

神経前駆細胞のエレベーター運動：
ライブイメージング・モデリングを活用した組織内細胞運動の理解
Interkinetic Nuclear Migration of Neural Progenitor Cells:
Understanding Cellular Migration in Tissue Based on Live Imaging and Modeling

小 曾 戸 陽 一

Yoichi Kosodo

川崎医科大学・解剖学教室

要 旨 近年の光学顕微鏡及び組織培養技術の発展により、生組織内での細胞運動を経時的に観察する研究が盛んになってきた。本稿では、胎生期脳の神経前駆細胞が示す細胞周期依存的な核運動（エレベーター運動）を解析した研究を紹介する。マウス胎児脳組織を用いた定量的タイムラプス測定、シミュレーション解析などにより、G2期にアピカル表層に向かう細胞核移行は微小管細胞骨格の細胞周期依存的な制御が必要な「能動的」運動であることに対し、G1期の逆方向の核移行は組織中の細胞密度勾配に従った「受動的」な運動であることが示された。これにより、エレベーター運動の最大の特徴である「胎生期脳の上皮組織の恒常性」と「個々の細胞運動」との調和が保たれる仕組みを説明する新規メカニズムが、見出された。本稿ではライブイメージング・モデリングの一例として、組織内での細胞運動解析に用いられる手法を紹介し、またそこから得られる新たな細胞運動のコンセプトについても論じていく。

キーワード：細胞核運動、定量的タイムラプス解析、シミュレーション、脳形成、神経発生

1. はじめに

生体組織内において多くの細胞は、その多少はあるものの、移動を行う。細胞が移動することは、生命現象にとって重要な意義を持つ。例えば、発生の段階では、同種・異種の細胞が特定の方向性を持って移動を行うことで、組織が構築されていく。また、成体組織においては、細胞移動が起こることにより新旧の細胞が入り替わることが可能となり、組織形態・機能の恒常性が維持される。組織内の細胞移動について、がん細胞・マクロファージなど組織構築の枠組みとは別に転移・遊走する細胞については以前より研究が進められてきたが、近年、正常組織の構築および維持における細胞移動の仕組み・意義について、理解が進んできている。組織内の細胞移動研究の進展には、光学顕微鏡イメージングおよび組織培養技術の進展が必須であり、それらの技術革新から、生体組織の細胞が移動・形態変化していく細胞運動の過程を経時的に観察することが可能となってきた。このような背景から、細胞が移動するための基本的な分子装置が見出されてきたが、さらに組織内の細胞移動を詳細に観察することで、細胞移動に関する新規的なメカニズムが提案されてきている。本稿では、

このような細胞移動に関するイメージング技術の活用、また新たなコンセプトを示す一例として、脳ができてくる過程で神経細胞を生み出す細胞である神経前駆細胞が示す、細胞周期という時間軸に連れた細胞核運動である「エレベーター運動」の作用機序に関する研究¹⁾を紹介する。本研究を遂行する上で用いた手法である、定量的な生組織内細胞運動イメージング、および実験とシミュレーションモデリングの相互依存的なアプローチは、今後様々な組織内細胞挙動研究に活用していくことが可能であると考えられる。これらの手法から得られた解析結果から、一般的な細胞運動がモーター蛋白質の働きによる能動的なものであることに対し、エレベーター運動のうち一方の細胞核運動に関しては、組織内で他の細胞から受ける物理的な「混み合い効果」による受動的なものであることが見出されてきた。以下に、その研究過程を紹介していく。

2. 胎生期の脳形成について

2.1 脳の形成と神経前駆細胞

脊椎動物の脳はヒトでは約1000億個の神経細胞から形成される複雑な組織であり、特にヒトなどの高等哺乳類における大脳皮質の構築原理は今後の脳研究分野において解明すべき重要な課題である。大脳皮質は、胎生期に神経前駆細胞から作られる神経細胞によって構成される。神経前駆細胞が持つ特徴として、脳発生初期の自己複製的増殖から、後に神経

〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577
TEL: 086-462-1111
E-mail: kosodo@med.kawasaki-m.ac.jp
2012年8月17日受付

