

令和 2 年 5 月 27 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：17K10176

研究課題名(和文)胎生期マウス脳発生の子宮内ライブ観察と分子機構解析

研究課題名(英文)Live imaging and molecular mechanism analysis of mouse embryonic brain development

研究代表者

田崎 加奈子(齋藤加奈子)(saito, kanako)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：50746906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、胎生早期の大脳皮質原基におこる「プレプレートニューロンの横流れ」を見出し、この「流れ」の仕組み及び意義を明らかにした。この「流れ」には、ニューロンの能動的な移動に加え、軸索や細胞体に引張りや押し出しなども関係する事を示唆した。また、プレプレート細胞を死滅させると、放射状ファイバー構造の異常と、その後におこる『大脳皮質領野形成』の縮小が見られた事より、「プレプレートニューロンの横流れ」は大脳新皮質の拡張と再配置に重要な役割を担う事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトの先天性脳疾患の病態解明、および将来的な臨床診断ないし胎児治療の基盤となる知見を得るため、新規なライブ観察・解析の方法を確立するとともに、マウス大脳発生過程において研究代表者らが新たに見いだしたニューロン動態(接線方向移動)をリアルタイムに捉え、ニューロン移動の分子機構や意義を解明することで、胎児医学・先天異常学に新しい方法論と視点を提供できると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study, we elucidated that how the embryonic pallium expands ventrally to form the future cortex and the nature of the underlying force-generating events. We find that neurons born at embryonic day 10 (E10) in the mouse dorsal pallium ventrally stream, thereby superficially spreading the preplate, and then constitute the subplate. The preplate neurons migrate, exerting pulling and pushing forces at the process and the soma, respectively. Ablation of these E10-born neurons attenuates both deflection of radial glial fibers and extension of the cortical plate, which should occur ventrally, and subsequently shrinks the postnatal neocortical map dorsally. Thus, the preplate stream physically primes neocortical expansion and arealization.

研究分野：神経発生

キーワード：大脳発生 ライブ観察 ニューロン移動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類動物胎仔に対する「画像」は、超音波、CT、MRIで「組織」レベルの分解能が得られているが、それを上回る解像度、すなわち「細胞」を単位とする画像取得をリアルタイムで行なうことは少なく、哺乳類における「観察力」の現状は、「非哺乳類」(昆虫、魚類など、胚・胎生期個体のサイズが小さいもの)において分解能・解像度が「単一細胞」の形態、挙動にまで十分に達している状況と比べると、大きく遅れている。

これまで、哺乳類胎仔の器官に対して動的な現象(細胞運動など)の観察を果たすには、たとえば蛍光標識された当該器官を個体から取り出し、有効な断面視をし易いよう加工(スライスし、支持体としてのゲルに包埋するなど)し、三次元培養に供するという方法をとる必要があった。こうして培養下に得られた哺乳類細胞の形態や動態についての情報を「ほぼ生体内の状況を再現するであろう」と解釈・推察してきた、というのがこれまでの取り組み方であった。そこで、本研究は、胎児医学・先天異常学の進歩のために、この問題を解決するため、新規なライブ観察・解析の方法を検討しつつ、これまでに十分な知見の得られていない、胎生早期の大脳発生過程の現象に焦点をあてる。

そのひとつに、従来研究においては「脳原基壁内を法線方向に(脳室面から脳膜面に向けて、壁内をタテ方向に)動くニューロン」に注目して滑脳症やてんかんなどの形成不全が議論されてきたが、本研究は、「ヨコ方向に動くニューロン」を明示し、その挙動の原理と意義の一端を明らかにする。特記することとして、これまで「ヨコ方向に動くニューロン」については「腹側すなわちアゴの側から背側すなわち頭頂部に向けた動き」に関して多数の研究報告があり、これは抑制性ニューロンによると分かっているが、本研究が問うのは、それとは逆向きの接線方向移動、すなわち「頭頂部からアゴの方向に動くニューロン[興奮性と考えられる]」であり、過去に報告が十分になくこれまでの枠組みでは説明しきれなかった病態についての理解が増すものと確信される。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス大脳発生過程において、研究代表者らが予備的解析によってその存在が新しく示唆した大脳皮質原基における「背側から腹側への接線方向(ヨコ向き)ニューロン移動」に注目し、ニューロン動態をリアルタイムに捉えるとともに、ニューロン移動機構解析、この現象の意義(それをなくすと脳全体にどういう影響が生じるか)を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) マウス胎生早期大脳原基への子宮内エレクトロポレーション法(IUE)を用いて、早生まれニューロンへ蛍光の標識を施すことで(図1)、大脳皮質原基背側から腹側に向けて、胎生早期ニューロンが「流れる」様を固定標本及びライブ観察での追跡観察を行なう。

(2) 「胎生早期ニューロンの接線方向への流れ」の機構、意義を明らかにするため、胎生早期ニューロン細胞だけにニューロン移動、軸索伸長に関係すると予測される分子の機能阻害実験を行なう。ジフテリア毒素(DTA)を特異的に取り込ませ死滅されることで、背側腹側への接線方向へのニューロンの流れを減退させる。その後、胎生中期、生後にて、どのような異常をきたすのか観察する。

