

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22111006

研究課題名（和文）神経前駆細胞の動と静を制御する場と集団の原理

研究課題名（英文）Neurogenesis regulated through three-dimensional cellular movement and cell-cell interactions within the neuroepithelium

研究代表者

宮田 卓樹（Miyata, Takaki）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70311751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 156,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」（動く細胞と秩序）の項目A03「組織から器官へ」に属し、脳細胞の産生源である「神経上皮」において、ヘテロな細胞たちの動きがいかに組み合わせられ、集団として秩序だった三次元構造と細胞産生が秩序だって成立するかを問うた。哺乳類大脳皮質原基に対する全細胞イメージング、細胞動態の定量、力学的解析などを用いた研究を行い、密集性の高い環境下、細胞たちが過剰な混雑を避けるべく巧みに「群集制御」を果たし、そのことが安定的な細胞産生、組織構築に貢献することを見いだした。また、生理的レベルの混雑が効率的集団的移動に利用されていることも分かった。

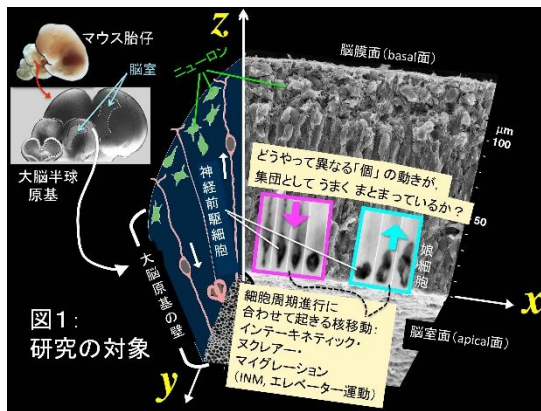
研究成果の概要（英文）：Belonging to the "Cross-talk between moving cells and microenvironment as a basis of emerging order in multicellular system", this research project studied how movements of neural progenitor cells are coordinated to establish the safe and efficient "neurogenesis" (i.e. production of neurons to build a brain structure) without suffering from a "traffic jam" of cells in a narrow tissue-developing space. Using new techniques such as live imaging of all cells, quantitative analysis on trajectories of moving cells, and mechanical experiments, we found that cells are cleverly moving in a manner similar to "staggered commuting" (i.e. one cell goes first then the other follows). If this "crowd control" method does not work during development, brain structure cannot form normally (Nature Neuroscience, 2013). We further demonstrated brain cells' migration strategy is different between mice and ferret, suggesting that control of cellular movements may underlie brain evolution.

研究分野：神経発生

キーワード：脳発生 細胞移動 大脳皮質 形態形成 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

本研究課題「神経前駆細胞の動と静を制御する場と集団の原理」は、新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」(略称:動く細胞と秩序)の項目 A03「組織から器官へ」に属し、脳・脊髄・網膜の基礎となる三次元構造「神経上皮」を対象として、神経前駆細胞の動きが、脳細胞をつくるうえでどのような意義を有しているかを問うことで、動き・ゆらぎの秩序生成への意義を明らかにしようとする領域全体の推進に貢献することをめざした。神経前駆細胞たちが、自身の細長い形態を利用して、細胞周期の進行に合わせて核を反復的に動かす(インターキネティック・ヌクレアー・マイグレーションと称される:英語の頭文字にもとづいて「INM」と略す)(図1)ことに注目した。従来、個別の神経前駆細胞において INM が起きるしくみはある程度分かっていたが、細長い神経前駆細胞たちが無数に束ねられている(カイワレダイコンやエノキ茸のように)状態の三次元組織中で、「めいめいによる INM」が、どうやって「うまくとりまとめられている」のか、全く分かっていなかった。



2. 研究の目的

核移動が集団としてうまく成立するためにどんな機構が働いているかを明らかにする。脳発生にとって秩序だった集団としての核移動がどういう意義を有するか明らかにする。細胞個別の形態が集団としての細胞動態にどのように貢献するか明らかにする。

