

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08489

研究課題名(和文) 力学的観点から問う大脳発生

研究課題名(英文) Elasticity in neuroepithelium supports cortical development

研究代表者

篠田 友靖 (Shinoda, Tomoyasu)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80505652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳の前駆細胞が細胞体を動かすための、全く新しいメカニズムを発見しました。脳室面隣接域で母細胞が細胞分裂するとき、周囲の細胞を押し、変形させます。そして、押しつけられた細胞たちが元の形に戻ろうとする力を娘細胞が受け取り、自身を脳の外側に動かします。この「押しつけられた細胞が元の形に戻ろうとする」という性質を利用する、とても合理的な仕組みが存在することが明らかになりました。この性質を利用した力の受け渡しが、神経系前駆細胞の動く方向に規則性を作り出し、途切れることのない細胞の産生と秩序を持った細胞の積み上がりをつくり出します。このおかげで正しい形に脳がつくることがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「再生医療」の核となるオルガノイドの形成過程では、細胞集団が自立的に秩序立った積み重なりを産み出すことが知られていました。この「自己組織化」の原理は、実はよく判っていなかったのです。本研究で明らかになった「力の受け渡しによる細胞産生・供給方向の秩序化」は、大脳発生のみならず、多細胞の積み重なりにより秩序を与えて組織を形成する過程の一般的な原理のひとつであると思われます。またヒトの脳は本研究でモデルとしたマウスよりも、はるかにたくさんの細胞が積み重なっています。もしかしたら、ヒトの脳ではより効率的で洗練された「力の受け渡し」メカニズムが存在しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Neural progenitor cells (NPCs), which are apicobasally elongated and densely packed in the developing brain, systematically move their nuclei/somata in a cell cycle-dependent manner, called interkinetic nuclear migration (IKNM). Our quantitative cell-biological and in silico analyses revealed that tissue elasticity mechanically assists an initial step of basalward IKNM. When the soma of an M-phase progenitor cell rounds up using actomyosin within the subapical space, a microzone within 10 μm from the surface, which is compressed and elastic because of the apical surface's contractility, laterally pushes the densely neighboring processes of non-M-phase cells. The pressed processes then recoil centripetally and basally to propel the nuclei/somata of the progenitor's daughter cells. Thus, indirect neighbor-assisted transfer of mechanical energy from mother to daughter helps efficient brain development.

研究分野：発生学

キーワード：大脳発生 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生過程では、あらゆる器官・組織において細胞が正確に積み重なり、自立的に三次元の高細胞構造を造り上げる。この際、個々の細胞の動きを注意深く観察すると、細胞たちは互いに接触しながら変形しつつ組織内部を移動し、所定の場所に位置取るように見える。細胞同士が物理的に接触するという事は、その細胞同士の間には力のやりとりが存在するという事を意味する。また、細胞は細胞膜上の接着分子を介して隣接する細胞たちと結合することもある。さらに細胞は内部の細胞骨格を自立的に再構成させて、その形状や物性を変化させることもある。この「細胞たちの間に働いている力」と「細胞内に存在する力」が巧みに組合わさることで、複雑かつ再現性の高い組織・器官形成がなされるのではないかと。このような力学的な観点からの研究が、従来の研究手法では解き明かせなかった「なぜこういう形が出来上がるのか」という問いに答えをもたらしつつある。脳は巨大な器官で、ほ乳類ともなればその形状・構造はかなり複雑である(図1)。脳は神経系前駆細胞(以下、前駆細胞)からなる単層の上皮組織から発生する。前駆細胞から生まれた神経細胞は脳原基の脳膜側(上皮基底面側)に積み上がり、将来の脳壁の大部分を担う。一方、前駆細胞は上皮構造を維持しつつ、その細胞体は脳室面側(上皮頂端面側)の領域(脳室帯)に積み上がるが、これは細胞体が細胞周期に応じて移動することと深い関わりがある。これらの細胞たちの整然とした「積み上がり」こそが、脳の機能を担う構造的バックグラウンドとなっているのである。

