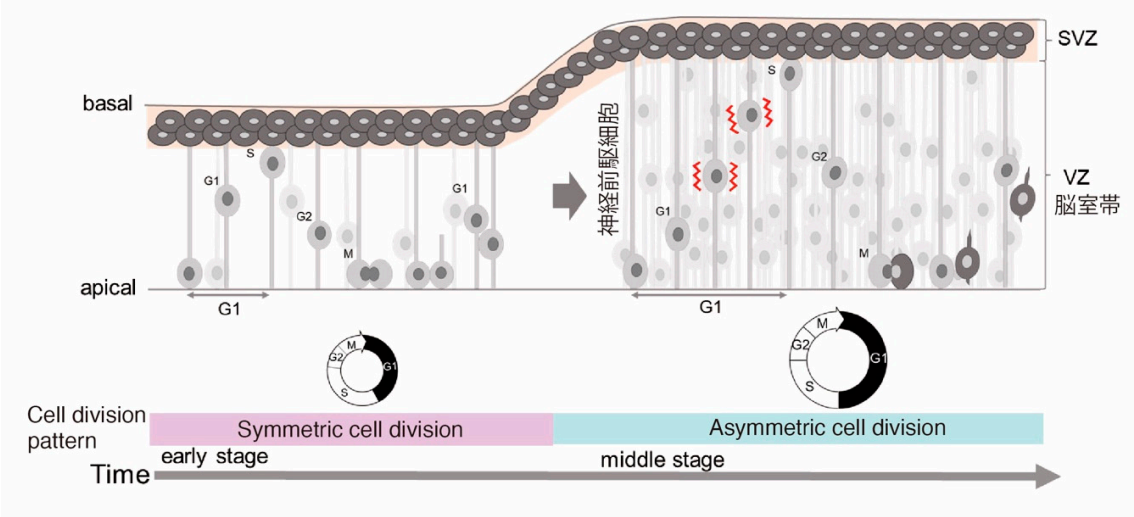
109　細胞周期と生産される細胞種を調節する細胞動態	川上　巧

【目的】発生期の大脳において、細胞生産を担う神経前駆細胞は細胞産生のパターンを変化させることで、未分化細胞と分化細胞の比率を調節している。この生産機構の高度な調節により組織内の細胞数と細胞種の割合は担保されているが、これが破綻すると皮質形成異常を誘引してしまうため、生産機構を理解することは疾患の予防や治療応用の道を切り開くと考えられている。近年、細胞周期における G1 期の長さが細胞産生のパターンを変化させることが発見された。組織の成長に伴い G1 期長が進展することは見出されているが、G1 期長を調節する仕組みは未解明のままである。本研究では、細胞周期の進行とシンクロナイズした上皮組織特有の核運動に着目し、神経前駆細胞の動態がもたらす細胞周期長の調節機構の解明を目指した。

【方法】子宮内電気穿孔法を用いて Neurog1/2（Ngn1/2）あるいは Lzts1 を遺伝子導入して、神経前駆細胞の核運動が起きる脳室帯を人為的に薄くした。薄化した脳室帯における神経前駆細胞の細胞周期長の変化を調査するために、EdU と BrdU の時間差ラベリングを行い、免疫組織学的に細胞周期の短縮の有無を解析した。また、同手法と Tbr2 抗体染色を併用し、神経前駆細胞より産生された細胞の分化度を算出した。

【結果】細胞産生パターンの転換が起きる胎生 11 日から 13 日にかけて、脳室帯の肥厚と細胞密度の増加が確認された。また、それに伴い核運動の速度がグラディエントに減衰することも見出された。発生の進行に伴う脳室帯の状況変化は、核運動に費やす時間を変化させる要因の一つである可能性が示唆された。人為的に薄化した脳室帯における細胞周期長の変化を調査した結果、G1 期の有意な短縮が認められた。大脳の組織培養を用いた神経前駆細胞のライブ観察から、薄化した脳室帯内の細胞は通常の速度で核運動を行うが、脳室帯が薄いために G1 期に起こる脳室帯下端から上端までの核移動に費やす時間が短縮されることが分かった。これらの結果から、核運動に費やされる時間が G1 期を規定している可能性が示唆された。また、薄化した脳室帯内で産生された細胞の細胞運命を調査した結果、有意に未分化細胞の産生が増加したことが認められた。以上の結果より、神経前駆細胞における核運動の進行が細胞周期の進行へフィードバックされ、最終的に細胞産生パターンに変化をもたらすことが明らかとなった。

