

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12147

研究課題名(和文) 器官4D計測を起点とした初期脳形態形成の多階層ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Quantitative analysis of tissue and cellular dynamics during early forebrain formation

研究代表者

大塚 大輔(OHTSUKA, DAISUKE)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：40632865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：器官形成過程は異なる階層が相互作用しあう複雑な現象である。本研究課題では組織変形動態解析を起点として、器官形成機構の解明に取り組んだ。ニワトリ前脳領域の初期発生過程に注目し、細胞レベルでの4D計測を行い、変形特徴量の時空間パタンの抽出を行った。その結果、大きな形態変化には組織全体にわたって見られる異方的な変形がその主因子であることが明らかとなった。次に、形態変化を実現する細胞レベルでのメカニズムの研究を行った。細胞の大きさや形状には大きな変化はなく、また細胞の分裂方向も規則性がないことから、方向依存的な組織の変形は細胞集団がその位置を再配列することによって実現されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Brain morphogenesis begins with complex 3D deformation of a simple cylindrical structure called neural tube that is composed of monolayer neuroepithelium in earlier stages. As is the case for many organs, "how microscopic molecular and cellular dynamics are linked to macroscopic organ morphology" remains an open question. Here we focus on the optic vesicle evagination process that is a main morphogenetic event during early forebrain morphogenesis. We constructed tissue-level 3D deformation maps for chicken forebrain morphogenesis. The tissue deformation analysis showed that globally-aligned anisotropic deformation along the medio-lateral axis is the predominant morphogenetic mechanism that occurs throughout the entire period of our focus. To clarify the underlying molecular/cellular mechanisms of this directional tissue stretch, we quantified cellular dynamics and characteristics. These analyses indicated that tissue-level anisotropic deformation is driven by cell rearrangements.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 発生動態 器官形成

## 1. 研究開始当初の背景

ニワトリやヒトなどの脊椎動物の脳は胚発生の初期に1層の細胞集団が管状構造を形成するところから始まる。形成された管状構造(神経管)はその後、領域特異的な形態変化(脳胞の膨出)を通じて脳固有の形態が形成される。複雑な器官形態を形成するには各発生段階において、各細胞が領域特異的な挙動をする事が必要であり、そのような情報を伝える分子として想定されているのがモルフォゲンである。これまでの分子発生学研究においては、モルフォゲン分子の機能を阻害する、または異所的に発現させる事でどのような形態変化が起こるのかが調査されてきた。しかし、通常の発生段階における形態形成動態の定量的記載が行われていない現状では、これらの実験から得られた知見を有効に活用することができず、分子、細胞、組織動態という異なる階層をもつ形態形成過程の理解にはつながらない。器官形態形成機構を明らかにするためには器官固有の3次元形態が作られる過程で、いつ・どこで・どの程度、組織が成長・変形したか、そのすべてを数値的に明らかにすることが必要である。

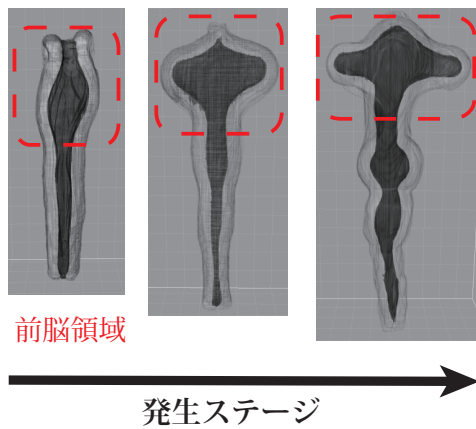


図 1. ニワトリ初期脳発生段階  
2 光子顕微鏡を用いて組織全体を  
3 次元で撮影し、神経管を3次元再構築したもの。

## 2. 研究の目的

器官形成過程の分子、細胞、組織という異なる階層間の相互関係を定量的に明らかにすることを目指して研究を行った。具体的には、まず、これまでにほとんど定量化されていない組織レベルでの変形動態を定量化することから始めた。得られた組織変形情報と細胞動態や既知の分子生物学的知見

との相関解析を行うことで異なる階層間の相互関係を定量的にあぶりだすことを目指した。この研究による成果は発生現象解明への新たなアプローチを提供する。

## 3. 研究の方法

(1) 初期脳形態形成過程の組織変形mapを作成  
解析対象である前脳領域は数千~1万程度の細胞から構成されること、また3次元であることから、全細胞追跡をすることは困難であるため、ランダムかつスパスにラベリングしその軌道追跡を行うこととした。ラベリングの方法としていくつか検討を行った結果、近赤外領域で蛍光イメージングが可能な量子ドットを利用することとした。量子ドット表面にグルタチオン修飾を施すことにより、実際に神経管管腔領域の細胞膜に吸着することを確認した。これにより、ランダムラベリングかつ軌道追跡が可能となった。得られたデータを用いて、数理的手法により変形パタンの抽出を行った。

(2) 組織変形を引き起こす細胞挙動の解析  
組織変形解析から初期脳の形態形成過程においては一方向性の組織伸長が重要であることが明らかとなった。これを実現するための細胞挙動を明らかにするために、細胞形状や細胞の分裂方向に関する解析を行った。

(3) 特徴的な細胞挙動を引き起こす分子動態の解析  
細胞挙動の解析から組織の一方向への伸長においては細胞の配置換えが関与していることが示唆された。細胞の配置換えによる組織の伸長はショウジョウバエの胚帯伸長過程や脊椎動物の神経管閉鎖過程など他の組織においても観察されている。これらの過程では主にリン酸化ミオシンが方向依存性をもって局在することが重要であることが明らかとなっている。本研究においてもこれに従い、前脳領域におけるリン酸化ミオシンシグナルの局在を調べた。