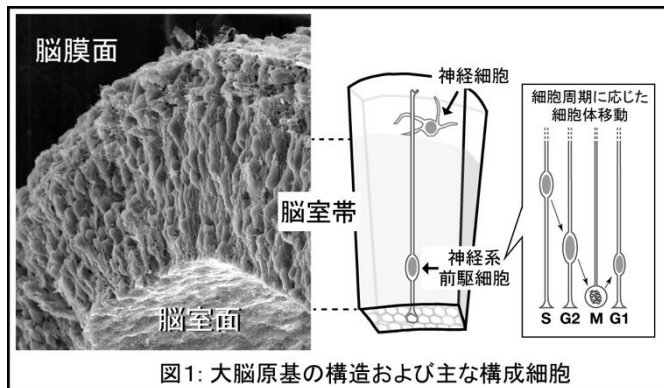


図1: 大脳原基の構造および主要な構成細胞

2. 研究の目的

これまでに研究代表者らは、脳の発生過程において「力」と「積み上がり」の関係性を探求し、脳原基の脳室面近傍域に特徴的な力が存在することを明らかにしてきた(Curr.Biol., 2007; Nat.Neurosci., 2013)。さらに本研究開始時点で、前駆細胞がこの力学的状況を巧みに利用していることを明らかにしつつあった。前駆細胞(母細胞)は脳室面に隣接した状態で細胞分裂を行い2つの娘細胞を産み出すのだが、その周囲を取り囲む前駆細胞たちの突起は大きく座屈させられた状態となる。この突起たちの「まっすぐに戻ろうとする力(復元力)」を娘細胞は利用し、自身の細胞体を脳膜側に移動させるのではないかとという仮説を立て、検証を行っていた。本研究では、この仮説実証に加えて、脳壁のほかの(=脳室面隣接域以外の)領域でも「力」と「積み上がり」の関係性を見出せるのではないかとこの仮説を立てた。これらを通じて「脳原基の細胞たちはどのようにして再現性のあるパターンで積み上がり、機能的な器官を形成するのか」という問いに答えるのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)前駆細胞、神経細胞の物性を把握する。脳壁を構成している細胞の力学的性質(例えば、力を外部から掛けた際の変形しやすさ)を知ることは、細胞の「積み上がり」を考える上で大変重要である。変形し易さを「弾性率」として定量的に測定できれば、ぎっしりと密に詰まった脳壁の構成細胞(図1)の間に存在している力を推定することが可能となる。また、異なる細胞種間(例えば前駆細胞と神経細胞)での、細胞の「固さ・柔らかさ」を定性的に比較検証する。これらの測定は、対象細胞が「なるべく(脳壁内での)本来の形」を維持した状態で実施する。

(2)脳室面隣接域の力学的状態を把握する。前項にて述べたように、脳室面隣接域は「力を溜めている」状態にあると推定される。組織深部の力の存在・大きさを知るためには、原子間力顕微鏡を使うことはできない。したがって、組織や細胞を小さな範囲で破壊し、その直後の周囲の変形量・変形速度を観測することでこれを調べる。この実験にはフェムト秒パルスレーザー照射を顕微鏡観察下で行う。これと同じようにして脳室面隣接域以外の脳領域でもレーザー照射による破壊実験を行い、力の「向き」「大きさ」を把握する。

(3)脳壁形成における「力」の意義を解明する。上記(1)および(2)で得られた情報を元にして、脳壁中の力学的状態を局所的に変化させる。この操作を行った後に脳壁中の細胞の動き・積み重なりを経時的変化を捉えることで、「力」と「脳壁の細胞の積み上がり」の関係性を明らかにする。なお局所性(変化させる領域)は、「細胞ひとつ分」から「脳壁の一部」程度まで多様性を持たせる。これにより「(脳壁内の)ある力学的状態」がどれだけの時間・空間スケールで脳壁形成に関与するかを調べることが出来る。加えて、実験的に実現困難な力学的状態の変化は、数理シミュレーションを活用することで調べる。これには研究代表者らが構築した「前駆細胞の積み上がり数理モデル」を使用する。また、培養下の脳原基に力を加えて変形させた時、内部の細胞たちの動きがどう変化するかを観察することで、より直接的に「力」の脳発生における意義を見出

す。

4. 研究成果

(1)まず脳室面隣接域がどのような力学的状況にあるのかを、フェムト秒パルスレーザー照射による破壊実験にて調べた。脳室面の任意の一点にレーザー照射を行うと照射点の周囲が広がるように変形したことから、脳室面は常に収縮しようとする力を有することが明らかになった(図2左上)。一方、M期前駆細胞の細胞体の中心部にレーザーを照射したところ、周囲の前駆細胞が押し寄せるようにしてM期細胞体を潰していくことが判った(図2右上)。これらの結果は、M期細胞体は周囲の前駆細胞を弾性変形させており、それらから押されていることを示している。これに基づいて、M期細胞体(母細胞)が周囲の前駆細胞を弾性変形させ、弾性変形した周囲の前駆細胞が元の形に戻ろうとする復元力が誕生直後の娘細胞細胞体を脳膜方向に押し上げることが示唆された(図2下)。