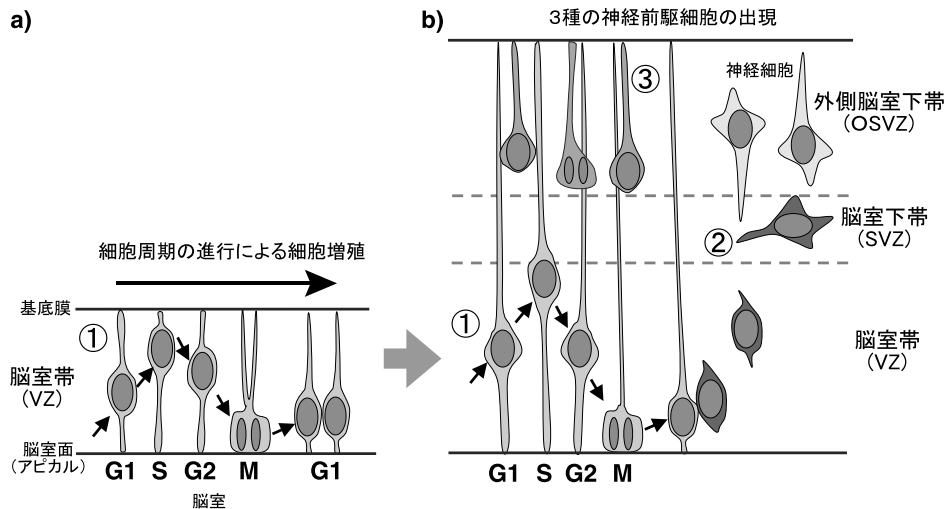


図1 哺乳類大脳皮質の形成過程. a) 神経発生前期, b) 神経発生中・後期. ①~③は, 以下の神経前駆細胞種; ①神経上皮細胞. エレベーター運動を行う(矢印). 脳室帯(VZ)に存在. ② Basal Progenitor 細胞. 脳室下帯(SVZ)領域において, 対称的分裂により神経細胞を産生する. ③ oRG 細胞. 主に高等哺乳類の外側脳室下帯(OSVZ)に存在し, 非対称分裂により神経細胞を産生.

細胞への分化という細胞運命の転換が起こることが挙げられる(図1a)→b)). 近年の研究から, 高等哺乳類には3種の神経前駆細胞の存在が示されている(図1). 1つ目の細胞種として, 細胞体が「脳室帯(VZ)」と呼ばれる胎生期脳組織において最も脳室(発生学的に神経管に由来する脳内の空洞)に近い部分に存在し, 形態的にはアピカル-基底膜軸に沿って二本の細胞突起を持つ「神経上皮細胞(放射状グリア細胞を含む)」(図1①)があり, ゼブラフィッシュからヒトに到るまでの脊椎動物種全般において神経細胞を産生する²⁾. 2つ目の細胞種として, 2004年に報告があった「Basal (Intermediate) Progenitor」(図1b②)が挙げられる^{3~5)}. この細胞種は, 「脳室下帯(SVZ)」に存在し, 顕著な細胞突起を持たない細胞で, 特に哺乳類大脳の神経発生中期以降に多く観察される. また, 最近の報告から^{6,7)}, ヒトなどの高等哺乳類の胎生期大脳の「外側脳室下帯(OSVZ)」で神経細胞を産生する, 基底膜方向にのみ一本の細胞突起を持った「oRG細胞」(図1b③)と呼ばれる3種目の神経前駆細胞の存在が明らかになった. 興味深いことに, その形態学的な違いは細胞突起の形成能力にあるといえ, 3種の神経前駆細胞を判別する基準の一つとなっている⁸⁾.

神経細胞が産生される際に, 上記の細胞種①及び③は, 一つの「神経前駆細胞」から「神経前駆細胞」「神経細胞」が一つずつ生じる「非対称・幹細胞的分裂」を示し, また細胞種②は二つの「神経細胞」を生む「対称・分化特異的分裂」を示す. また, 細胞種①「神経上皮細胞(放射状グリア細胞)」は, 細胞種②および③の起源となる細胞であり, 脳形成の過程でその数を十分に増やすための増殖的分裂を, 脳室帯のアピカル(脳室側)表層で行う(図1a). 神経前駆細胞の分裂位置は細胞運命と深く関わると考えられ, その局在機構を知ることには「脳形成の仕組み」を解明する上で重要である.