## 4. 研究成果

(1) ニワトリ前脳発生過程における組織変形動態を定量的に明らかにした

得られた軌道データを用いて、数理的手法により変形パタンの抽出を行った。変形は数学的には、

変形前の細胞の位置と変形後の細胞の位置の対応関係を表す、変形写像（あるいは定量的Fate map）によって表現される。いったん組織変形写像が得られると、各発生ステージ・脳の各領域において、局所的な変形特徴量（体積増加率・組織の異方的伸縮の度合い）が計算可能となる。所属研究室では、限られたランドマークデータから変形写像を推定するためのベイズ統計モデルを構築しており、その手法を応用した。図2は推定された変形写像と変形特徴量の時空間パタンの一部を示す。脳初期発生の特徴的な形態変化として、眼胞突出過程に注目すると、突出領域に局限した組織（神経管Apical面）面積の顕著な増加は見られず、前脳領域の広範にわたって、Medio-lateral軸に沿った一方向性の組織伸長が明らかとなった。

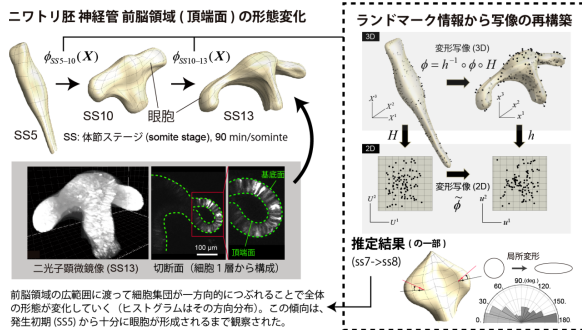


図2. ニワトリ前脳の変形動態解析  
推定された変形写像をもとに組織の各点における局所的な変形量を計算した結果、前脳初期発生における形態の変化は、組織の各場所で細胞小集団が一つの軸方向につぶれることで実現することが明らかとなった。

(2) 細胞の配置替えが一方向的な組織の伸長（変形の異方性）を引き起こすことを明らかにした

次に、組織の一方向への突出を実現する細胞レベルでのメカニズムの研究へとシフトした。これを実現するための次の4つの可能性に着目した：

- ・局所的な細胞増殖
- ・細胞自身の1方向的な伸長
- ・方向性を持った細胞分裂
- ・細胞位置の再配置

まず、上記で行った組織変形動態解析から、局所的な細胞増殖の可能性は否定された。細胞自身の1方向的な伸長の可能性を検討するために眼胞突出過程の前後で細胞形状の比較解析を行った結果、細胞の面積および形状（楕円度）に大きな変化は見られなかった。これにより細胞自身の形状による

組織伸長の可能性は否定された。また、細胞分裂方向に関しても統計をとり、方向性はランダムであることから方向性を持った細胞分裂の可能性も否定された。これにより、細胞の再配列による組織伸長の可能性が強く示唆された。

(3) リン酸化ミオシンが組織の伸長方向と垂直に局在することを明らかにした

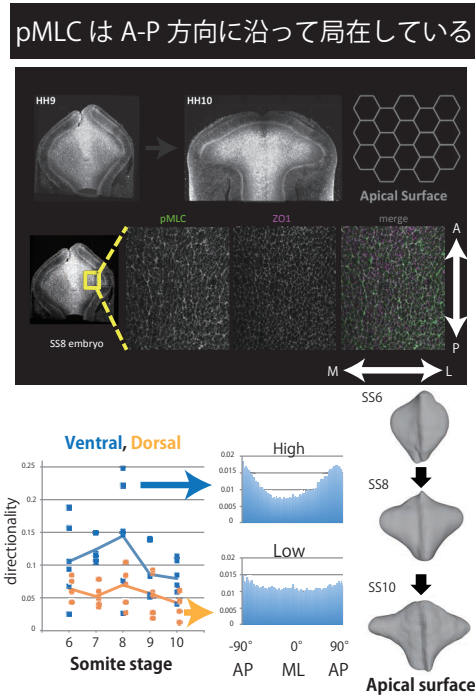


図3. リン酸化ミオシンの局在解析  
ニワトリ前脳の腹側組織において組織の伸長方向と垂直にリン酸化ミオシンが局在することを見つけた。これに対し、背側領域では明らかなシグナルバイアスは検出できなかった。

細胞の配置換えを引き起こす分子機構の解析を行った。細胞の配置換えによる組織の伸長はショウジョウバエの胚帯伸長過程や脊椎動物の神経管閉鎖過程など他の組織においても観察されている。これらの過程では主にリン酸化ミオシンが方向依存性をもって局在することが重要であることが明らかとなっている。本研究においてもこれに従い、前脳領域におけるリン酸化ミオシンシグナルの局在を調べた。その結果、図3に示すように、腹側組織において、リン酸化ミオシンが組織の伸長方向と垂直に局在することを見つけた。これに対し、背側領域では明らかなシグナルバイアスは検出できなかった。この結果と、ミオシンリン酸化阻害によって組織伸長に異常が生じることから、腹側領域におけるリン酸化ミオシンの局在が組織伸長の駆動力となっていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Morishita Y, Hironaka KI, Lee SW, Jin T, Ohtsuka D. : Reconstructing 3D deformation dynamics for curved epithelial sheet morphogenesis from positional data of sparsely-labeled cells. Nat Commun. 2017 May 2;8(1): 15. (DOI: 10.1038/s41467-017-00023-7) 査読あり

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 大輔 (OHTSUKA, DAISUKE)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：40632865

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

森下 喜弘 (MORISHITA, YOSHIHIRO)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00404062