3. 研究の方法

スライス培養下にマウス大脳皮質原基のなかの神経前駆細胞を、個別に、また全体を蛍光標識して、ライブ観察を行ない、形態変化、移動を定量的に解析した。細胞形態をわざと失わせるような処置を施し、集団としての核移動にどのような影響がでるか調べた。細胞の過剰混雑を力学的に判定する検査を実施実施した。細胞産生の規模でマウスを上回ることが知られるフェレットの大脳原基を用い、細胞動態についてマウスと比較した。

4. 研究成果

(1) 神経前駆細胞による集団的核移動の意義、制御機構の一端(混雑を防ぐ巧みな工夫)を解明した。神経前駆細胞は本来、細長く伸びた形態をしており、脳室面で行なわれる細胞分裂の際に、脳膜側に伸びたファイバーが維持され、娘細胞の片方に相続される。本研究により、ファイバーを相続した娘細胞と「非相続」娘細胞では脳室面から離れる核移動の

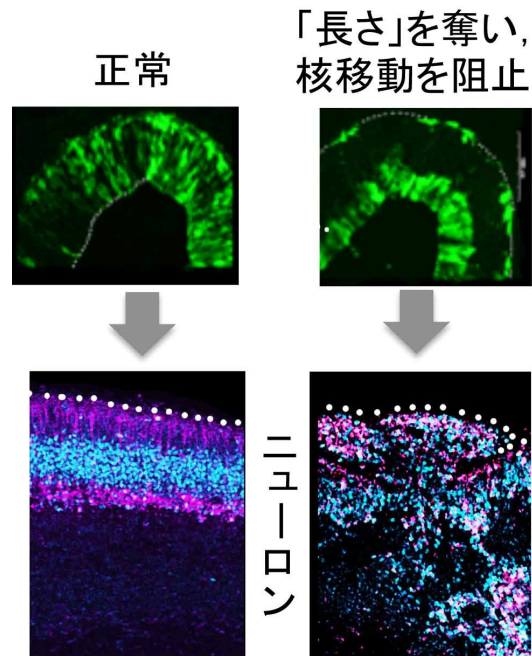


図2

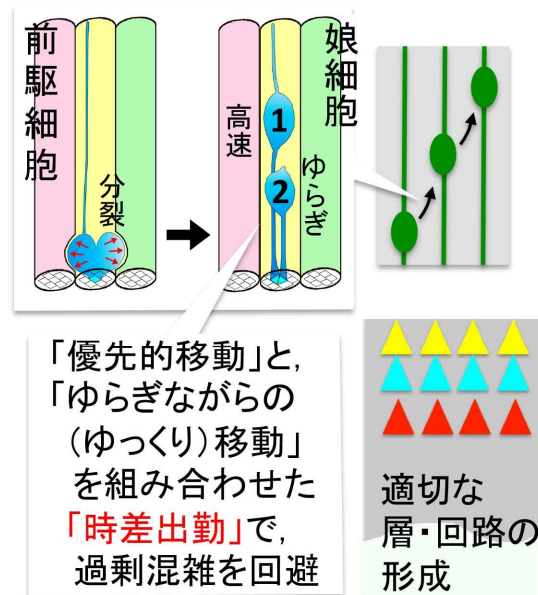


図3

初速が異なることが判明し、「時差出勤」風の「流れの分散化」が脳室面付近の細胞密度を正常に保つことに貢献していると分かった。ファイバーを奪う実験を行なうと、娘細胞核の初動が果たせず、たちまちに脳室面付近に

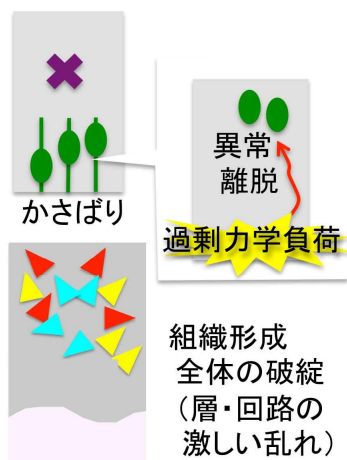


図4

をさせ、片方には逡巡性（ゆらぎ）を含有した遅い動きを行なわせるという戦略性が、大量の脳細胞産生を支えるために高密度集する神経前駆細胞の層に存在すると分かった（図2, 3, 4）。