2.2 神経前駆細胞のエレベーター運動

「エレベーター運動」と呼ばれる細胞内核運動は, 神経前駆細胞の細胞分裂位置決定メカニズムに関わる鍵といえる. 神経前駆細胞の細胞核が細胞周期に連れて脳組織内を往復運動する「エレベーター運動」は, 1935年 Sauer によりその概念が提唱され, 1960年前後に実験的に証明された. 具体的には, 神経前駆細胞の「幹細胞的分裂」は脳室帯アピカル表層(図1, 下方)で起こるが, その細胞核は「細胞周期」に従って組織内を往復運動する. アピカル表層で細胞分裂(M期)が起こり, その後のG1期で基底膜側方向に細胞核が移行する. DNA合成期であるS期に細胞核は脳室帯の基底膜側に局在し, その後のG2期間に核は再び基底膜側からアピカル側に逆方向に移行する. エレベーター運動は, 神経前駆細胞のみならず多くの多細胞生物種の, 主に発生過程に見られる細胞運動である. 表1に, これまでにエレベーター運動の存在が報告されている生物種・組織を挙げる⁹⁾.

この運動の作用機序の研究は以前から試みられてきたが, エレベーター運動の最大の特徴である「組織構造の秩序を保ちつつ, 細胞周期に従った」核移行という観点では, 本質的な機構の解明がなされていない. 私は共同研究者と共に, エレベーター運動のメカニズムを解析するため, 先端的手法を活用した包括的な解析を試みた.

3. エレベーター運動機構解明のための研究

3.1 エレベーター運動の定量的タイムラプスイメージング

宮田らによって確立された胎生期マウス脳のスライス培養法により¹⁰⁾, 組織中の神経前駆細胞の細胞核の挙動はタイムラプス観察を行うことが可能である. 本手法を活用し, まず我々は, 胎生期脳におけるエレベーター運動を時空間的にできるだけ正確に記述することを試みた. 運動する細胞核を標識するため, 細胞核に移行するシグナルを付加した GFP 蛋

表1 エレベーター運動が報告されている種・組織

種	組織	細胞移動の駆動力	文献
ヒト	脳・その他	—	Fujita et al., 1960
マウス	脳	B → A ダイニン ; A → B アクチン	Schenk et al., 2009
		B → A ダイニン ; A → B 反作用力	Kosodo et al., 2011
	網膜	—	Saito et al., 2003
	肝臓原基	—	Bort et al., 2006
	小腸	—	Grosse et al., 2011
ラット	脳	B → A ダイニン ; A → B キネシン	Tsai et al., 2010
ニワトリ胚	脳	微小管/アクチン	Langman et al., 1966/Meisser et al., 1974
	網膜	—	Pearson et al., 2005; Becker et al., 2007
ゼブラフィッシュ	後脳	B → A アクチン ; A → B 反作用力	Leung et al., 2011
	網膜	B → A アクチン ; A → B 反作用力	Norden et al., 2009
ショウジョウバエ	羽原基	アクチン	Meyer et al., 2011
ネマトステラ	外胚葉	微小管/アクチン	Meyer et al., 2011; Nakanishi et al., 2011

A ; 頂端側 (Apical), B ; 基底膜側 (Basal).

