

## 細胞集団の移動における Notch シグナルの機能

名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻 神経形成シグナル  
伊藤 素行

### 1. 背景

我々を含む多細胞生物は多種多様な形や機能をもつ細胞から成り立っている。このような秩序だった組織・器官をもつ個体が形成されるには、発生過程で、必要な時期に必要な場所でのみ、各細胞の増殖、分化、移動を制御する仕組みが重要である。しかしながら、脊椎動物における複雑な個体発生の仕組みは、依然として、不明な点が多く残されている。発生過程の細胞の分化や細胞移動機構は、単一細胞の解析研究だけでは、解明することができず、“細胞間シグナル相互作用”を含めた解析や適切な“in vivo モデル”を用いた解析が必要である。このような in vivoでの細胞分化や細胞移動を伴う器官形成のモデルとして、本研究では、ゼブラフィッシュの側線感覚器官を対象とした。側線器官は魚類、両生類の体表面に見られる水流を感知する感覚受容器官であり、耳の原始器官であると考えられている<sup>1</sup>。側線器官は、比較的単純な構造を持ちながら、水流を感知する有毛細胞、有毛細胞からのシグナルを中枢神経系に伝達する神経細胞、有毛細胞の周りに存在する支持細胞等、複数の細胞種から構成される。ゼブラフィッシュ側線器官形成は、神経や有毛細胞の分化とそれら細胞集団の移動が同時並行的に行われ、かつ、約24時間で完了する早い過程である。また、側線器官は体表面近くにあるため、観察が容易であり、早い発生とあわせて、タイムラプス観察が容易な器官形成の優れたin vivoモデルである。しかしながら神経細胞、有毛細胞、支持細胞の時空間レベルでの側線器官形成の仕組みは不明な点も多く残されている。そこで、本研究では、ゼブラフィッシュ側線器官を構成する細胞の発生過程での細胞挙動や時空間レベルでその発生を制御する分子メカニズムの解明を目的とした。

### 2. 研究方法

側線器官を構成する神経や原基細胞を別々に可視化できるGFPトランスジェニックフィッシュ（神経：Tg(neurod:EGFP)、側線原基：Tg(cldnB:lynGFP)）を用い、紫外線により活性化するRFP (PATagRFP)による細胞系譜解析を組み合わせたライブイメージング手法によって、側線器官形成時の細胞の移動や分化過程を解析した。さらに、発生過程で細胞間シグナル伝達を担うNotchシグナルの機能阻害・亢進胚を用いて上記解析を行い、側線器官形成におけるNotchシグナル機能を解析した。

### 3. 結果

i) 側線神経細胞は、分散して生まれた後、集合して、神経節を形成する。

側線神経は、他の末梢神経と同様、神経の集まりである神経節として観察されるが、その神経節を構成する細胞がどのように生み出されているかは不明であった。我々は、側線神経細胞でGFP蛍光を発するTg(neurod:EGFP)胚を用いて、側線神経細胞の発生過程のタイムラプス観察を行った。その結果、側線神経細胞は、最初、分散した場所で生じた後、集合し、神経節を形

成する事が分かった (図 1)。

2) 側線神経細胞数は、Notchシグナルによって制御される。

側線神経細胞が初期に散在して生じることから、Notchシグナルによる側方抑制のメカニズムが神経細胞の分化決定に関与する可能性が示唆された。そこで、Notchシグナルの阻害や活性化による側線神経への影響を検討した。その結果、Notchシグナルの阻害によって側線神経細胞の数が増加する一方、その活性化により神経細胞の数が減少した。このことから、側線神経はNotchシグナルのもつ側方抑制機能によりその発生が制御されている事が明らかとなった。