（2）マウスで判明したこうした「流れ分散」の原理はフェレットにも保存されていたが、一方で、マウスとは異なる点も発見された。フェレットでは、マウスに比して神経前駆細胞層が肥厚・高密度化していたが、核初動がマウスよりも速いと分かった。力学的負荷の度合いに応じて核移動法の修飾が起こる可能性が示唆された（図5）。

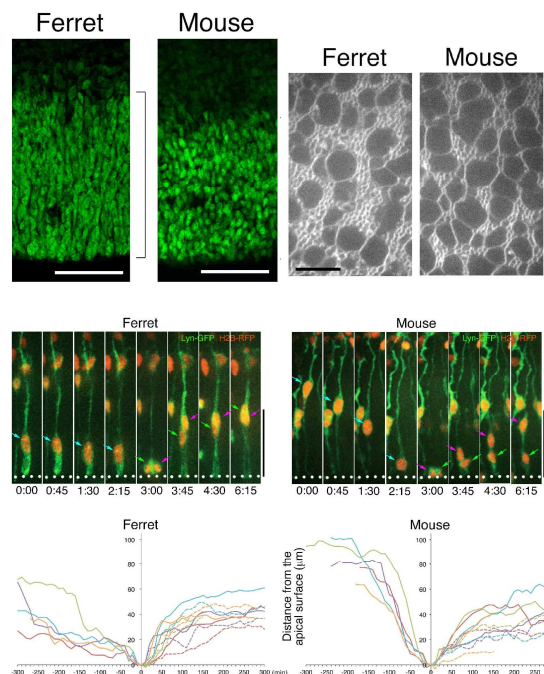


図5

（3）細胞移動と細胞分化の関係を従来なかった精度で解析できるようになるためのツールとして、「少し分化傾向に至ると蛍光を発するようになる」トランスジェニックマウス（Neurog2-d4Venus マウス および

過剰混雑が生じた力学的負荷の増大に起因する異常な細胞離脱、二次的障害としてのニューロン層の乱れに至った。同速度で狭い通路に競合的殺到をするのではなく、片方には形態的優先性をもたせ高速移動

Gadd45g-d4Venus マウス) を新たに作成することに成功した（図6）。これにより、娘細胞の運命決定までにどのような細胞同士の接触があるか、分化傾向を呈した細胞がどのような形態変化によって脳膜側に動くかなど、これまで手つかずであった細胞動態の観察体制を構築することができた。

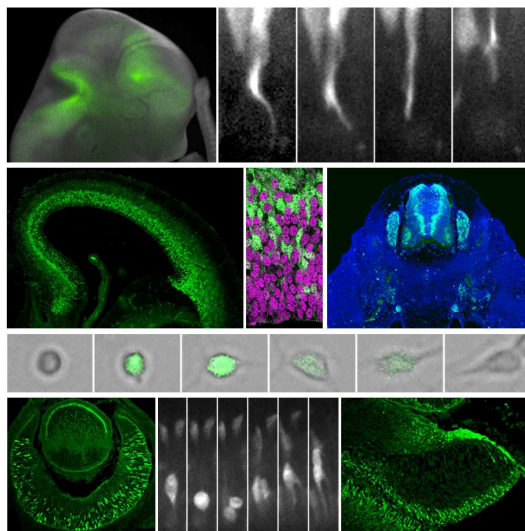


図6

（4）正常範囲の力学的負荷が受動的な核移動を助け、集団レベルの秩序に貢献することを見いだした。「A」では、力学的要因の負の側面（過剰によるリスク）をあぶり出すことができたが、この「B」では、生理的なレベルの混雑が、組織の弾性を生じさせ、秩序だった核移動に積極的に貢献すると分かった。分裂細胞が膨らむ際に弾性に富む周囲組織に力を預け、分裂終了時に誕生した娘細胞の核が、その「親細胞が預けた・託した」力を受け取ることで、受動的に脳室面から離れる、ということを見つけた。組織弾性には、細胞の流入、脳室面の収縮性によるファイバー群の側方圧縮など多くの細胞による動的挙動が貢献していることも判明した。分裂細胞（M期細胞）と周囲の非M期細胞が力学的協力（相互扶助）関係にあることも見いだした。全細胞イメージング、力学的実験、数理シミュレーションなどにより、「動きだらけ」の「場」が、集団に秩序をもたらすメカニズムの一端を明らかにした（図7）。

