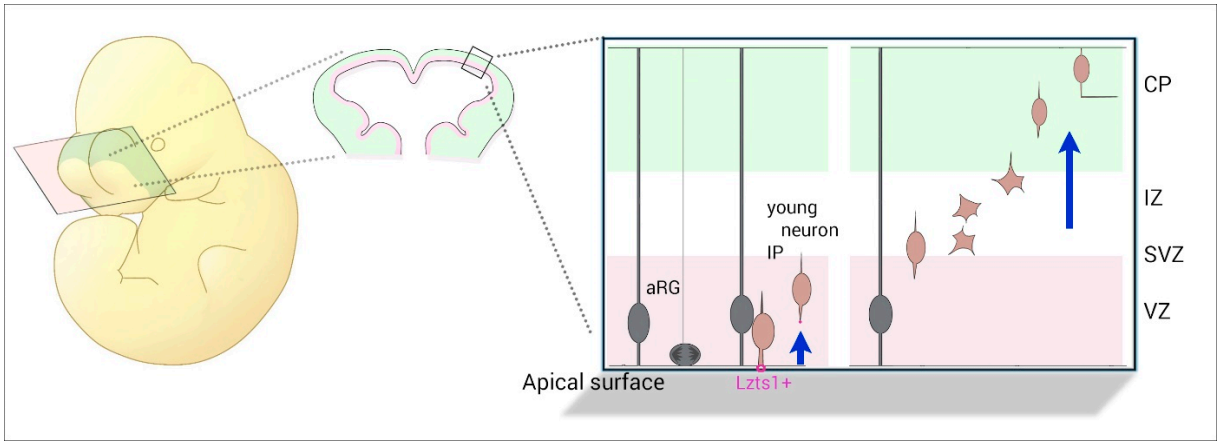
20　上皮構造からの細胞の離脱・移動の新しい分子制御機構	川口　綾乃

【目的】生物種に応じた多様な組織形態を示す大脳も、もとは一層の神経上皮から生じる。脳室面側で未分化な神経前駆細胞（放射状グリア：radial glia あるいは apical radial glia：aRG）の分裂により誕生したニューロン系分化細胞（young neuron と中間前駆細胞 IP）は、脳室面にある上皮細胞の頂端側の細胞接着構造から離脱し、脳表面側へと向けた移動を開始する。微小管関連分子 Lzts1（Leucine zipper tumor suppressor 1）は分化細胞の apical 側アドヘレンス・ジャンクションに局在しこの細胞離脱に際して実行役分子として働く。Lzts1 による細胞離脱は上皮間葉転換（EMT）の一種とも捉えることができるが、同様のメカニズムは、脳の発生だけでなく、他の組織・器官の発生過程で観察される EMT も制御している可能性がある。Lzts1 の作用、例えばアクトミオシン系の活性化は線維芽細胞株（NIH3T3）でも確認されることから、少なくとも一部の Lzts1 の下流の分子機構には普遍性があることが示唆される。そこで本研究では、幼若ニューロンの離脱と同様の機構が、細胞移動、あるいは、EMT として知られる他組織における類似の現象にも関与しているのかを明らかにするため、発生過程でどのような細胞が Lzts1 を発現しているのかを検討した。また、Lzts1 が細胞離脱だけでなく細胞移動の制御にも関わっているかを大脳皮質ニューロンの移動に注目して評価した。さらに Lzts1 の細胞離脱・細胞移動での細胞内分子機構を明らかにするためにヒト培養細胞株を用いた実験モデルの樹立を試みた。

【方法】胎生中期マウスを用いて器官形成時における各組織における Lzts1 発現・局在を免疫組織学的に評価した。また発生時期の脳については子宮内エレクトロポレーション法を用いた *de novo* ゲノム編集を介した Lzts1 ノックアウトによる Loss-of-function 型の機能実験を行い、Lzts1 ノックアウトが大脳皮質ニューロンの移動と配置に与える影響を評価した。さらにヒト由来各種細胞株を使用して蛍光タンパク融合型 Lzts1 の発現誘導と内在性の Lzts1 局在を検討した。