3) 側線プラコード領域の細胞は移動しながら、側線神経と感覚上皮に分化する。

側線神経細胞と感覚上皮細胞 (有毛細胞と支持細胞を含む) は同一のプラコード領域から発生すると考えられていたが、その詳細は不明であった。そこで、神経: Tg(neurod:EGFP)、側線原基: Tg(cldnb:lynGFP) の両トランスジェニックラインと紫外線により活性化するRFP (PATagRFP) による細胞系譜解析を組み合わせたライブイメージング手法によって、プラコード領域細胞の細胞系譜を解析した (図 2 A)。その結果、プラコード前部の細胞は、神経細胞と感覚上皮の両方に、後部の細胞は感覚上皮の細胞のみになることが分かり、プラコードの前後軸に沿ってすでに運命が決定されていることが分かった。特にプラコード前部細胞が感覚上皮の細胞となる際には、神経細胞と分かれて、後方への細胞移動を伴うことが明らかとなった (図 2 B)。

4) Notchシグナルによって、神経細胞と感覚上皮の運命が決定される。

上記の細胞系譜解析をNotchシグナルの阻害、活性化条件で行い、Notchシグナルが神経細胞と感覚上皮の運命に与える影響を検討した。

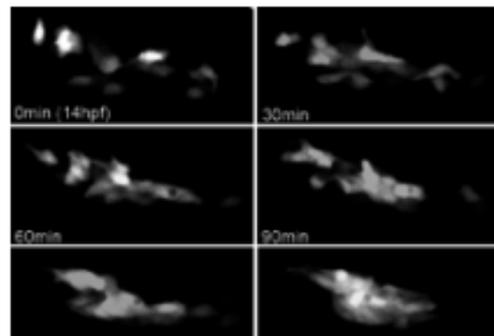


図 1. 側線神経細胞は、最初、分散した場所で生じた後、集合し、神経節を形成する。受精後 14-17 時間でのタイムラプス解析 hpf:hours post fertilization 受精後時間

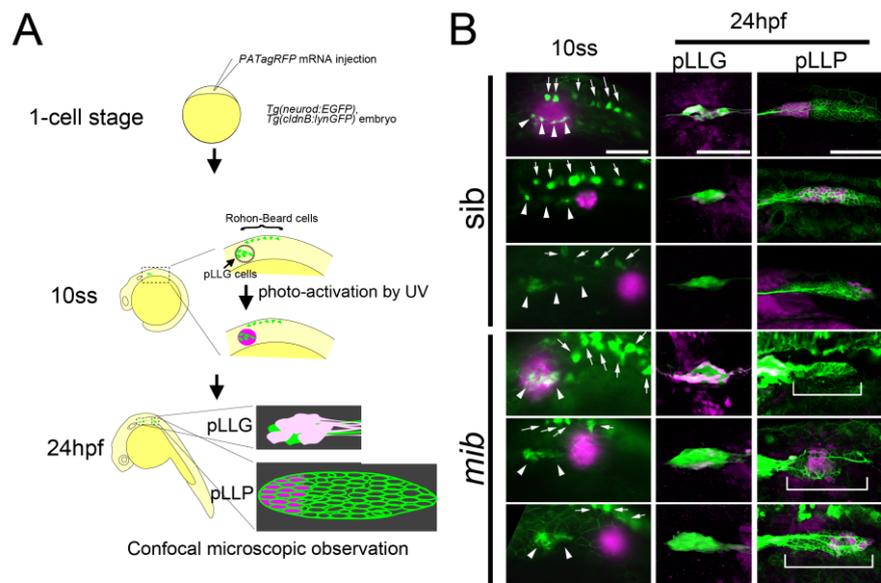


図 2. 側線プラコード領域の細胞は移動しながら、側線神経と感覚上皮に分化し、両者の運命は Notch シグナルによって制御されている。A:細胞系譜解析手法の概略図、B:野生型、mib 変異体における細胞系譜解析の結果 sib:野生型、mib:mib 変異体、pLLG: 神経、pLLP:感覚上皮 左が前部に相当

その結果、プラコード前部の細胞集団は、Notchシグナルの阻害により、神経細胞への分化が増大する一方、上皮細胞（有毛細胞+支持細胞）への分化が減少した（図2B, *mib*）。逆にNotchシグナルの亢進では逆の結果が得られた。