（5）以上、本新学術領域において得られた分野横断的研究協力を通じて、定量解析、力学実験、数理モデル化などを組み合わせ、「群衆力学」的な視点で脳発生を問うという、全く新しい探求を行なうことができた。安全、効率、持続可能性が求められる「大量物流」における同様に、脳という巨大な「細胞建造物・社会」の成立には、細胞集団の動きが「多様に組み合わせられる」ことが重要と分かってきた。本研究がもたらした理解は、「ゆらぎ」の意義をさらに問う基盤となり、今後、

脳の進化や形成不全病態の理解をめざす研究の展開につながるものと期待される。また、バイオメトリックな観点で渋滞学や交通工学などに役立つ知見が得られる期待も持てる。

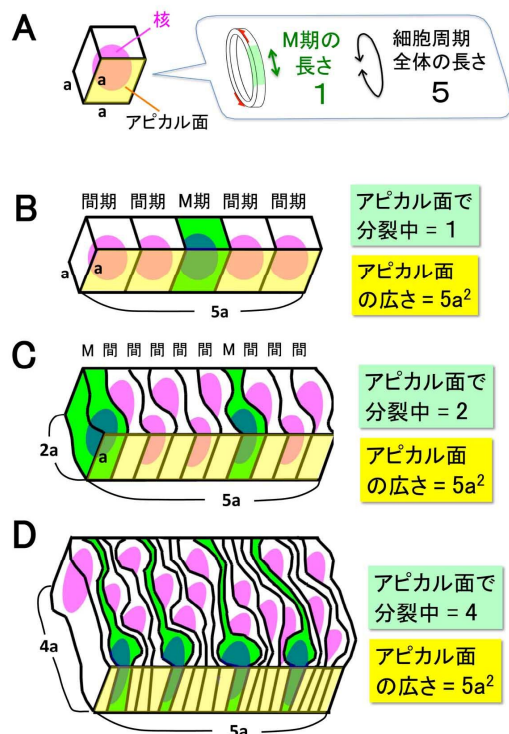


図7

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計19件)

- Okamoto, M., Miyata, T., Konno, D., Ueda, H. R., Kasukawa, T., Hashimoto, M., Matsuzaki, F., Kawaguchi, A. Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. *Nat Commun.* 査読有 20(7), 2016, 11349. DOI:10.1038/ncomms11349.
- Katsunuma, S., Honda, H., Shinoda, T., Ishimoto, Y., Miyata, T., Kiyonari, H., Abe, T., Nibu, K., Takai, Y., Togashi, H. Synergistic action of nectins and cadherins generates the mosaic cellular pattern of the olfactory epithelium. *J. Cell. Biol.* 査読有 212, 2016, 561-575. DOI:10.1083/jcb.201509020
- Miyata, T., Okamoto, M., Shinoda, T., Kawaguchi, A. Interkinetic nuclear migration generates and opposes ventricular-zone crowding: insights into tissue mechanics. *Front Cell Neurosci.* 査読有 8, 2015, 473. DOI:10.3389/fncel.2014.00473, 2014
- Okamoto, M., Shinoda, T., Kawaue, T., Nagasaka, A., Miyata, T. Ferret-mouse differences in interkinetic nuclear migration and cellular densification in the neocortical

ventricular zone. *Neurosci. Res.* 査読有 83, 2014, 25-32.

DOI:10.1016/j.neures.2014.03.011

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.* 査読有 56, 2014, 293-304. DOI:10.1111/dgd.12131

Hashimoto, M., Hata, A., Miyata, T., Hirase, H. Programmable wireless light-emitting diode stimulator for chronic stimulation of optogenetic molecules in freely moving mice. *Neurophoton.* 査読有 1(1), 2014, 011002. DOI:10.1117/1.NPh.1.1.011002

Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamura, S., Takano, T., Ueno, T., Shimada, A., Kozawa, S., Okamoto, M., Shimoda, Y., Oda, K., Wada, Y., Masuda, T., Sakakibara, A., Igarashi, M., Miyata, T., Faivre-Sarrailh, C., Takeuchi, K., Kaibuchi, K. Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 査読有 81(4), 2014, 814-829. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.015

