

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K13515

研究課題名（和文）立体流路における神経幹細胞

研究課題名（英文）Neural progenitor cells and three-dimensional flow

研究代表者

川口 喬吾（Kawaguchi, Kyogo）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・理研白眉研究チームリーダー

研究者番号：00787319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経幹細胞の培養系において、3次元ゲル培養条件下から染み出る細胞集団の運動がキラリティを持ち、それがミリメートルスケールの時計回りの構造を作ることを見つけた。このキラリティある構造は再現性が高く、いつも同じ回転方向を生じるものであったが、細胞骨格系の阻害剤を用いた実験により、この構造のキラリティにはアクチン系が特に重要であることがわかり、特にそのキラリティの強弱をコントロールする方法も発見した。さらに、キラリティの細胞的起源を探るため、低密度培養条件の実験系・解析系を確立し、一細胞の運動のキラリティと相互作用レベルで生じるキラリティのバランスを定量することも可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞内の構成要素であるタンパク質のキラリティが、数ミリメートルスケールの細胞集団運動のパターンにまで反映されることが分かった。これまでにマクロな構造自体にキラリティが生じる生物試料の例は多く知られていたが、細胞の形状でなく運動のキラリティが効いてパターンが生じ、内部の構成要素が激しく入れ替わっている中でもそれが維持されている例は初めてである。本成果は、キラリティのあるアクティブマターの物理の研究として一定の意義があることに加え、ヒトの組織・臓器形成の基本原理に新たな知見を加えるものであり、脳の左右非対称性の神経発生過程での起源との関連などの発展性が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：We found that the collective dynamics of neural progenitor cells flowing out of the 3D gel culture condition has chirality, which creates a millimeter-scale clockwise structure. Although this chirality was highly reproducible (i.e., always produced the same direction of rotation), experiments with cytoskeletal inhibitors showed that the actomyosin is particularly important for the chirality of this structure, and developed a method to control the intensity of the chirality. Furthermore, to investigate the cellular origin of the chirality, we established an experimental and analytical framework for low-density culturing and tracking conditions, which enabled us to quantify the balance between the chirality of single-cell motion and the chirality occurring at the cell-to-cell interaction level.

研究分野：生物物理

キーワード：細胞集団運動 トポロジー

1. 研究開始当初の背景

ミクロとマクロのつながりを理解する方向性の研究において、近年『アクティブマター』と呼ばれる領域が注目されている。ここでアクティブとは、構成要素が自発運動をしているということ概ね意味しており、アクトミオシン系や、飛んでいる鳥や泳いでいる魚などの、非平衡状態にある要素が集まったときにどのようなマクロ現象が生じうるかが研究の焦点となっている。

アクティブな系のマクロな性質は、理論・シミュレーションだけでなく、振動基板の上に配置された多数の小さな棒や、精製された細胞骨格系の挙動を調べる実験、遊走するバクテリアを用いた実験などにより活発に調べられ、応用面では細胞分裂のダイナミクス理解や、鳥の群れ運動の解析などにも利用されてきている。

ところが、多細胞集団の挙動をアクティブマターの観点から見た研究はまだほとんど出てきていない。これまでに、細胞組織のダイナミクスをレオロジーや反応拡散系の枠組みから理解する物理・数値的研究は盛んに進められてきたが、個々の細胞が運動していたり、細胞の内的な動力を記述するアクティブストレスが陽に効くような現象についての理解は、まだ進んでいない。

一方で、原腸陥入や鳥類の左右対称性の破れの機構、neural crestの集団移動など、個々の細胞が自発的な運動をする集団の織りなす現象は、発生生物学の文脈で多数存在している。イメージング技術の発達によりさまざまな動的な現象が*in vivo*でとらえられるようになってきた今こそ、細胞集団運動のアクティブマターとしての定式化がもためられている。

2. 研究の目的

これまでの研究では2次元におけるパターンや細胞流を解析してきたが、一方で、*in vivo*の神経芽細胞のように3次元空間を細胞が敷き詰めている場合は、細胞同士がより多く相互作用したり、2次元の境界面の影響が出るなど、本質的に異なった状況である。したがって、実際の生体内の発生過程や組織恒常性ダイナミクスにおける細胞流のメカニズム理解につなげるには、2次元の細い流れだけでなく、3次元的なストリームがどのようにコントロールされるか、を理解する必要がある。

本研究では、神経幹細胞の立体流路での培養と観察による3次元的な細胞ストリームの制御を目指す。細胞骨格関連の阻害剤などを用いることで、2次元系におけるパターン形成や相互作用メカニズムと3次元系の違いに現象論的に迫る。

3. 研究の方法

神経幹細胞の細胞核(H2B)、F-アクチン(Lifeact)といった細胞運動や形状変化を観察するための因子や、細胞間接着において重要な役割を果たすと考えられるN-cadherin、alpha-cateninを蛍光タンパクで標識するため、遺伝子導入法を条件検討した。さらに、低密度で細胞を培養し、長期間培養してパターン生成過程を顕微鏡下で見続ける方法、細胞周期や細胞骨格系の阻害剤の存在下でも低密度条件から長期間培養する方法などを実験的に調べ、取得したデータを用いて細胞間相互作用を推定する方法を検討した（4. 研究成果にて説明）

3次元培養方法については、まずはマイクロ流路作製技術や透明な細いチューブを用いることで、神経幹細胞が接着・生存可能な3次元流路の条件を調べ、流れの様子を観察する方法を検討した。その後、ゲルを用いて3次元培養することで自発的なパターンが生じることを見つけ、さらにその際に生じる興味深い現象を発見したため、そちらの解析を中心的に行った（4. 研究成果にて説明）。

