

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15169

研究課題名(和文) 哺乳類胎仔の in vivo ライブ観察系の確立

研究課題名(英文) In utero observation of developing mouse brains

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究「哺乳類胎仔の in vivo ライブ観察系の確立」は、従来の「培養を介した器官観察法」が抱えていた「循環系、結合組織の欠如など、三次元性・細胞組成についての問題」、観察対象が胎仔全身および母体から隔絶される問題を克服すべく、二光子顕微鏡を用いて母体と胎盤でつながったままの胎仔に対するライブ観察系を立ち上げることをめざした。胎生14日目マウスの大脳皮質原基のなかのミクログリアが脳膜に向けて移動する様子を世界で初めてとらえた(論文投稿準備中)。また、子宮内観察に供した胎仔の出産も達成できた。胎生期の母体炎症が脳発生に及ぼす影響をミクログリア動態に注目して研究する基盤が構築された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at establishing an in utero observation technique of mouse embryos. It was necessary to overcome technical limitations in brain slice cultures (i.e., the lack of vasculature, connective tissues, and fetus-maternal interactions). Previous studies that used two-photon microscopes observed tangentially migrating neurons in the cerebral cortex of late-embryonic mice under normal umbilical circulation with their mother mouse, but surgical opening of the uterine wall was required. We established a new technique of in utero observation, in which embryonic day 14 mice could be observed keeping the uterine wall intact. This method allowed us to observe microglial migration into meninges (manuscript in preparation). The in utero observed fetuses grew in utero until heartily delivered. Since microglia respond to maternal inflammations, our technique will contribute to future studies on the relationship between maternal inflammation and brain development.

研究分野：脳発生

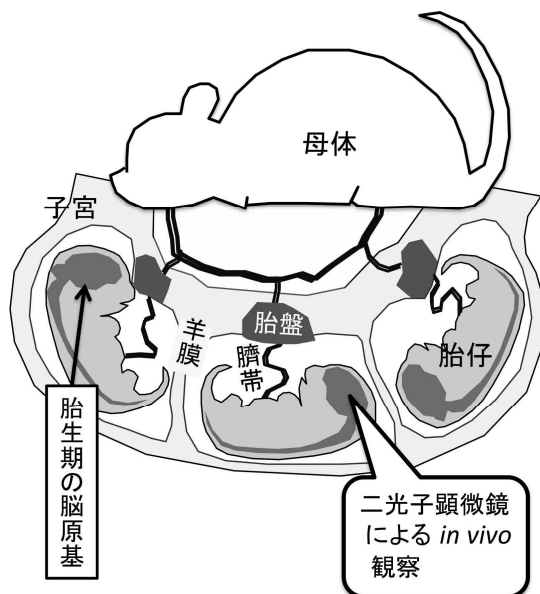
キーワード：脳発生 細胞移動 ミクログリア 脳膜 大脳皮質

1. 研究開始当初の背景

発生・器官形成の原理を研究するには、三次元組織における細胞動態をリアルタイム観察できる手法が有用である。脊椎動物のなかでは、従来、ゼブラフィッシュを用いた研究が真の「*in vivo*」イメージングを行ってきたが、哺乳類では、組織・器官の培養(explant culture や slice culture など)と蛍光標識とを組み合わせることで、「*in vivo*に準じた立体的・三次元的な環境下」での細胞の生育・挙動の解析が果たされてきた。本研究代表者も、脳の形成の原理を知るための研究に「スライス培養」を役立て、細胞の本来の形態、立体環境中での挙動を明らかにしてきた。

しかし「組織・器官の培養」には、いくつかの欠落物がある。まず循環系である。数百ミクロンもの厚みを有する培養スライス等に対する酸素供給には限界がある。一方、脳原基のスライス作成時には脳膜が外れてしまうが、脳膜の意義をふまえた発生過程の理解のためには、脳膜を維持した観察が求められる。加えて、「単離スライス」にしてしまうと、本来は「相当に長い」はずの要素・構造物の「切断」のため、本来のタテ成分・ヨコ成分のからみ合いや、越境的な細胞移動なども影響を受ける可能性がある。さらに、器官局所と胎仔全身、ひいては母体との、循環等を介した交流も失ってしまう。