【結果】器官形成時における各組織における Lzts1 発現・局在を免疫組織学的な手法により評価し、腸管壁の筋層内を移動中の腸管神経系前駆細胞など、中枢神経系以外の一部組織でも Lzts1 が発現していることを見出した。また発生時期の脳では、Lzts1 が幼若ニューロン分化細胞の離脱を制御しているだけではなく、離脱後の正確なニューロン配置の制御においても必要であることを確認した。あわせて、Lzts1 による特徴的な細胞離脱および移動をもたらす細胞内分子機構について検証するためのヒト由来細胞株実験モデルを確立した。これにより、今後これらの実験モデルを使用して、Lzts1 の発現変化が細胞骨格および接着状態の動態に及ぼす影響と器官形成におけるその機能を評価することが可能となった。

Lzts1 は神経上皮構造から分化細胞が離脱する際の実行役分子である



20. 上皮構造からの細胞の離脱・移動の新しい分子制御機構

川口　綾乃

岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 人体構成学

Key words：神経前駆細胞，神経幹細胞，上皮間葉転換，Lzts1，細胞移動

緒　言

生物種に応じた多様な組織形態を示す大脳も、もとは一層の神経上皮から生じる。神経上皮を構成する未分化な神経前駆細胞（放射状グリア：radial glia あるいは apical radial glia：aRG）の頂端側（Apical 側）突起には、微小管―アクチン―アドヘレンス・ジャンクション（AJ）構造体が存在し、隣り合う突起の先端は互いに緊密にパックされ脳室面を形成している。一方、この神経前駆細胞の脳室面での分裂により誕生したニューロン系分化細胞（ニューロンや中間前駆細胞：IP）は、誕生時は Apical 側の突起を受け継いでいるものの、すみやかにそれを脳室面から引き抜いて外層へと移動を開始し、最終的に大脳皮質を形成するに至る。この離脱は幅広い生物種で観察される、三次元的な脳が形成されるための基本的かつ重要なステップである（図 1）[1]。

このニューロン系分化細胞の離脱（neuronal delamination）は、抑制性の転写因子が上皮構造の維持に関与する分子を発現抑制することで引き起こされると解釈されてきた。加えて最近、離脱する細胞に特異的に発現する分子による「正の」離脱制御機構があいついで報告された。ひとつがドイツのグループによる中心体タンパク AKNA で [2]、もう一つが我々が報告した微小管関連分子 Lzts1（Leucine zipper tumor suppressor 1）である [3]。Lzts1 は、単一細胞レベルでの遺伝子発現プロファイル情報 [4, 5] をもとに、マウス胎児脳で機能的スクリーニングを行い発見した分子である。Lzts1 を強制発現された細胞は速やかに脳室面から Apical 突起を引き抜いて離脱し、移動を開始する。

発生期の脳における Lzts1 の発現パターンは特徴的で、これから離脱するニューロン分化細胞の脳室面側、すなわち Apical 側の細胞接着構造 AJ に特に強く局在する。ここで Lzts1 は、アクトミオシン系の活性化と細胞接着分子 N-カドヘリンの局在低下をもたらし、突起の離脱と細胞体移動を強力かつ速やかに引き起こす実行役分子として働く [3]。

この Lzts1 による神経上皮構造からの細胞離脱は上皮間葉転換（EMT）の一種と捉えることもできる。同様のメカニズムは、脳の発生だけでなく、他の組織・器官の発生過程で観察される EMT も制御している可能性がある。また、Lzts1 の作用、例えばアクトミオシン系の活性化は線維芽細胞株（NIH3T3）でも確認されることから [3]、少なくとも一部の Lzts1 の下流の分子機構には普遍性があることが示唆される。しかし、ニューロン系分化細胞の離脱において、Lzts1 が具体的にどのような役割を果たしているのか、Lzts1 による離脱に関与するほかの因子についてなど、その下流の分子機構は不明である。加えて、幼若ニューロンの離脱と同様の機構が、他組織における類似の現象にも関与しているのかについても、さらなる研究が必要である。これらの未解明の問題に対する答えは、細胞離脱・移動の分子機構を理解し、将来的には器官形成や疾患進行のメカニズムを解明する鍵となる可能性がある。