発生中の神経前駆細胞における細胞周期長の変化と細胞産生パターン転換の機構



109. 細胞周期と生産される細胞種を調節する細胞動態

川上　巧

京都大学 高等研究院 物質-細胞統合システム拠点（iCeMS）

Key words：神経上皮，細胞周期，細胞動態

緒　言

哺乳類における成体の大脳は多種多様な細胞で構成された複雑な組織である。それらの細胞を生産する根幹となる細胞が神経前駆細胞である。神経前駆細胞により生産される細胞数や細胞種の割合は高度に調節されており、もし、この生産過程に異常が起きると、最終的には組織の低形成や過形成、層構造異常などの皮質形成異常を残してしまう。細胞生産の機構を理解することは、こういった皮質形成異常に対する医療応用へ役立つと期待される。

神経前駆細胞は大きく分けて、「未分化細胞」と「分化細胞」の 2 種類の細胞を生産する。発生初期では未分化細胞のみを生産し、中期に移行すると両種類の細胞を生産するパターンに変化する［1］。神経前駆細胞が生産パターンを時間的に変化させる仕組みの全貌は分かっていないが、近年、その一端が明らかにされつつある。Calegari らによって、細胞周期における G1 期の長さが、生産パターンと相関があることが報告された。具体的には、G1 期の長さが短い場合、未分化細胞が優先的に生産され、逆に長い場合は、両方の細胞が生産される［2，3］。しかし、神経前駆細胞が G1 期の長さを調節する仕組みは不明なままである。

神経前駆細胞の細胞周期は自身の細胞動態と密接な関係がある。神経前駆細胞は脳室帯と呼ばれる大脳壁の最下端の領域において、自身の核を細胞内で運動させる（エレベーターの個室が上下するような運動）。核運動は細胞周期と同調しており、G1 期において、この細胞は脳室帯の上部へ向けて核を移動させ、脳室帯の直上にあるニューロン層の直前まで到達すると S 期へ移行して細胞周期を進める。G2 期では G1 期とは反対に核を脳室方向へ移動させ、脳室面にて M 期を迎え、細胞分裂を行う。細胞生産パターンが変化する発生初期から中期への転換期において、核運動が行われる脳室帯の厚さは増加し、核運動の移動距離が伸びる。面白いことに、これと同調するように、G1 期の長さが拡張するとともに、分化細胞の生産が開始されることが知られている［4］。

こういった背景のもと本研究では、核運動に費やされる時間が G1 期長を規定する要因であり、最終的に細胞生産パターンに影響を及ぼすと仮説を立て、その検証を目指した。

方　法

1. 大脳皮質への遺伝子導入と FlashTag

胎生期（胎生 12～14 日）のマウス大脳に対して Neurog1/2（Ngn1/2）あるいは Lzts1 の異所性発現を行うために、子宮内電気穿孔法を用いて、pCAG-Neurog1 と pEF-Neurog2 の共導入あるいは pCAG-Lzts1 の導入を施行した。両条件ともに、pCAG-EGFP-3NLS を共導入することで遺伝子導入された細胞を可視化した。FlashTag による M 期細胞のラベルでは、マイクロキャピラリーを用いて子宮内胎児の側脳室へ CFSEs をインジェクションした。