そこで、こうした種々の「欠落」を回避し、母胎連関を含めた環境因子全般の発生・形態形成への関与を研究する上では、(1)「培養」と「生体内」の差を丁寧に理解し、「培養」を適切に役立てること、そして(2)「母体とつながったままの胎仔を羊膜越し・子宮壁越しにライブ観察する手法」を確立することが求められる。



2. 研究の目的

(1) 二光子顕微鏡を用いて母体と胎盤でつながったままの胎仔に対するライブ観察系を立ち上げる。これが達成できれば、培養だけではとらえきれなかった本来の細胞挙動を理解するための道筋ができることになる。

(2) 脳原基を観察の主対象とし、胎生期で観察した胎仔の出産が可能となるような条件を見いだす。これができれば、胎生期の生理的ないし病的な事象に際して細胞がどうふるまったかを観察した上で、その胎仔が生後にどう成長し、脳やその他の器官内でどのような組織様態に至るのかを継続的に把握することにつながる。これはヒトの胎生期侵襲の生後の児の発達への影響を理解するなどの医学的な取り組みの基盤として有用である。(3) スライス培養と生体内の比較を行ない、組織内の力学的要因に関する差を明らかにする。これは、近年注目されて来ているオルガノイドの形成原理の理解や、人為的な最適化のために貢献することが期待される。

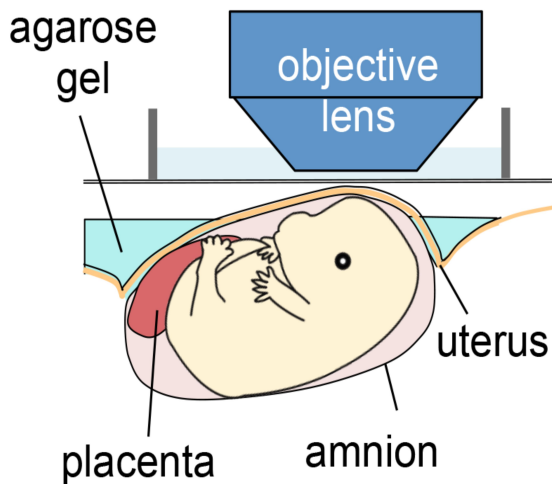
3. 研究の方法

(1) 正立型二光子顕微鏡(名古屋大学医学系研究科の共同利用施設)で胎生 14 日目マウス大脳原基に対して観察条件を最適化した。母体の麻酔後、子宮に対して筋弛緩、卵巣動脈結紮と間膜切断を施したのち、金属性の台座(自作)から伸ばしたネジ式の支持板 2 枚で観察対象の胎仔を含む子宮部位をはさみ付け、粘土で囲ったスペースに寒天を充填・固化させ、さらに上方からカバーガラス(円筒の底部に付着)でごく軽く圧迫するという形式で「胎仔支持」を達成した。子宮壁への外科的措置がないので、通常の出産を期待することができる。胎生期観察は、母体侵襲を最小限にするために、特定の 1-2 匹に限って行なう。母体内の胎仔総数を記録しておき、出産匹数との差がなければ、胎生期観察を行なった仔も含めて全てが出産されたという事になる。(2) スライス培養における三次元性・組織力学的特性と生体内の状況を比較するために、神経前駆細胞の過剰増殖時の反応性に注目し、脳室面(頂端面)からの離脱が起きるか否かを比較する。これにあたり、神経前駆細胞集団に比較的側方への広がり許容されているように見える終脳(大脳皮質原基)とかなり狭小な間脳とで「離脱」反応の大小があるかも検討する。過剰増殖を促す要因として、実験的に Yap の過剰発現を生じさせる。力学特性の把握の手段として、弾性率測定(原子間力顕微鏡によって、押し戻した際の戻りやすさを測定)、組織内残留応力解放試験(もとの脳原基構造をスライスす