5) Delta-Notchシグナルは、感覚上皮から有毛細胞と支持細胞の運命決定に関与する。

これまでに、有毛細胞と支持細胞の運命決定にNotchシグナルが関わっていることが示唆されていた<sup>2,3</sup>。本研究では、NotchシグナルのリガンドDeltaによるそれら運命決定の関与を検討した。その結果、DeltaA, B, Dの3つのDeltaリガンドの機能阻害により、有毛細胞の数が増加し、支持細胞の数が減少した。このことから、複数のDeltaリガンドが冗長的に両者の運命決定に関わることが明らかとなった。

#### 4. 考察

以上の結果から、将来の側線器官を構成するプラコード領域の前駆細胞は、神経細胞と感覚上皮細胞に分かれてそれぞれ異なった場所に移動することが分かった。さらに、Notchシグナルが前駆細胞からの神経細胞と上皮細胞（有毛細胞+支持細胞）の分化制御、上皮細胞からの有毛細胞と支持細胞の分化制御と、異なるタイミングで連続的に作用することによって、神経細胞、有毛細胞、支持細胞の三種類の細胞の分化が制御されていることが明らかとなった（図3）。

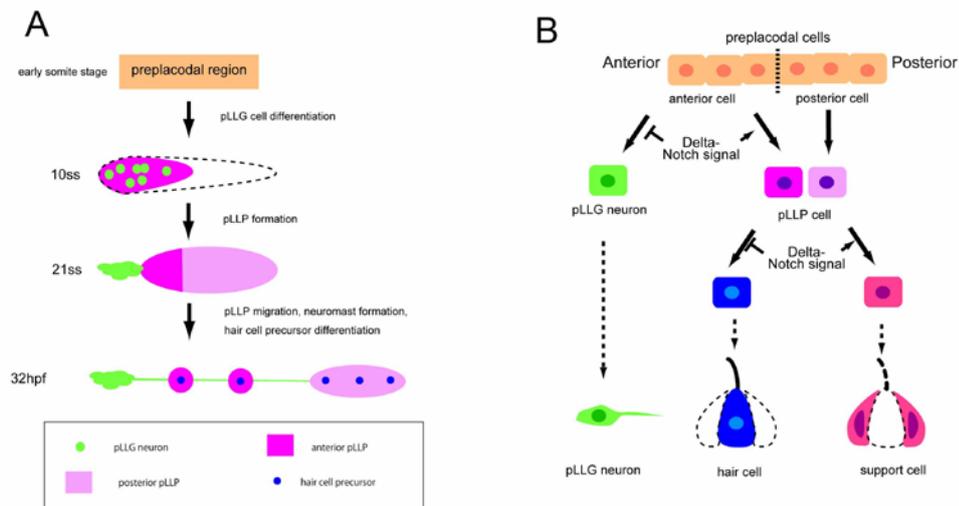


図3. 側線プラコード領域細胞から側線神経、感覚上皮（有毛細胞と支持細胞）の分化のモデル

A: 側線プラコード領域細胞は発生とともに細胞移動しながら、神経、有毛細胞、支持細胞に分化する。B: Notchシグナルは、異なるタイミングで連続的に作用することによって、神経細胞、有毛細胞、支持細胞の三種類の細胞の分化を制御する。

#### 5. 発表論文

Mizoguchi, T., Togawa, S., Kawakami, K. & Itoh, M. Neuron and sensory epithelial cell fate is sequentially determined by notch signaling in zebrafish lateral line development. J Neurosci 31, 15522-30 (2011).

#### 参考文献

1. Ghysen, A. & Dambly-Chaudi re, C. Genes & development 21, 2118 (2007).
2. Itoh, M. et al. Dev Cell 4, 67-82 (2003).
3. Itoh, M. & Chitnis, A. B. Mechanisms of Development 102, 263-266 (2001).