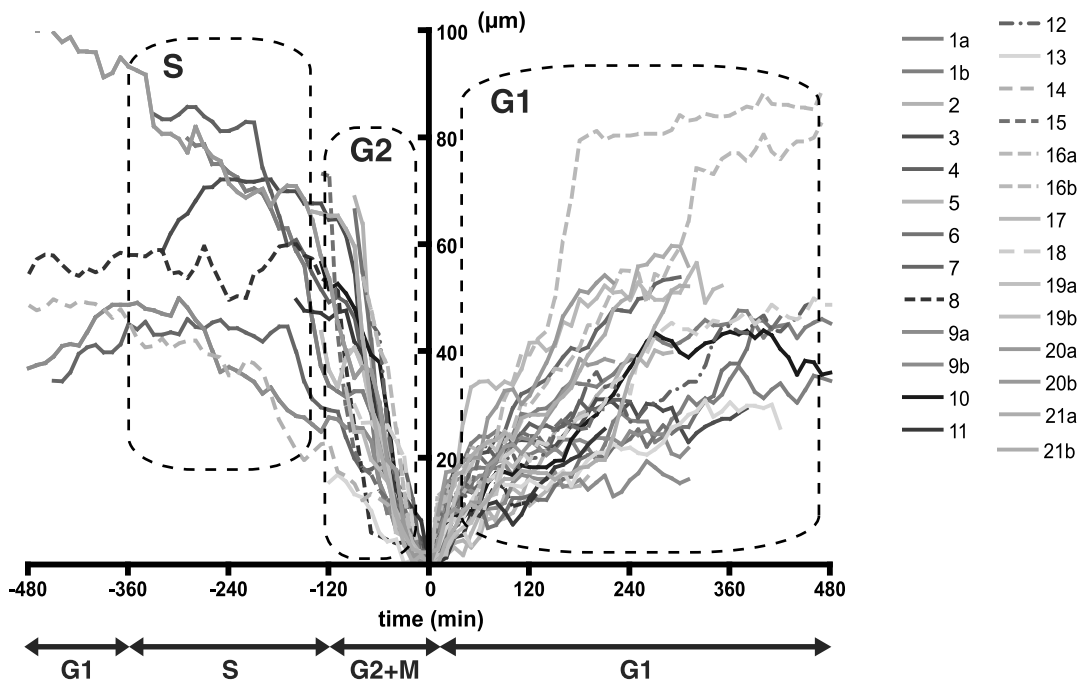


図2 胎生期マウス脳のスライス培養組織を用いたエレベーター運動の定量的タイムラプス解析. X軸は経過時間(細胞分裂時を原点(0)とした), Y軸はアピカル面からの距離を示す. 各時間に対応する細胞周期は, 固定マウス胎児脳組織を用いた先行研究に従った¹⁷⁾.

白質を発現する遺伝子を, 子宮内電気穿孔法により^{11,12)}, 胎児脳の脳室に面する神経前駆細胞に導入した. 取り出した胎児脳から生組織スライスを顕微鏡試料として作製し, 蛍光顕微鏡を用いた多点タイムラプス解析を行った. 得られた画像では, 神経前駆細胞のエレベーター運動の特徴である組織内での細胞核の往復運動が認められた. さらに, 馬場昭次博士により開発された動画画像中の輝点の軌跡追跡のためのトラッキングソフトウェア“Bohboh”を活用し, 動画画像内の細胞核の経時的な位置情報を数値化した(図2). このような定量的解析を行うことで, エレベーター運動は単に細胞核が上下運動するだけではなく, 移動方向に応じて特徴的な挙

動を示すことが見出された. まず, 細胞分裂前のG2期には, 細胞核は基底膜側からアピカル側に移動するが, その際に比較的早い直線的な動きを見せる(図2, 囲み内G2). また, 細胞分裂後のG1期には, 核はアピカルから基底膜側に移動するが, 細かい振幅で行ったり来たりしながら徐々に基底膜側に移動することが特徴的であった(図2, 囲み内G1). さらに, G1期からS期にかけて基底膜側に移動する距離は細胞核によって相当の開きが見受けられた(図2, 囲み内S).

3.2 エレベーター運動のG2期の能動的細胞核移動

上述の定量的タイムラプス解析の結果から, 往復運動を行うエレベーター運動について, それぞれの方向に向かう核運

動が顕著に異なる動きを見せたことから、その動作を制御する仕組みがそれぞれ特異的である可能性が考えられた。先行研究から、G2期の基底膜→アピカル方向への移行には、微小管・中心体が関わるのが近年報告されてきている¹³⁾。これらの知見から、この方向の細胞核運動には微小管細胞骨格系が重要であると考えられたが、最も鍵となる点である「アピカル方向への核移行がG2期に起こる」機構は不明であった。我々はこの点について、「微小管細胞骨格が細胞周期依存的に構造の制御を受けることで、G2期にダイニン等のモーター蛋白質による細胞核の運搬能力が増大し、アピカル方向への核移行能力が増加する」という作業仮説をたて、細胞生物学的な検証を行った。具体的には、細胞周期依存的に微小管構造を制御するタンパク質であるTpx2について実験的検討を行うことで、エレベーター運動への影響を観察した。

Tpx2は、培養細胞の結果と同様¹⁴⁾、神経前駆細胞においても蛋白質の発現がG1期には見られず、G2-M期に特に強く発現していた。内源性Tpx2の蛍光抗体染色法による観察、またGFPを結合したTpx2蛋白質を発現する遺伝子を神経上皮細胞に導入し、生理学研究所の超高圧電子顕微鏡でその局在を観察したところ、Tpx2蛋白質は細胞周期のG2期の神経前駆細胞のアピカル側突起に局在することが見出された。次にTPX2遺伝子に対するRNA干渉を組織内の神経前駆細胞に対し行ったところ、G2期細胞核の基底膜側からアピカル側への移動が阻害された。さらに我々はTpx2がどのように微小管細胞骨格系を制御するかについて検討を進めるため、スピニングディスク型共焦点顕微鏡(CSU X-1, 横河電機)を用いた生組織イメージング及び電子顕微鏡観察を行い、神経前駆細胞の微小管細胞骨格がG2期においてG1期よりも、より束ねられるという構造変化を見出したことから、Tpx2がG2期に微小管細胞骨格を取束させる役割を担っていることが示された。