本研究では、Lzts1 が幼若ニューロンの脳室面からの離脱以外の局面でどのように器官形成に貢献しているかを検討した。器官形成時における各組織における Lzts1 発現・局在を免疫組織学的な手法により評価し、また発生時期の脳については細胞移動についての機能実験を行い、Lzts1 が幼若ニューロン分化細胞の離脱を制御しているだけではなく、離脱後の正確なニューロン配置の制御にも必要であることを明らかにした。あわせて、Lzts1 による特徴的な細胞離脱および移動をもたらす細胞内分子機構について検証するためにヒト由来細胞株実験モデルを確立した。これにより、今後これらの実験モデルを使用して、Lzts1 の発現変化が細胞骨格および接着状態の動態に及ぼす影響と器官形成におけるその機能を評価することが可能となった。

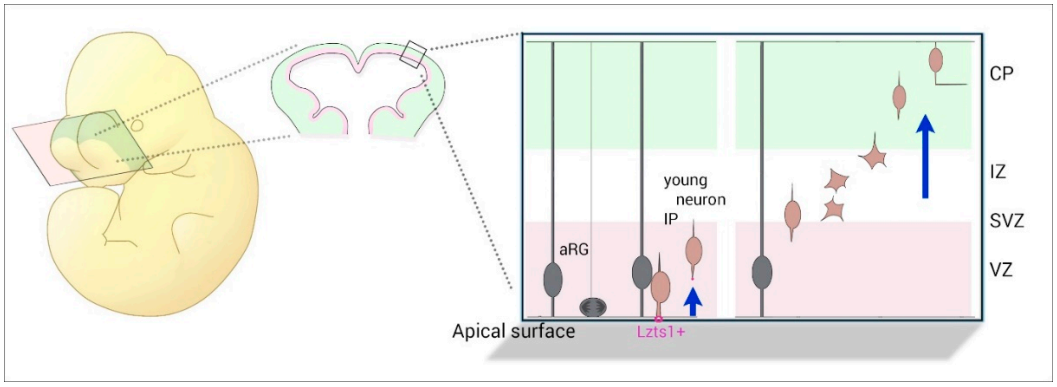


図 1. Lzts1 は神経上皮構造から分化細胞が離脱する際の実行役分子である
発生期マウス大脳壁の模式図。Lzts1 はこれから離脱する分化細胞の apical 側突起先端に局在するとともに移動中のニューロンにも発現する。aRG：apical radial glia（神経前駆細胞）、IP：intermediate progenitor cells（中間前駆細胞）、VZ：ventricular zone（脳室帯）、SVZ：subventricular zone（脳室下帯）、IZ：intermediate zone （中間帯）、CP：cortical plate（脳皮質）。

方 法

1. Lzts1 の器官形成過程における発現と局在の免疫組織化学的検討

本研究における動物実験および DNA 組換え実験は所属機関の承認を得て行った。胎生中期 ICR マウス（胎生 13 日以下 E13、E14、E15）を 1%あるいは 4% PFA/0.1M リン酸緩衝液にて固定し 20%スクロースに置換後 OCT コンパウンドに包埋して凍結切片を作製した。また消化器系、生殖器系組織を別途取り出し同様に固定し凍結切片を作製した。抗原賦活処理（Histo-VT one、ナカライ、70℃、20 分）の後、一次抗体（rabbit anti-Lzts1 polyclonal Ab（Proteintech）、chick anti-GFP polyclonal Ab（Aves Labs）、rabbit anti-UCHL1 pAb（Proteintech）および対応する Alexa 488、568、647 標識二次抗体を使用した免疫組織染色を行った。DAPI による核染色の後に封入し、共焦点レーザー顕微鏡（FV3000、Evident 社）により観察を行った。