2. 免疫組織学的解析

子宮内電気穿孔法による遺伝子導入後、任意の時間に EdU と BrdU を母体の腹腔へ投与した。遺伝子導入した胎児の大脳は、4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、1 時間の固定の後に 20%スクロース置換、OCT 包埋を経て 16μm の凍結切片を作製した。一次抗体と二次抗体の反応後、共焦点顕微鏡 FV-1000 を用いて観察を行った。EdU の検出には Click-iT キットを使用した。

3. 大脳の組織培養（スライス培養）とライブ観察

大脳組織を眼科用の微小メスで 200～300μm 厚にスライスし、コラーゲンゲルを用いてその組織片を観察用ディッシュに包埋した。その後、ディッシュに培地を添加して、神経前駆細胞の動態を観察するために、共焦点顕微鏡 FV-1000 を用いて 10 分間隔 20 時間の撮影を行った。pCAG-EGFP-3NLS を遺伝子導入することで、核を可視化して細胞の追跡を行った。Ngn1/2 あるいは Lzts1 を導入した組織では、遺伝子導入されていない細胞（EGFP-3NLS 陰性）を観察するために、その可視化には脂溶性蛍光色素 FM4-64（細胞膜を染色）を用いた。

結　果

1. 発生の進行に伴う脳室帯の厚みと細胞密度および核運動速度の変動

細胞生産パターンの転換が起きる胎生 11 日から 13 日にかけて、核運動が起こる脳室帯の「場」としての変化を調査するために、免疫組織学的に脳室帯の厚みと細胞密度を計測した（図 1）。その結果、既報［4］でもあるように胎生日数の増加に伴い頂端―基底軸に沿った脳室帯の厚みは増加傾向にあり、細胞密度もまた増加傾向にあった。脳室帯の厚みの増加は核運動の距離を増加させることから、運動に費やす時間を増加させる要因と考えることができる。脳室帯はほぼ神経前駆細胞の細胞体でその体積が占められており、細胞密度の上昇は核運動の速度を物理的に制限する要因となることが予想される。大脳組織の組織培養を用いて、神経前駆細胞における核の動態を観察すると、胎生日数の増加に伴い運動速度が有意に減衰することがわかった。発生の進行に伴う脳室帯の状況変化は、核運動に費やす時間を変化させる要因の一つである可能性が考えられる。

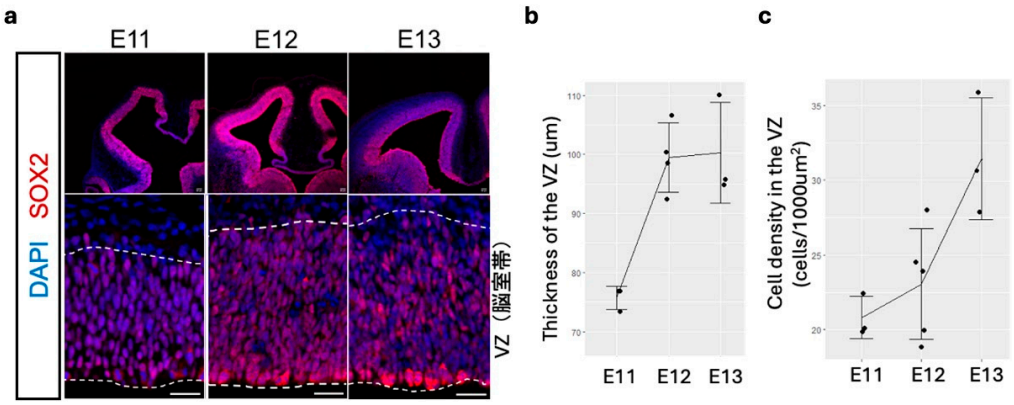


図 1. 発生の進行に伴う脳室帯の厚さと細胞密度の変化

a) 胎生 11 日～13 日目の大脳組織の断面。神経前駆細胞の細胞体（Sox2 陽性、マゼンタ）は脳室帯に集積している（スケールバー：20μm）。

b) 脳室帯の厚さ。

c) 脳室帯内の細胞密度の推移。

2. 薄化した脳室帯では神経前駆細胞の細胞周期長が短縮する

場の状況（脳室帯の厚さ・細胞密度）の変化が核運動に費やす時間を変化させ、その時間変化が細胞周期長にフィードバックされるのであれば、脳室帯の厚みか細胞密度を人為的に操作することで、細胞周期長に変化がもたらされる可能性が考えられる。脳室帯を薄化した場合であれば、核の移動時間が短縮し、細胞周期が短縮することが予想される。