3.3 混み合い効果によるG1期の受動的細胞核移動

細胞同士が密接した組織である神経上皮組織では、細胞核が移動する際に、他の核を物理的に押しつける「混み合い効果(crowding effect)」が考えられた。我々は、細胞が能動的にアピカル面に集積することで、組織内における「細胞密度勾配」が形成され、G1期の細胞核運動がその密度勾配に従って生じるとの作業仮説を提唱した。組織内密度勾配の存在の実証、更に観測を行うため、胎生期の脳組織内に「蛍光マイクロビーズ」を導入し、ビーズが密度勾配に沿って移動する様子についてタイムラプス観察技術を用いて観測した。本目的のため、下記の通り磁性蛍光マイクロビーズの脳組織(脳室帯)内への新規的な取り込み技術を開発した。具体的には、胎生期マウス脳の内腔面に磁性を持った蛍光ビーズを付加し磁力を付与することで、アピカル表面から脳組織内にビーズを取り込ませた。さらに、細胞核を蛍光蛋白質により標識することで、取り込まれたビーズの挙動と実際の細胞核のエレベーター運動を同一組織内で比較した。その結果、時間経過と共にビーズが脳室帯の基底膜側領域に集積したことか

ら、「組織内密度勾配」の存在が示唆された。また細胞周期の阻害剤を用いて組織内の神経前駆細胞の細胞周期をS期で停止することで、基底膜からアピカル側への能動的な細胞核運動を停止させたところ、蛍光ビーズの基底膜側への移動が阻害されることが見出された。さらに、蛍光ビーズのみならずG1期の基底膜側へのエレベーター運動についても同様に核の移動が阻害されたことから、神経前駆細胞の細胞核の基底膜側への移動が、G2期の核がアピカル側に移動することに起因する“反作用・受動的”な細胞挙動であることが示された。

3.4 シミュレーションモデルを用いたエレベーター運動の解析

上述した、細胞周期に連動した「能動的」及び「受動的」な作用でエレベーター運動が進行するモデルを検証するため、木村暁博士(遺伝学研究所)との共同研究により細胞核エレベーター運動のシミュレーションの構築を行った。シミュレーションの主な条件として、1)それぞれの細胞核が細胞周期を持つこと、2)G2期の細胞核が「基底膜側からアピカル側」への能動的な移動(タイムラプス観察で実測された1.0 μm/分)を行うこと、3)細胞核同士は重ならず接近により互いに押し合うこと、を設定した。本シミュレーションを用い、実験的アプローチとの相互依存的な解析を行った。

シミュレーションから得られた細胞核の挙動をプロットしたところ、実際のタイムラプス観察で見られる「基底膜側からアピカル側への移行(G2期)→「アピカル表面での細胞分裂(M期)→「アピカル側から基底膜側への移行(G1-S期)」という一連のエレベーター運動の流れが観察された。重要な点として、タイムラプス解析の結果(図2)で示された、①G1期細胞核がアピカルから基底膜側に移動する際に細かい振幅で行ったり来たりしながら徐々に基底膜側に移動すること、また②G1期からS期にかけて基底膜側に移動する距離は細胞核によって相当の開きがあることが、シミュレーション上でも再現された。また、胎生期脳組織においては、細胞周期の長さが発生ステージに依存して変化し、それに伴いエレベーター運動の進行状態も変わる。この特性を活用し、エレベーター運動の単位時間あたり移動距離をシミュレーション上で予測し、胎生期脳組織における実験にて検証したところ、細胞核の移動様式について相同性が認められた。以上、本研究で行ったシミュレーションー実験の相互依存的な解析から、G2期にアピカル方向への“能動的”な細胞核移行が起こることで上皮組織内での「混み合い効果」が生じ、G1期には基底膜側方向への“反作用・受動的”な細胞核の移動が起こることが呈示された。

3.5 エレベーター運動の作用機序・意義に関する考察

本研究により、エレベーター運動の最大の特徴である、胎生期脳の上皮組織の恒常性と個々の細胞運動との調和が保たれる仕組みを説明するメカニズムが見出された。本研究で示したエレベーター運動のモデルに関して最も新規的な点は、G1期のアピカル→基底膜方向の核運動は、組織内の混み合