2. 子宮内エレクトロポレーションを用いたマウス胎児脳内での *de novo* ゲノム編集による Lzts1 ノックアウト

妊娠 13 日目マウスを三種混合麻酔薬投与により麻酔後、子宮壁越しに *Lzts1* 遺伝子をターゲットにしたガイド RNA を発現させるベクタープラスミド［3］、Cas9 を発現させるベクタープラスミドおよびレポーターとして GFP を発現するプラスミドベクターの混合液をガラスキャピラリーにて胎児側脳室へ注入し、直径 3 mm の電極を用いてエレクトロポレーター（ネッパジーン）にて 32 V、50 msec ON、450 msec OFF、5 pulses の条件でエレクトロポレーションを行い、細胞レベルでの *de novo* ゲノム編集［3, 6］による *Lzts1* ノックアウトを行った。コントロールとして GFP と Cas9 のみの発現プラスミドベクターを注入し同様の操作を行った。生後 4 日目（P4）に大脳を取り出し実験 1 と同様に固定後に凍結切片を作製し、Chick anti-GFP Ab、rabbit anti-Cux1 pAb（Santa Cruz）および rabbit anti-Tbr1 pAb（Abcam）および対応する Alexa 488、568、647 標識二次抗体を用いて免疫組織染色を行った。DAPI による核染色の後に封入し、共焦点レーザー顕微鏡による撮影の後、大脳皮質層における GFP 陽性細胞の位置とマーカー分子の発現について計測と評価を行った。

3. HEK293 細胞およびヒト神経膠芽腫種由来細胞株における Lzts1 細胞内局在の観察

マウス Lzts1 cDNA 配列に緑色蛍光タンパク（Green Lantern）cDNA を融合し、Tet-ON システムを用いた発現誘導用ベクターに挿入して、HEK293 細胞にリポフェクションにより導入した。培地にドキシサイクリンを添加し Lzts1-GFP（Green Lantern）を発現誘導して蛍光顕微鏡システム（APX100 および FV3000、Evident 社）で観察記録を

行った。また、ヒト神経膠芽腫由来の各種細胞株は8 well スライドチャンバー上に播種し、10% FBS/DMEM 培地を使用し 5%CO_2、37℃インキュベーター内で培養後、4% PFA/0.1 M リン酸緩衝液にて固定し、実験 1 に記載の抗体を用いて免疫細胞化学的染色を行った。DAPI による核染色ののち封入し、共焦点レーザー顕微鏡（FV3000）による観察を行った。

結果および考察

1. 神経系組織その他における Lzts1 の発現

胎生中期（E15）のマウス大脳原基においては、移動を開始するタイミングの幼若ニューロンおよびニューロン分化過程にある前駆細胞（中間前駆細胞）と中間帯を移動中のニューロンで特に強い Lzts1 抗体のシグナルが観察された（図 2a）。これに加え、中枢神経系以外の一部組織でも Lzts1 抗体のシグナルが観察された。例えば、E13 マウス腸管壁の筋層内部と腸管上皮の基底膜側の一部の細胞が Lzts1 陽性であった（図 2b）。筋層内の細胞は神経細胞のマーカーである UCHL1 陽性であったことから、移動中の腸管神経系前駆細胞であると判断された。腸管神経系前駆細胞は神経堤由来で消化管壁内を口側から肛門へ向けて移動し、最終的に腸管全体に行き渡り腸管筋神経節と粘膜下神経節を形成することが知られているが [7]、その腸管神経系前駆細胞が Lzts1 を発現していることは Lzts1 の細胞移動への関与の可能性を考える上で興味深い。また、オスの E14 マウス精巣原基においては精細管内の生殖細胞で Lzts1 発現が観察された（図 2c）。