Sakakibara, A., Sato, T., Ando, R., Noguchi, N., Masaoka, M., Miyata, T., Dynamics of centrosome translocation and microtubule organization in neocortical neurons during distinct modes of polarization. *Cereb. Cortex* 査読有 24, 2014, 1301-1310. DOI:10.1093/cercor/bhs411

Ageta-Ishihara, N., Miyata, T., Ohshima, C., Watanabe, M., Sato, Y., Hamamura, Y., Higashijima, T., Mazitschek, R., Bito, H., Kinoshita, M. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. *Nat. Commun.* 査読有 4, 2013, 2532. DOI:10.1038/ncomms3532

Okamoto, M., Namba, T., Shinoda, T., Kondo, T., Watanabe, T., Inoue, Y., Takeuchi, K., Enomoto, Y., Ota, K., Oda, K., Wada, Y., Sagou, K., Saito, K., Sakakibara, A., Kawaguchi, A., Nakajima, K., Adachi, T., Fujimori, T., Ueda, M. Hayashi, S., Kaibuchi, K., Miyata, T. TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding. *Nat. Neurosci.* 査読有 16, 2013, 1556-1566. DOI:10.1038/nn.3525

Sapir, T., Levy, T., Sakakibara, A., Rabinkov, A., Miyata, T., Reiner, O. Shootin1 acts in concert with KIF20B to promote polarization of migrating neurons. *J. Neurosci.* 査読有 33(29), 2013, 11932-11948.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5425-12.2013
Nakamuta, S., Funahashi, Y., Namba, T.,
Arimura, N., Picciotto, M.R., Tokumitsu, H.,
Soderling, T.R., Sakakibara, A., Miyata, T.,
Kamiguchi, H., Kaibuchi, K. Local
application of neurotrophins specifies axons
through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium,
and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein
kinases. *Sci. Signal.* 査読有 4(199), 2011,
ra76, DOI:10.1126/scisignal.2002011
Miyata, T., Ono Y, Okamoto M., Masaoka M,
Sakakibara A., Kawaguchi A., Hashimoto M.
Ogawa M. Migration, early axonogenesis,
and Reelin-dependent layer-forming behavior
of early/posterior-born Purkinje cells in the
developing mouse lateral cerebellum. *Neural
Dev.* 査読有 5, 2010, 23,
DOI:10.1186/1749-8104-5-23

[学会発表] (計 127 件)

Takaki Miyata, Collective interkinetic nuclear
migration and mechanical factors in the
neocortical ventricular zone, EMBO
Workshop "Cortical development in health
and disease" 26-29 April 2015, Rehovot
(Israel)

Takaki Miyata, Nuclear Traffic and
Mechanics under High-degree
Pseudostratification: Lessons from
Mammalian Cerebral Neuroepithelia, The
62nd NIBB Conference "Force in
Development" 17-19 November 2014,
Okazaki Conference Center (Aichi, Okazaki)

Takaki Miyata, Neuroepithelial-cell behaviors
optimizing nuclear crowding during
brain development. The 23rd CDB Meeting
"Building multicellular systems from cellular
cross-talk", 22-23 January 2013, CDB
Auditorium, (Hyogo, Kobe)

Takaki Miyata, TAG1 deficiency-induced
shortening of the apical progenitors causes
abnormal INM, massive heterotopic
cytogenesis, and cortical dysplasia, *Exciting
Biology 2012 "Forces in Biology"*, 4-6
October 2012, Dublin (Ireland)

[図書] (計 7 件)

宮田卓樹, 診断と治療社, 脳神経系の再生
医学 - 発生と再生の融合的新展開 - 再生
医療シリーズ, 2015, 188(50-54)

宮田卓樹, 岡本麻友美, 医学書院, 生体の
科学 (特集「器官の発生と再生の基礎」)
2014, 286(203-207)

宮田卓樹, 学研メディカル秀潤社, 細胞工
学, 2014, 684(590-592)

岡本麻友美, 篠田友靖, 宮田卓樹, 学研メ
ディカル秀潤社, 細胞工学, 2014,
684(645-649)

宮田卓樹, 山本亘彦, 化学同人, 脳の発生
学, 2013, 263(19-33)

宮田卓樹, 朝倉書店, 再生医療叢書: 神経
系, 2013, 192(31-43)

宮田卓樹, クバプロ, プレインサイエンス
レビュー2011, 2011, 245(91-110)

[その他]

ホームページ等

<http://www.takaki-miyata-lab.org/publications/english-papers/>

新聞報道

<http://www.takaki-miyata-lab.org/プレス報道>

中日新聞(H28年4月21日, H25年9月23日), 朝日新聞(H25年10月9日)など.

