

主論文の要旨

**Differences in the Mechanical Properties of the
Developing Cerebral Cortical Proliferative Zone
between Mice and Ferrets at both the Tissue
and Single-Cell Levels**

〔マウスとフェレットでの発生期大脳皮質の細胞増殖領域における
組織および細胞レベルでの力学特性の違い〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
機能形態学講座 細胞生物学分野

(指導：宮田 卓樹 教授)

長坂 新

【目的】

組織の形態形成過程においては、構成する細胞の増殖や移動といったふるまいが、化学的要因だけでなく力学的要因に応じて制御され、その集合・総和が大きな「組織」レベルでの変形・伸長を担うことが知られつつある。しかし、「力学的要因に対する細胞応答」の原理・機構を理解する前提として求められる「組織」を対象とする力学的特性の定量的把握は、技術的に困難なためこれまであまり普及していない。

発生期の哺乳類における脳原基は、apical 面と basal 面を結ぶ細長い形態をした神経前駆細胞によって構成されている。特に apical 面近傍域は、神経前駆細胞の細胞周期進行に伴う核移動や細胞分裂が行われるとともに、アクトミオシンに裏打ちされた adherens junction に基づく apical 面の収縮といった力学的な負荷が生じうる環境となっている。これまでの所属研究室での研究から、神経前駆細胞の密度や形、核の動き方がマウスとフェレットで異なることが分かっており、apical 面近傍域の力学的要因の差が観察された細胞挙動差を引き起こしている可能性が示唆されていた。そこで本研究では、原子間力顕微鏡 (AFM) による弾性率 (硬さ) 測定を中心とする一連の解析により、マウスとフェレットの apical 面近傍域の力学的状況を比較し、弾性率差の理由を明らかにすることを目指した。

【方法および結果】

神経前駆細胞のふるまいの違いが分かっているマウスとフェレットの脳原基 apical 面に対して、AFM を用いて弾性率の測定を行った (Fig. 1A, B)。その結果、マウスよりもフェレットの方が硬いことが分かった (Fig. 1C)。さらに、この硬さの違いの原因を探るために種々の定量的計測を行い以下の結果を得た。①細胞骨格は組織の硬さを担う一因であると考えられることから、ミオシン II や微小管の阻害剤を添加した上で同様に apical 面の弾性率を測定した。その結果、どの阻害剤存在下であっても弾性率の値は低下するが、マウス < フェレットという大小関係は変わらなかった (Fig. 2)。② apical 面に存在する収縮力にマウスとフェレットで違いがあるのかを調べるために、laser ablation を用いて apical 表面の切断・破壊実験を行った (Fig. 3A)。切断端の離れる速度がほぼ同じであったことから、apical 面の収縮力にマウスとフェレット間の差は検出されなかった (Fig. 3B)。③ apical 面を構成する微小構造に違いがあるのかを調べるために電子顕微鏡を用いて adherens junction の構造を観察したところ、マウスとフェレットでその構造に大きな違いはなかった (Fig. 4)。④組織を構成する細胞に違いがあるのかを調べるために、マウスとフェレットの細胞レベル (単離した神経前駆細胞) での弾性率を測定したところ、組織での測定結果とは逆に、マウスの方がフェレットよりも硬いことが分かった (Fig. 5A, B)。また、阻害剤存在下であってもその関係性は変わらなかった (Fig. 5C)。さらに、細胞の大きさはマウスの方がフェレットよりも大きかった (Fig. 5D)。⑤細胞の密度は組織の硬さの一因になると考えられることから、apical 面近傍域における神経前駆細胞の apical 突起の占有率を測定したところ、マウスよりもフェレットの方がその割合が大きく、逆にマウス

では細胞体の占める割合が大きかった (Fig. 6)。以上の結果から、「マウス<フェレット」という apical 面弾性率差は、神経前駆細胞の突起部 (細長いファイバー様) がどの程度密に apical 面を構成するか (密度: マウス<フェレット) が規定すると判明した。

【結論】

AFM を用いることによって、脳原基内の力学的要因のひとつを「硬さ」という指標で初めて定量化することが出来た。さらにマウスとフェレットの間で硬さの差を見だし、その理由を明らかにした。また、組織での計測と個々の細胞での計測を行った結果、組織の硬さは細胞の硬さの単純な積算ではないことを明らかにした。

本研究で行った AFM を用いた硬さ測定は、脳原基のみならず、他の器官や組織に対しても行うことが可能である。このような定量的な測定で得られた数値は、組織内に存在する力学的要因と細胞のふるまいとの関係を調べるための基礎的な情報として有用である。