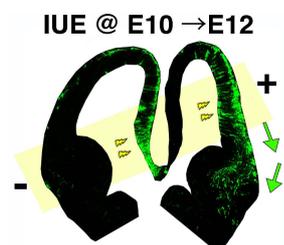


図1 背側領域で誕生した早生まれニューロンの腹側への移動

#### 4. 研究成果

本研究において、胎生早期・中期及び生後のマウス大脳皮質原基を対象として、ライブ細胞動態観察と *in vivo* 機能実験を組み合わせた研究を行い、以下の成果を得た。

##### (1) 「流れ」の発見

大脳皮質原基において胎生早期に生まれる「早生まれニューロン」が、背側から腹側へ向けて「ニューロンの接線方向への横流れ」をおこすことを明らかにした(図1)。この早生まれのニューロン群には、大脳皮質原基にて最初に形成される「プレプレート層」に存在するニューロンも一員であることを示した。これまでは「動かない構造」として知られていた「プレプレート層」が流れるという事を本研究が世界で初めて示し、「プレプレート流」という新しい概念をもたらした。

##### (2) 「流れ」の仕組み

早生まれニューロンの一員のプレプレート細胞の「流れ」にはプレプレート細胞自身が能動的に移動、近隣細胞の流れによる受動的な移動、等ある事を観察した(図2)。

また、これらのニューロンが長く伸ばした軸索に働く張力がこの「流れ」に貢献

している可能性も示唆された。これらには、N-cadherin や Rac1 などの分子も関与している事も示した。

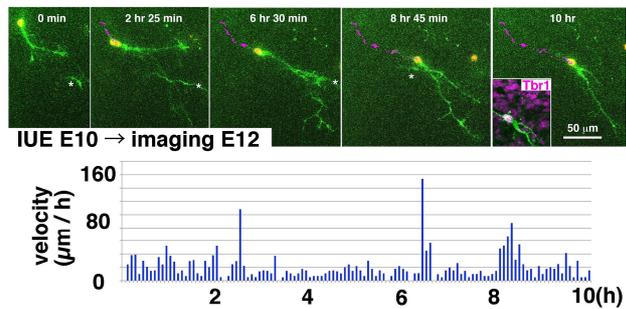


図2 早生まれニューロンの移動様式

##### (3) 「流れ」の意義

この「胎生早期プレプレート流」の意義を問うため、子宮内エレクトロポレーション法で、ジフテリア毒素(DTA)をプレプレートニューロンだけに発現させ、「流れ」を減じたところ、本来認められる「放射状ファイバーの腹側への曲がり・脳膜

面近くでの未広がり」が弱まった(図3、図5)。

その後、本来なら「曲がった・未広がり」放射状ファイバーに沿って、その後に生まれたニューロンは進むため(図5) 早生まれニューロンの後続ニューロン達の移動と層形成にも影響を及ぼし、皮質板(CP)の腹側への広がりをも減少させる。

また、「ヒゲ感覚統御域」に対応することが知られている「バレル構造」の可視化(Rorβ-mRNA)を行うことで、体性感覚領野の腹側へ広がりが、不十分な状態で進むことも明らかにした(図4、図5)。

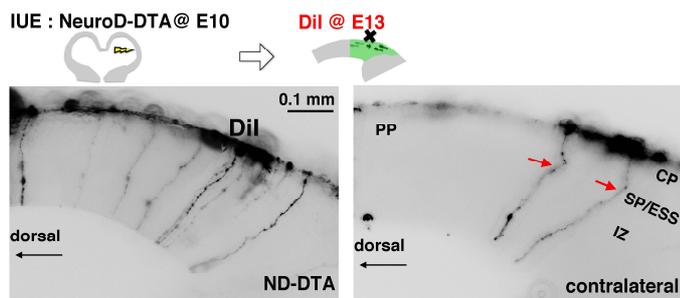


図3 「流れ」の減退による放射状ファイバー構造への影響

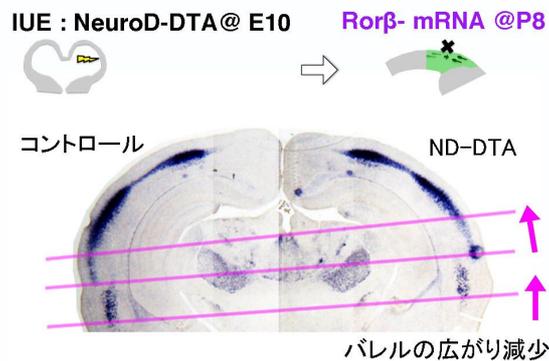


図4 「流れ」の減退による バレル構造への影響(生後)