中 日 朝 日 新聞 2016年(平成28年)4月21日(木曜日)

大脳の細胞に「時計」遺伝子

哺乳類の大脳が細胞分裂を繰り返して発達する段階で、細胞内の特定遺伝子が「時計」のように機能する。時間経過を伝えるためだと、名古屋大学大学院医学系研究科の川口雅乃准教授らのグループが、マウスを使った研究で明らかにした。「細胞は自らの分裂回数を数えて時間を計る」という推測を覆す成果だとする。

グループは、マウスの大脳から、発育時期がさまざまな細胞の遺伝子を一つずつ分析。どこまで進化したのかに関係なく、時間経過に合わせ変化する「時計」のような機能を持つ複数の遺伝子を確認した。

別の遺伝子を操作し、細胞の進化するスピードも、「時計」遺伝子は時間経過に合わせて変化し、細胞は停止期間を飛び越え、進化した正しいニューロンになった。時計遺伝子が何らかの方法で情報を伝えるためという。

一方、一つの細胞を周囲の細胞群から離して単独にするなど、分裂する中でニューロンに分化するのは一部の細胞に限られた。正常な進化は「時計」遺伝子の情報に加え、周囲の細胞も不可欠と分かった。

川口准教授は「分裂前の細胞がほとんどニューロンに準備する手掛かりになる。遺伝子が周囲情報をどう伝えるか、周囲の細胞がどう影響するかも解明したい」と話す。人の大脳の細胞で同じ動きがあるかも研究課題になる。

名大グループ マウスの研究で解明

3 総合12版 2013年(平成25年)9月23日(月)

神経幹細胞 細長さカギ

脳のさまざまな細胞の胎児の脳では、神経幹細胞が、神経幹細胞が盛んに分裂して多様な細胞を生み出す。神経幹細胞は脳脊髄の構造組織を効率的に作る(神経細胞)を生み出す。神経幹細胞は脳脊髄の構造組織を効率的に作る(神経細胞)を生み出す。神経幹細胞は脳脊髄の構造組織を効率的に作る(神経細胞)を生み出す。

脳の構造 効率的に

任助教らの研究グループが外側へ移動して、先天的な脳の病気を知らず、秩序ある手掛かりになる。期待と知られていない。

二、二十日付の米科学誌「ネイチャー・ニューロサイエンス」に掲載された。

宮田卓樹らは、正常なマウスの胎児の脳を使っ た実験で、神経幹細胞をニューロサイエンスに掲載された。

名大グループ てんかん原因解明に道

正常な 神経幹細胞が効率的に移動し、ニューロンの適切なすみ分け、神経回路をつくる。

異常な 長い形を失う、飛散、異常な分裂、短くなった幹細胞の過剰混雑。ニューロンがみられた神経回路になる。

宮田卓樹は「てんかんの脳でも、神経回路の乱れがてんかんの病気の原因の一つです。その詳しい原因の解明につながる可能性があります」と話している。



岡本 麻友美 (OKAMOTO, Mayumi)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教 (H26.6月転出)
 研究者番号：30551965

研究室公開

<http://www.takaki-miyata-lab.org/研究室公開/>



6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 卓樹 (MIYATA Takaki)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：70311751

(2) 分担研究者

なし

(3) 連携研究者

川口 綾乃 (KAWAGUCHI Ayano)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：90360528

榊原 明 (SAKAKIBARA Akira)
 名古屋大学大学・院医学系研究科・助教
 (H27.3月転出)
 研究者番号：20510217

橋本 光広 (HASHIMOTO, Mitsuhiro)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
 (H27.4月転出)
 研究者番号：90311357

篠田 友靖 (SHINODA, Tomoyasu)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：80505652