この仮説を検証するために、マウス大脳において子宮内電気穿孔法を用いて Ngn1/2［5］あるいは Lzts1［6］を異所性発現させて、脳室帯上部に分化細胞あるいは離脱した未分化細胞を堆積させることで人為的に脳室帯を薄くした（図 2a）。薄化した脳室帯には、遺伝子導入されていない神経前駆細胞のみが残留することが認められた。薄化した脳室帯の細胞密度はコントロールと比較して有意な差は見られなかったため、単純に核運動に費やす距離が短縮したことになる。薄化した脳室帯内で核運動を行う細胞において細胞周期の短縮が見られるか調査するために、EdU と BrdU による時間差ラベリングを行った。両化合物は DNA 合成中の細胞のゲノム DNA 内に取り込まれるため、S 期細胞をラベルすることができる。最初に、胎生期のマウス大脳に対して Ngn1/2 あるいは Lzts1 を遺伝子導入し、その 40 時間後に EdU を投与して最初の S 期細胞をラベルし、それから 10 時間後に BrdU 投与を行った。この時、EdU でラベルされた細胞（Ngn1/2、Lzts1 ともに陰性）が細胞周期を一周させ、2 ラウンド目の S 期に突入していれば、EdU と BrdU のダブル陽性細胞として観察される。結果は、Ngn1/2 および Lzts1 の導入により薄化した脳室帯において、EdU と BrdU のダブル陽性の神経前駆細胞の数が有意に増加した（図 2b）。これは予想通り、S 期への再突入のタイミングが早まり、結果的に細胞周期長の短縮が認められたことを意味している。

さらに、G1 期長の短縮の有無を調査するために、FlashTag と EdU による時間差ラベリングを行った。FlashTag は M 期の細胞のみをラベルすることが可能で、そこから分裂した細胞の追跡を行うことができる。胎生期のマウス大脳に対して Ngn1/2 を遺伝子導入し、そこから 30 時間後に FlashTag によるラベルを行い、さらに 4.5 時間後に EdU 投与を行った。この時、FlashTag と EdU のダブル陽性となる細胞は誕生から 4.5 時間以内に G1 期を通過して S 期を迎えたことになる。コントロールと比較して薄化した脳室帯では、ダブル陽性となる細胞の割合が有意に増加した。これにより脳室帯の薄化に起因した G1 期長の短縮が示された。また、組織培養法を用いたライブ観察により、薄化した脳室帯における核運動の移動速度を計測した結果、コントロールと同等の数値を示した。同観察において、薄化した脳室帯では細胞が誕生してから脳室帯の最上部に到達するまでの時間が顕著に短いことが認められた。脳室帯上端までの到達時間の短縮が G1 期長短縮の原因である可能性が示唆された。