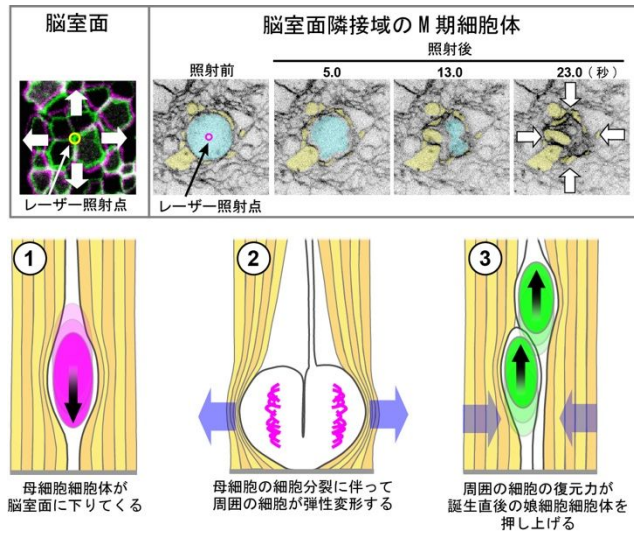


図2. 脳室面隣接域の力学特性

(2)前項の(1)を証明するべく、培養下脳原基を用いた実験を行なった。復元力を取り除くために誕生直後娘細胞ペア周囲の弾性変形した前駆細胞にフェムト秒パルスレーザーを照射し、その後の娘細胞の立ち去りを観察した。レーザー照射によって周囲からの復元力を失った娘細胞細胞体はその場から立ち去ることなく脳室面近傍域に留まり続けたことから、この復元力こそが娘細胞細胞体を脳表面方向に押し上げる要因であることが判った(図3ABC)。さらに、周囲の前駆細胞の復元力を大きくするために、胎生期マウスより切り出した脳壁をコラーゲンゲルに埋め込み、ゲルごと一方方向に約15%圧縮したのち娘細胞の動態を経時観察した。その結果、圧縮後の脳室面隣接域では誕生後の娘細胞細胞体の立ち去りがより早い時刻に生じることが明らかになった(図3DEF)。

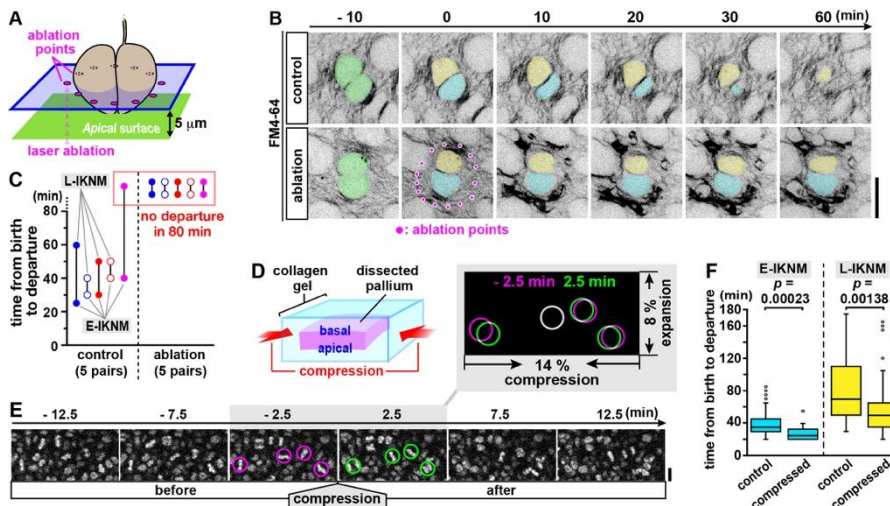


図3. 脳室面近傍域に蓄えられた力は、娘細胞を「押し出す」

(3) 大脳発生における前述の押し上げメカニズムの重要性を調べるため、前駆細胞の集団動態数理モデルを作製した。このモデルでは、脳室帯内部を前駆細胞細胞体がそれぞれの細胞周期に応じて動くように設定した。娘細胞の「押し上げ」に相当する力を含めたシミュレーションを行った場合には、垂直方向（脳室-脳表面方向）の前駆細胞細胞体の積み重なり、脳室面隣接域における細胞体運動の「折り返し」、脳膜側への娘細胞の単一方向的な供給が、すべて経時的に安定して認められた。一方、娘細胞の「押し上げ」を無くしてシミュレーションすると、誕生直後の娘細胞が脳室面隣接域を離れることが出来ず滞留してしまい、後続の母細胞とともに脳室面付近に極度の渋滞状態を生じさせた。更にこれにともなって脳膜方向への娘細胞の供給も絶たれていた。これらの結果は、母細胞から娘細胞への力の受け渡しに起因する娘細胞の押し上げが、神経上皮構造および脳膜方向への細胞供給の継続的な維持に重要であることを示している(図4)。