ということ自体で、もともとどういう方向にどんな力が働いていたかを伺い知る、微小レーザー照射によって組織表面を瞬間的に切開し、組織断端のリコイルを観察することで、もともと張力がかかっていたかどうかを判定する)を用いて、脳原基の状態を詳しく調べる。

4. 研究成果

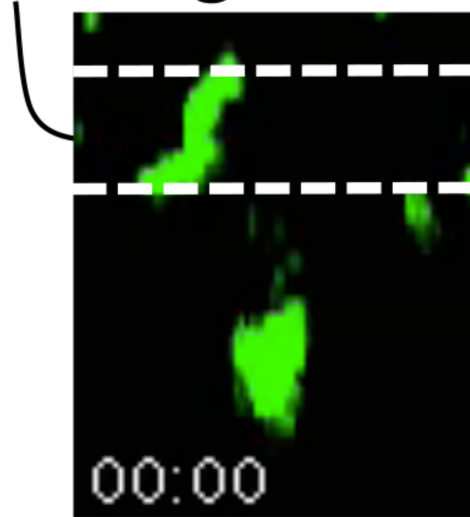
(1) 子宮内胎生 14 日目マウスに対する二光子顕微鏡観察を実施することに成功した。上記「3(1)」の方法(以下の図に模式的に示す)によって、母マウスの体動、子宮血流などによる視野揺動は、ほぼ完全に抑えることができた。大脳壁の最外表面(脳膜面)から 200-300 μm にかけては常に非常に鮮明な画像が、またそれより深い(~500 μm)箇所からも一定レベルの蛍光シグナルを取得できた。この方法は、過去に実施された胎生 16 日目におけるマウス胎仔に対する二光子顕微鏡観察が「子宮壁・羊膜・胎仔頭部皮膚への開窓」という措置を必要としたのに対して、胎仔に対する侵襲は少ない(学会発表, 論文投稿準備中)。



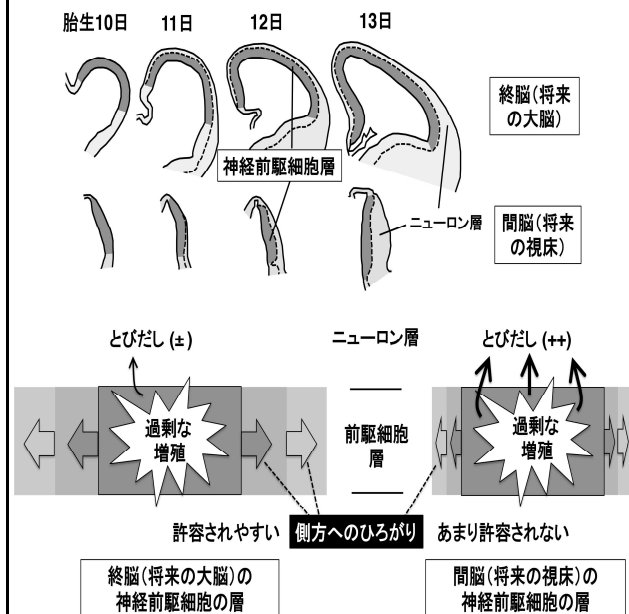
(2) 世界で初めて、大脳皮質原基のマイクログリアが脳膜に移入する様子をとらえることができた。マイクログリアは外科的措置などの組織損傷に反応して動くことが知られており、スライス中での観察だけでは生理的な現象を見ているかどうか判断できなかったが、この子宮内観察によってマイクログリアの脳膜移入が正常な現象であると判明した(論文投稿準備中)。この研究に関連して、マイクログリアがどのようなしくみで脳膜に向けて動いていくのかについての理解も進んだ。脳原基中で発生ステージに応じたふるまいをすることも分かってきた。そして、神経前駆細胞やニューロンが作っていく層に対してじきに応じた親和性を示すことも分かって来た。そして、神経前駆細胞およびニ