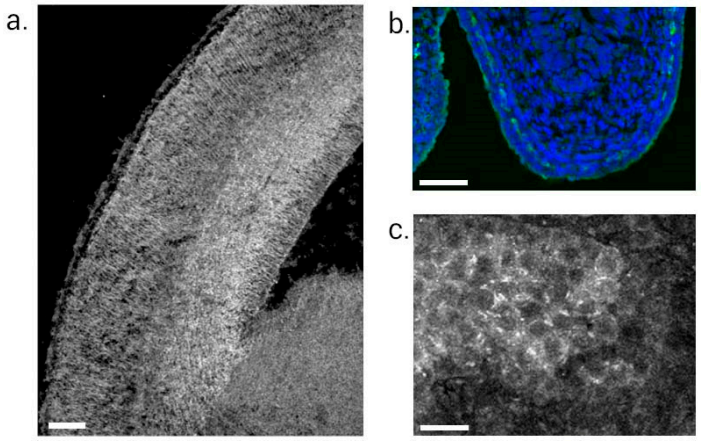


図 2. 神経系およびその他の組織における Lzts1 の発現

a）マウス E15 胚の大脳原基の Lzts1 抗体染色像。スケールバー：100 μm。

b）マウス E13 胚の腸管（中腸）の Lzts1 抗体染色（緑）および DAPI による核染色像（青）。スケールバー：50 μm。

c）マウス E14 胚の精巣原基の Lzts1 抗体染色像。スケールバー：30 μm。

2. Lzts1 発現減少がニューロン移動へ及ぼす影響

中枢神経系および末梢神経系の形成過程において少なくとも一部の移動中の神経細胞・神経系前駆細胞に Lzts1 発現が認められることから、続いて Lzts1 がこれらの細胞の移動に機能しているかを検討した。E13 で子宮内エレクトロポレーションにより大脳壁へ遺伝子導入を行い、細胞レベルでのゲノム編集による *Lzts1* ノックアウト操作を行ったところ、遺伝子操作された GFP 陽性細胞（ニューロン）は P4 の時点でコントロールと比べて大脳皮質の深層に分布していた（図 3a、b）。一方、これら深層に位置するニューロンは深層ニューロンマーカーである Tbr1 陽性かつ上層ニューロンマーカーの Cux1 陰性であり、配置異常を示したニューロンは細胞が存在する位置に応じた性質を獲得していることが示唆された。

これらの結果から、Lzts1 が幼若ニューロン分化細胞の離脱を制御している［3］だけではなく、離脱後の正確なニューロン配置の制御にも必要であることが明らかになった。すなわち、Lzts1 は発生期において大脳皮質ニューロンの移動も制御しているものと考えられる。今回は中枢神経系組織の形成過程での細胞移動に注目した解析を行ったが、実験 1 で示されたような、末梢神経系およびその他の器官形成においても同様の機能を有しているかについては興味深い問題であり今後の検討を予定している。