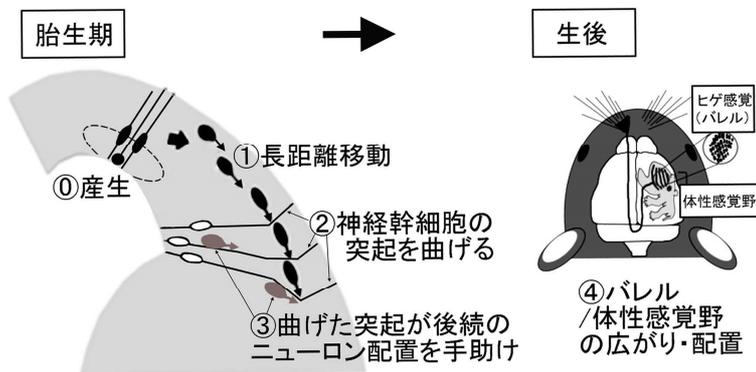


図5 「流れ」の意義

これらの結果から、「背側 腹側」という本来の「プレプレート流」が胎生早期に起きることが、発生過程において、大脳が拡張していく事に極めて重要であり、大脳皮質の領野が形成されるメカニズムのうちで、最初のステップとしてこのような「流れ」

そして「押す力」が関わっていることを初めて明らかにした。(図5)。

こうした現象が、これまで原因不明とされてきた疾患の中には含まれている可能性も考えられ、胎児医学・先天異常学の幅広い探求取り組みにとって有用な成果をもたらすことができるものと期待される

これら主な成果を Cell Reports 誌に報告し、同時に名古屋大学のプレリリースを行なった。またその他の関係する成果を、筆頭著者または共著者として国際雑誌に報告した。

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<br>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<br>16                      |
| 2. 論文標題<br>Elasticity-based boosting of neuroepithelial nucleokinesis via indirect energy transfer from mother to daughter  | 5. 発行年<br>2018年                 |
| 3. 雑誌名<br>PLOS Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>2004426 ~ 2004426 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pbio.2004426  | 査読の有無<br>有                      |
| オープンアクセス<br>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<br>-                       |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Saito Kanako, Kawasoe Ryotaro, Sasaki Hiroshi, Kawaguchi Ayano, Miyata Takaki   | 4. 巻<br>43              |
| 2. 論文標題<br>Neural Progenitor Cells Undergoing Yap/Tead-Mediated Enhanced Self-Renewal Form Heterotopias More Easily in the Diencephalon than in the Telencephalon | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Neurochemical Research  | 6. 最初と最後の頁<br>171 ~ 180 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s11064-017-2390-x   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Saito K, Okamoto, M, Watanabe Y, Noguchi N, Nagasaka A, Nishina Y, Shinoda T, Sakakibara A, Miyata T.                   | 4. 巻<br>29              |
| 2. 論文標題<br>Dorsal-to-ventral neocortical expansion is physically primed by ventral streaming of early embryonic preplate neurons. | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Cell Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>1555-1567 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.celrep.2019.09.075  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Kawaue T, Shitamukai A, Nagasaka, Tsunekawa Y, Shinoda T, Saito K, Terada R, Bilgic M, Miyata T, Matsuzaki F, Kawaguchi A    | 4. 巻<br>10         |
| 2. 論文標題<br>Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development | 5. 発行年<br>2019年    |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>2780 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-019-10730-y   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>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<br>62              |
| 2. 論文標題<br>Two photon microscopic observation of cell production dynamics in the developing mammalian neocortex in utero  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Development, Growth & Differentiation   | 6. 最初と最後の頁<br>118 ~ 128 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/dgd.12648   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kanako Saito, Takaki Miyata  |
| 2. 発表標題<br>The preplate stream: neurons generated earliest in the pallium migrate ventrally to mechanically bend radial fibers and expand the neocortex |
| 3. 学会等名<br>第70回細胞生物学会・第51回発生生物学会合同大会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>齋藤加奈子、岡本麻友美、渡邊裕斗、宮田卓樹                            |
| 2. 発表標題<br>大脳新皮質の腹側方向への拡張的形成には胎生初期プレプレートニューロンの腹側移動が物理的に貢献する |
| 3. 学会等名<br>第124回日本解剖学会総会・全国学術集会                             |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kanako Saito, Tomomi Okamoto, Yuto Watanabe, Arata Nagasaka, Takaki Miyata  |
| 2. 発表標題<br>Dorsal-to-ventral neocortical expansion is physically primed by ventral streaming of early embryonic preplate neurons |
| 3. 学会等名<br>第52回発生生物学会合同大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Saito Kanako, Miyata Takaki   |
| 2. 発表標題<br>Novel tangential (ventral) migration of the early pallium-derived neurons underlies the neocortical expansion |
| 3. 学会等名<br>第40回日本神経科学大会  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kanako Saito, Tomomi Okamoto, Yuto Watanabe, Arata Nagasaka, Takaki Miyata  |
| 2. 発表標題<br>Dorsal-to-ventral neocortical expansion is physically primed by ventral streaming of early embryonic preplate neurons |
| 3. 学会等名<br>第42回日本神経科学大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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