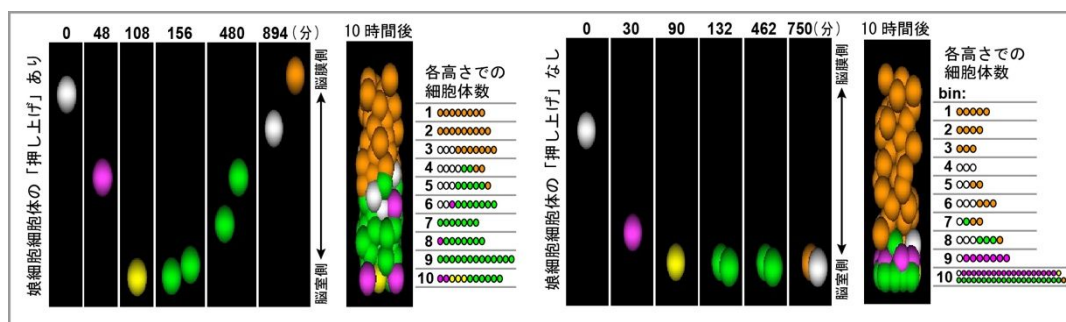


図4. 娘細胞の「押し出し」が、前駆細胞核の積み上がりの鍵となる

(4) 本研究結果は、細胞に備わる弾性という一般的な物性、および神経上皮という組織構造を巧みに利用することで、恐らく最小限のエネルギーで細胞(体)の運動とその方向性に秩序を与える仕組みが発生中の脳に存在することを明らかにした。ヒトの成体の大脳は本研究で用いたマウスと比較するとはるかに厚く、多くのニューロンが積み重なっている。実は胎生期のヒト大脳原基の脳室帯は、マウスのそれと比較して1.3倍程度厚く、脳室-脳膜方向によりたくさんの前駆細胞細胞体が積み重なっていることが判っている。このような「前駆細胞の数の多さ」に加えて、より効率的で洗練された「娘細胞の押し上げ機構」がヒト大脳の成立のために存在している可能性が考えられる。

またオルガノイドの形成過程では、細胞集団が自立的に秩序立った積み重なりを産み出すことが良く知られている。この「自己組織化」の原理は、実は判っていないことが多く残されている。本研究で明らかになった「力の受け渡しによる細胞産生・供給方向の秩序化」が、大脳発生のみならず、多細胞の積み重なり秩序を与えて組織を形成する過程の一般的な原理のひとつである可能性も十分に考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinoda Tomoyasu, Nagasaka Arata, Inoue Yasuhiro, Higuchi Ryo, Minami Yoshiaki, Kato Kagayaki, Suzuki Makoto, Kondo Takefumi, Kawaue Takumi, Saito Kanako, Ueno Naoto, Fukazawa Yugo, Nagayama Masaharu, Miura Takashi, Adachi Taiji, Miyata Takaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2004426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.2004426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 篠田友靖, 川上巧, 宮田卓樹	4. 巻 90
2. 論文標題 神経幹細胞による「他力」活用：集団的核移動の効率と細胞産生の安全	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito Kanako, Okamoto Mayumi, Watanabe Yuto, Noguchi Namiko, Nagasaka Arata, Nishina Yuta, Shinoda Tomoyasu, Sakakibara Akira, Miyata Takaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Dorsal-to-Ventral Cortical Expansion Is Physically Primed by Ventral Streaming of Early Embryonic Preplate Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1567.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.09.075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawasoe Ryotaro, Shinoda Tomoyasu, Hattori Yuki, Nakagawa Mami, Pham Trung Quang, Tanaka Yoshihiro, Sagou Ken, Saito Kanako, Katsuki Satoru, Kotani Tomomi, Sano Akihito, Fujimori Toshihiko, Miyata Takaki	4. 巻 62
2. 論文標題 Two photon microscopic observation of cell production dynamics in the developing mammalian neocortex in utero	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 118 ~ 128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaue T., Shitamukai A., Nagasaka A., Tsunekawa Y., Shinoda T., Saito K., Terada R., Bilgic M., Miyata T., Matsuzaki F., Kawaguchi A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10730-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 篠田 友靖
2. 発表標題 Elasticity-based boosting of neuroepithelial nukleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠田 友靖
2. 発表標題 Elasticity-based boosting of neuroepithelial nukleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠田 友靖
2. 発表標題 細胞間の「力」の授受が、神経系前駆細胞の秩序だった運動と大脳発生に重要である
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoyasu Shinoda
2. 発表標題 Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter.
3. 学会等名 Joint annual meeting of JSDB 51st and JSCB 70th (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinoda Tomoyasu, Miyata Takaki
2. 発表標題 Elasticity in the subapical area maintains neuroepithelial structure in mammalian developing cerebral cortex.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会・全国学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinoda Tomoyasu
2. 発表標題 Novel dynamic lamellipodia-like structures in neural progenitor cells
3. 学会等名 ABiS Symposium 'Forefront and future of electron microscopic imaging' (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>所属研究室HP https://www.takaki-miyata-lab.org/</p> <p>研究トピックス https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/PLOS_B_20180423.pdf</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----