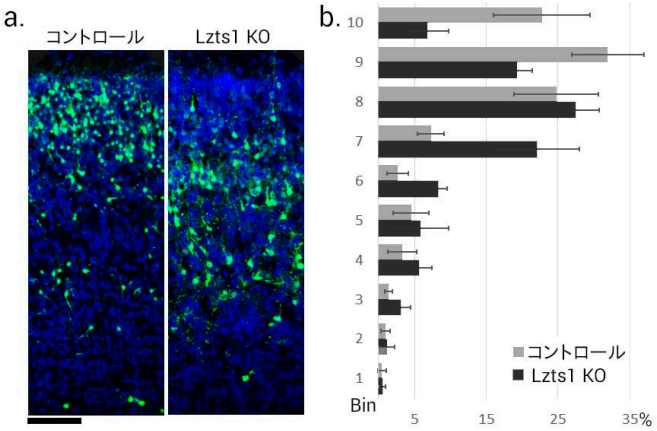


図 3. Lzts1 発現減少がニューロン移動へ及ぼす影響

Lzts1 の細胞レベルでのノックアウト操作により大脳皮質ニューロンはより深層に配置される。E13 で子宮内エレクトロポレーションを行い P4 で固定。

a） 大脳皮質の組織像。スケールバー：100 μm。

b） GFP 陽性細胞の分布。大脳皮質を深層（Bin1）から表層（Bin10）まで 10 段階に分割し評価した。

3. 培養細胞株を用いた細胞内局在の解析

Lzts1 発現によって惹起される細胞離脱［3］と実験 2 の結果が示す細胞移動について、その細胞内分子メカニズムについて検討を行うためのモデル系として培養細胞株を用いた 2 次元培養を検討した。Tet-ON システムを利用し Lzts1 発現を誘導した HEK293 細胞の解析では、マウス脳原基における幼若神経細胞で観察されたような細胞接着部位での発現に加え、細胞の変形、細胞質内での点状の発現が観察され、発現レベルに応じた局在変化と細胞内小器官への集積が示唆された。さらに Lzts1 を高発現させた場合は、培養皿上で細胞自体が丸く変形する様子が観察された。これら発現量に応じた細胞挙動の違いは、発生時期の大脳壁へ Lzts1 を発現させた際にも観察されており、ある程度細胞種を問わない変化である可能性が示唆された。

また、神経膠芽腫由来の細胞株においては一部の細胞で特徴的かつ局所的な内在性 Lzts1 発現が確認された。これまで、マウス脳原基における幼若神経細胞を対象としたライブイメージングによる細胞内局在の観察では、Apical 突起先端の細胞接着部位への集積は観察されるものの、技術的な問題からサブセルラーレベルの解析は困難であった。今回新たに特徴的な局在を見出した神経膠芽腫由来細胞株を実験モデルとして利用することで、さらに Lzts1 による細胞移動の分子メカニズムが明らかになることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は、岡山大学医歯薬学域人体構成学の下向敦範博士、小阪美津子博士、水野伸彦博士、医学科生の寺島美智さん、および名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学分野の宮田卓樹博士と医学科生の城航平君、林佑希さんを共同研究者として行われました。また、実験補助をいただいた名古屋大学の正岡実さん、野口奈美子さん、岡山大学技術職員の小見山高明さん、木村亮太さんに感謝申し上げます。

最後に本研究をご支援くださいました公益財団法人上原記念生命科学財団とその関係者の皆様に心からの感謝を表します。

文　献

1) Kawaguchi A. Neuronal delamination and outer radial glia generation in neocortical development. Front Cell Dev Biol. 2021 Feb 5;8:623573. PMID: 33614631. doi: 10.3389/fcell.2020.623573

2) Camargo Ortega G, Falk S, Johansson PA, Peyre E, Broix L, Sahu SK, Hirst W, Schlichthaerle T, De Juan Romero C, Draganova K, Vinopal S, Chinnappa K, Gavranovic A, Karakaya T, Steininger T, Merl-Pham J, Feederle R, Shao W, Shi SH, Hauck SM, Jungmann R, Bradke F, Borrell V, Geerlof A, Reber S, Tiwari VK, Huttner WB, Wilsch-Bräuninger M, Nguyen L, Götz M. The centrosome protein AKNA regulates neurogenesis via microtubule organization. Nature. 2019 Mar;567(7746):113-117. PMID: 30787442. doi: 10.1038/s41586-019-0962-4

3) Kawaue T, Shitamukai A, Nagasaka A, Tsunekawa Y, Shinoda T, Saito K, Terada R, Bilgic M, Miyata T, Matsuzaki F, Kawaguchi A. Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development. Nat Commun. 2019 Jun 25;10(1):2780. PMID: 31239441. doi: 10.1038/s41467-019-10730-y

4) Kawaguchi A, Ikawa T, Kasukawa T, Ueda HR, Kurimoto K, Saitou M, Matsuzaki F. Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. Development. 2008 Sep;135(18):3113-24. PMID: 18725516. doi: 10.1242/dev.022616

5) Okamoto M, Miyata T, Konno D, Ueda HR, Kasukawa T, Hashimoto M, Matsuzaki F, Kawaguchi A. Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. Nat Commun. 2016 Apr 20;7:11349. PMID: 27094546. doi: 10.1038/ncomms11349

6) Kalebic N, Taverna E, Tavano S, Wong FK, Suchold D, Winkler S, Huttner WB, Sarov M. CRISPR/Cas9-induced disruption of gene expression in mouse embryonic brain and single neural stem cells in vivo. EMBO Rep. 2016 Mar;17(3):338-48. PMID: 26758805. doi: 10.15252/embr.201541715

7) Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. J Neurosci. 2013 Oct 9;33(41):16372-82. PMID: 24107967. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2079-13.2013