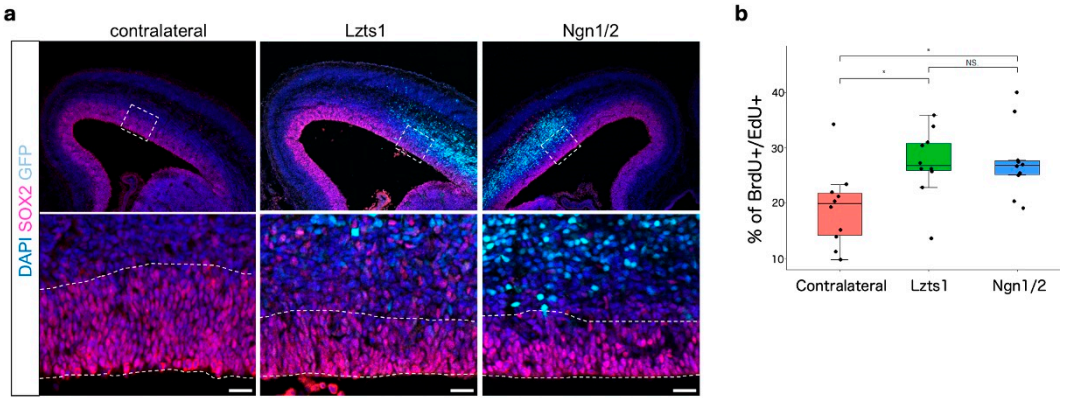


図 2. 薄化した脳室帯では細胞周期長が短縮する

a） Ngn1/2 および Lzts1 を導入した脳室帯は薄化した（スケールバー：20 μ m）。

b） 薄化した脳室帯では 2 ラウンド目の S 期に突入した細胞（EdU と BrdU のダブル陽性）の割合が増加した。値は mean±SEM。Ngn1/2 : P＝0.00014、Lzts1 : p＝0.0056（Mann-Whitney U-test）。

3. 薄化した脳室帯に存在する神経前駆細胞における細胞運命選択

既報では神経前駆細胞の G1 期長が短い場合、優先的に未分化細胞が生産されると報告されている。脳室帯を薄化した大脳組織における神経前駆細胞の分化度を調査するために、免疫組織学的な手法を用いて解析を行った。胎生期のマウス大脳に対して Ngn1/2 あるいは Lzts1 を導入し、そこから 40 時間後に EdU を投与し、さらに 10 時間後に組織を固定し、分化マーカーである Tbr2 の免疫染色を行った。計算上、EdU でラベルされた細胞は 2〜6 時間以内には細胞分裂を行い、そこから誕生した娘細胞が分化を選択した場合、その細胞は Tbr2 を呈する。つまり EdU 陽性の細胞が Tbr2 を呈するか否かを判別することで、誕生した細胞の分化度を計測することができる。解析の結果、薄化した脳室帯では未分化性（Tbr2 陰性）を示す神経前駆細胞の割合が有意に増加することが示された（図 3a、b）。既報［2, 3］にあるように G1 期の短縮に伴い、細胞の運命選択に変化が生じることが認められた（図 3c）。