い効果による受動的な作用であることを示した点である。このメカニズムについては、我々と同時期にゼブラフィッシュの網膜を用いて Norden らにより行われた独立の研究でも提唱された¹⁵⁾。興味深いことに、彼女らが観察したゼブラフィッシュの網膜では、G2期の基底膜→アピカルの能動的な運動は、微小管細胞骨格ではなくアクチン-ミオシン（アクトミオシン）系による細胞運動であることが報告されている。アクトミオシン系によるエレベーター運動の制御は、ショウジョウバエの羽原基でも示されており¹⁶⁾（表1）、様々な種・組織で見られるエレベーター運動について、その制御システムに関する進化的考察を行うことが今後期待される。

エレベーター運動の進行が胎生期の脳形成にどのように影響するか、について多くの研究者が注目している。その切り口の一つとして、ヒトの遺伝性小頭症（microcephaly）が中心体に関連する蛋白質をコードする遺伝子の一遺伝子変異で起こることを活用したアプローチが考えられる。エレベーター運動の進行にはアピカル面に局在する中心体の働きも重要であることから、遺伝性小頭症の原因遺伝子の変異により中心体機能が阻害され、エレベーター運動の進行が影響を受ける可能性がある。その結果、神経前駆細胞からの神経新生が減少することで、最終的に脳形成の異常として表現系が現れることが考えられる。

4. 結 語

本稿では、マウス胎児脳の神経前駆細胞のエレベーター運動に関する研究を紹介した。特に、定量的なタイムラプスイメージング、さらにモデリング・実験を相互依存的に進めていく手法により、複雑な組織内細胞運動の仕組みを解明することが可能になってきていると考えられる。今後、様々な組織における研究例の増加を期待すると共に、我々も新規の知見を提唱していきたい。

謝 辞

エレベーター運動に関する本研究は、多くの共同研究者の

協力により遂行された。特に、末次妙子氏（理化学研究所、イメージング試料作成）、馬場昭次博士（お茶の水女子大学名誉教授・動画トラッキングソフトウェアの提供）、木村暁博士（遺伝学研究所・エレベーター運動のシミュレーション作製）には、多大に感謝する。本研究は、理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・非対称細胞分裂研究グループ及び川崎医科大学・解剖学教室にて遂行された。

文 献

- 1) Kosodo, Y. *et al.*: *The EMBO journal*, 30, 1690–1704, doi: 10.1038/emboj.2011.81 (2011)
- 2) Götz, M. and Huttner, W.B.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 777–788 (2005)
- 3) Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. and Kriegstein, A.R.: *Nat. Neurosci.*, 7, 136–144 (2004)
- 4) Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. and Huttner, W.B.: *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3196–3201 (2004)
- 5) Miyata, T. *et al.*: *Development*, 131, 3133–3145 (2004)
- 6) Hansen, D.V., Lui, J.H., Parker, P.R. and Kriegstein, A.R.: *Nature*, 464, 554–561, doi: 10.1038/nature08845 (2010)
- 7) Fietz, S.A. *et al.*: *Nature neuroscience*, 13, 690–699, doi: 10.1038/nn.2553 (2010)
- 8) Fietz, S.A. and Huttner, W.B.: *Current opinion in neurobiology*, 21, 23–35, doi: 10.1016/j.comb.2010.10.002 (2011)
- 9) Kosodo, Y.: *Cell. Mol. Life Sci.*, 69, 2727–2738, doi: 10.1007/s00018-012-0952-2 (2012)
- 10) Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M.: *Neuron*, 31, 727–741 (2001)
- 11) Saito, T. and Nakatsuji, N.: *Dev. Biol.*, 240, 237–246 (2001)
- 12) Tabata, H. and Nakajima, K.: *Neuroscience*, 103, 865–872 (2001)
- 13) Xie, Z. *et al.*: *Neuron*, 56, 79–93 (2007)
- 14) Gruss, O.J. and Vernos, I.: *J. Cell Biol.*, 166, 949–955 (2004)
- 15) Norden, C., Young, S., Link, B.A. and Harris, W.A.: *Cell*, 138, 1195–1208 (2009)
- 16) Meyer, E.J., Ikmi, A. and Gibson, M.C.: *Current Biology: CB*, 21, 485–491, doi: 10.1016/j.cub.2011.02.002 (2011)
- 17) Takahashi, T., Nowakowski, R.S. and Caviness, V.S., Jr.: *J. Neurosci.*, 15, 6046–6057 (1995)