ューロンに対して働きかけて、脳の正しい発生に貢献している機構の一端が明らかになってきた(以下の写真は脳膜へのマイクログリアの移動をとらえた子宮内二光子顕微鏡観察の例)。

meninges



(3) 神経前駆細胞の側方へのひろがりが見られるように見える終脳(大脳皮質原基)とかなり狭小な間脳とでは、過剰増殖の負荷を与えた際の「離脱」反応に差が認められた。もともと狭い大脳の神経前駆細胞の方が、速やかに頂端面を離脱してニューロン層に向けてとびだす(「異所的な前駆細胞が生じてしまう」と分かった(論文発表)。このことは、組織内の過剰な力学的負荷に対する感受性・反応性が部域によって異なること、すなわち力学的負荷に対する脆弱性に部域差があることを示唆する。



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3件)

1. Saito K, Kawasoe R, Sasaki H, Kawaguchi A, Miyata T. Neural Progenitor Cells Undergoing Yap/Tead-Mediated Enhanced Self-Renewal Form Heterotopias More Easily in the Diencephalon than in the Telencephalon. *Neurochemical Research*. 査読有 Jan 2018, 43(1): 1-10. DOI: 10.1007/s11064-017-2390-x
2. 宮田卓樹「神経上皮 - 大脳皮質の原構造におけるクラウドダイナミクスと組織力学」生体の科学 特集「大脳皮質 - 成り立ちから機能へ」. 医学書院. 査読無, 2017年2月号 Vol.68 No.1: 4-8. <http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=37356>
3. Nagasaka A, Shinoda T, Kawaue T, Suzuki T, Nagayama K, Matsumoto T, Ueno N, Kawaguchi A and Miyata T. Differences in the mechanical properties of the developing cerebral cortical proliferative zone between mice and ferrets at both the tissue and single-cell levels. *Front. Cell Dev. Biol.* 査読有 2016, 4:139, DOI: 10.3389/fcell.2016.00139

[学会発表](計7件)

1. Yuki Hattori, Yu Naito, Takaki Miyata “CXCL12-mediated zone-specific presence and absence of microglia fine-tune neurogenesis and neuronal subtype specification in embryonic cortex” 第10回NAGOYAグローバルリトリート 2018年2月16日~17日
2. Yuki Hattori, Yu Naito, Takaki Miyata “Microglia in the developing mouse neocortical wall: Their distribution, migration, and potential roles.” *Neuroscience 2017*(第39回日本神経科学大会) 2017年7月20日~23日
3. Tomoyasu Shinoda, Arata Nagasaka, Takaki Miyata, “Production logistics in neurogenesis: Windkessel-like, elasticity-mediated nuclear migration in crowded neuroepithelia” 第50回日本発生生物学会年会 2017年5月10日~13日
4. 内藤 裕「脳膜はマウス大脳原基におけるミクログリアの分布に關与する」第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月28日~30日

5. 服部 祐季、内藤 裕、宮田 卓樹「マウス胎生期大脳におけるミクログリアの分布・移動メカニズムと脳発生への貢獻の可能性」第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日~12月2日
6. Arata Nagasaka, Tomoyasu Shinoda, Takaki Miyata “Mouse-ferret differences in the mechanical property of the developing cerebral cortex: tissue-level and single cell-level assessments” 第54回日本生物物理学会年会 2016年11月25日~27日つくば国際会議場(茨城県つくば市)
7. 内藤裕、服部祐季、宮田卓樹「脳膜はマウス大脳原基におけるミクログリアの分布に關与する」第76回中部支部学術集会 2016年10月8日~9日 信州大学医学部附属病院(長野県松本市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<https://www.takaki-miyata-lab.org/>

6. 研究組織

- (1) 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