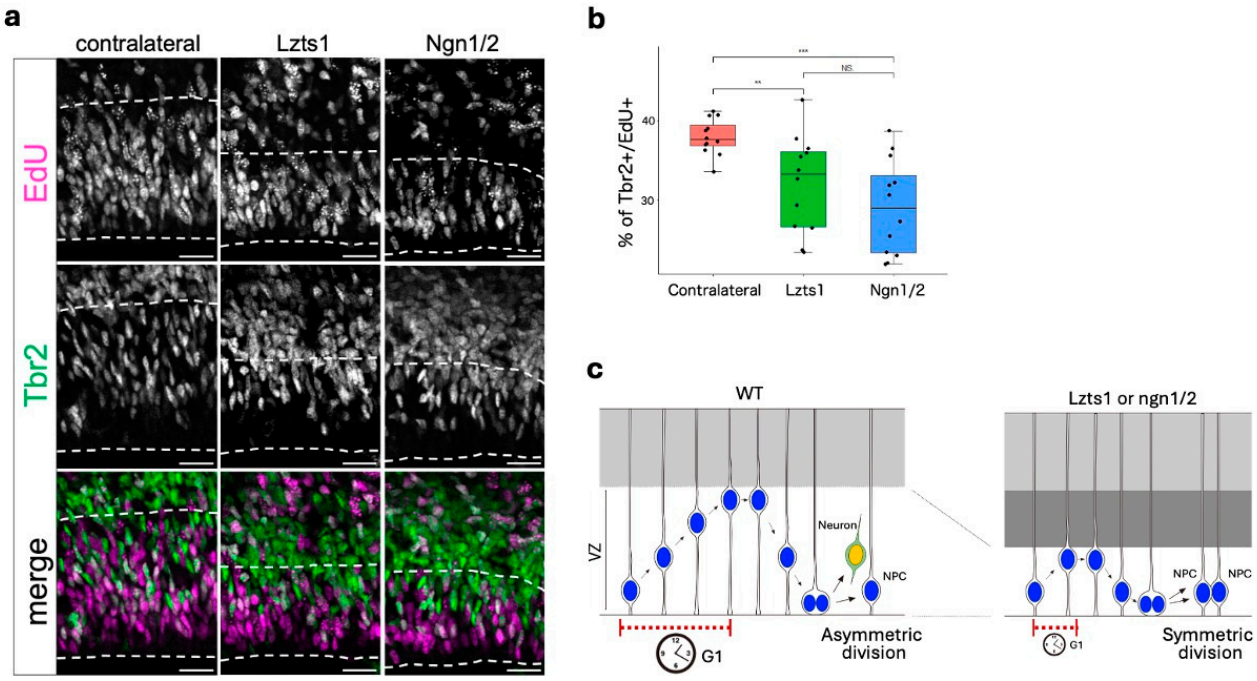


図 3. 薄化した脳室帯では未分化細胞を生産割合が増加する

a) EdU を投与して 10 時間後に Tbr2 で免疫染色した大脳組織（スケールバー：20 μm）。

b) 薄化した脳室帯において、誕生した細胞（EdU 陽性）が未分化を呈する（Tbr2 陰性）が増加。値は mean±SEM。Ngn1/2：p＝0.011、Lzts1：p=0.014（Mann-Whitney U-test）。

c) 薄化した脳室帯における G1 期長と細胞産生パターンの変化を示したモデル図。

考　察

本研究により、神経前駆細胞において核運動に費やす時間が G1 期長を規定し、最終的な細胞運命選択に影響を及ぼすことが明らかとなった。細胞周期の進行は内在的にある程度は決められているが、付加的に、核運動の進行が時々刻々と変化する核の移動距離や細胞密度といった周囲環境の情報を与え、細胞周期の進行へフィードバックされている可能性が示唆された。つまりこのモデルでは、核運動は細胞周期に対して時計のような役割があり、周辺環境の物理的な変化がその時計の進行に影響することを提唱している。

薄化した脳室帯において、神経前駆細胞の核が脳室帯上端へ到達する時間が短縮したことと、G1 期が短縮し

てS期エントリーが早まったことから、脳室帯上端への到達がG1-S期移行の引き金となる可能性が示唆された。この移行に関する詳細な分子機構を解明する必要がある。また、G1 期の短縮が未分化細胞の生産へ傾倒する理由も明らかでない。この 2 点は本質的な核運動の意義を理解する上で重要であり、その解明は今後の課題である。

文　献

1) Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. Cell. 2008 Feb 22;132(4):583-97. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.007. PMID: 18295577.

2) Lange C, Huttner WB, Calegari F. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. Cell Stem Cell. 2009 Sep 4;5(3):320-31. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.026. PMID: 19733543.

3) Calegari F, Huttner WB. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. J Cell Sci. 2003 Dec 15;116(Pt 24):4947-55. doi: 10.1242/jcs.00825. PMID: 14625388.

4) Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS Jr. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. J Neurosci. 1995 Sep;15(9):6046-57. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-09-06046.1995. PMID: 7666188; PMCID: PMC6577667.

5) Kawaue T, Sagou K, Kiyonari H, Ota K, Okamoto M, Shinoda T, Kawaguchi A, Miyata T. Neurogenin2-d4Venus and Gadd45g-d4Venus transgenic mice: visualizing mitotic and migratory behaviors of cells committed to the neuronal lineage in the developing mammalian brain. Dev Growth Differ. 2014 May;56(4):293-304. doi: 10.1111/dgd.12131. Epub 2014 Apr 9. PMID: 24712911; PMCID: PMC4477914.

6) 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. doi: 10.1038/s41467-019-10730-y. PMID: 31239441; PMCID: PMC6592889.