4. 研究成果

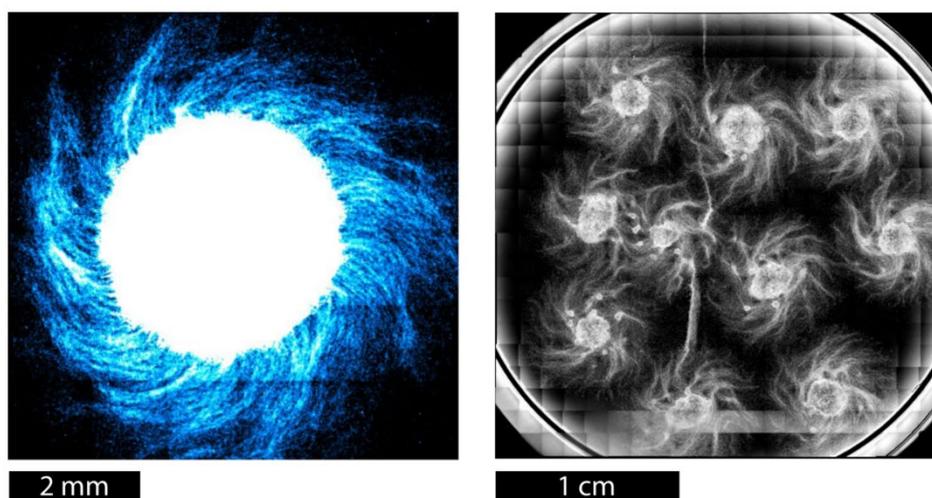
遺伝子導入法の条件検討については、エレクトロポレーションとレンチウイルスを用いた方法を様々な条件設定で試し、神経幹細胞への導入効率はエレクトロポレーション法が最も良いことを見出した。また、遺伝子導入後、ソーティングした細胞を増殖させ、限界希釈法を用いて1細胞由来のクローンを作成する方法を確立した。こうして得られた細胞を、蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いて、最長では5日にわたり細胞集団運動を観察できる実験系を構築することに成功した。

3次元の培養方法については、神経幹細胞をマイクロパターンの中に封入する方法、透明なチューブの形状の中に培養する方法など、さまざまな条件を検討した。その結果、ラミニンを主成

分とする細胞外基質であるマトリゲルに神経幹細胞を高濃度で混ぜ、任意の形状にプレートする方法が最も有力であると発見した。この実験において、細胞核と同時に細胞体や接着状況を観察できる株を追加で作成し、3次元環境下で細胞運動が長時間継続する条件の検討を重ねた。その中で、神経幹細胞をマトリゲル内で培養した際に、立体的なネットワーク構造が作られることを発見した。さらに、このネットワーク構造の中で、細胞が局所的な流れを生じていることもわかった。他にも、ゲル基盤がない状況においても、液中で細胞塊同士をつなぐ細胞の糸のようなものが生じることも見つけた。この細胞の糸は、構成する細胞が運動を続けているために激しく入れ替わるが、にもかかわらず構造が動的に維持されていることがわかった。

本研究の過程で、細胞がゲルから脱出する際に、興味深いマクロ構造を生じることを見出した。3次元ゲル培養条件下で細胞を2-3日おくと、細胞集団が全体的に時計回り方向に流れ出てくる様子が観察され、それを反映した時計回りのマクロ構造が生じていた（下図左）。この現象は再現性が高く、ゲルの大きさや始めの細胞密度などの幅広い初期条件の元で、同じ時計回りの構造が現れた（下図右）

このキラリティのパターンの起源に迫るべく、微小管系やアクトミオシン系の阻害剤を用いて同様の実験を行った。その結果、微小管系の阻害剤はキラリティには影響を及ぼさず、アクトミオシン系の阻害剤にはキラリティを促進したり抑制したりする効果が見られることが分かった。具体的には、**Blebbistatin** というミオシンの阻害剤により、細胞のキラリティは促進され、時計回りパターンがより顕著になった一方で、**Jasplakinolide** というアクチン脱重合阻害剤を添加際にはこのパターンが弱まり、特に高濃度の **Jasplakinolide** 条件下では反時計回りの構造さえ生じさせることができると発見した。ここまでの成果と、関連して発見したマイクロパターン実験における端で生じるキラリティのある細胞流について、論文[Yamauchi, Hayata, Uwamichi, Ozawa, Kawaguchi, arXiv:2008.10852]としてまとめている。



左：神経幹細胞をゲル培養した際に現れるマクロなパターン。青白色は細胞核のマーカ。細胞が全体的に時計回り方向に旋回している様子が動画を見ずともわかる。右：同様のゲルを多数用意した例。位相差顕微鏡にて 35 mm ディッシュ全体を撮影。常に時計回り方向のパターンが生じている。

さらにキラリティの起源を調べるために、一細胞レベルの細胞運動と相互作用の様式を調べた。神経幹細胞は低密度条件下に置いて増殖や運動を停止してしまうため、ある程度以上の密度で培養する必要がある。この状況は、増殖条件下にある細胞が浸っていた培養液(**conditioned medium**)を用いることである程度解決できることは以前の研究で分かっていたが、本研究ではさらに **conditioned medium** の採取タイミングと細胞密度を最適化した。これにより、**Jasplakinolide**, **Blebbistatin** などのアクトミオシン系阻害剤を用いた場合でも、画像データから細胞のトラッキングが容易になる低密度条件下での観察が可能となり、細胞運動や細胞間相互作用の解析ができるようになった。

これらの実験基盤により、広い細胞密度・阻害剤濃度の条件下における細胞トラックデータが大量に得られるようになったため、それらのデータから細胞間相互作用の関数系を推定するアプローチを新たに開発した。これにより、一細胞レベル、二体相互作用レベルのキラリティやその変化が定量できるようになっただけでなく、細胞間相互作用の異方性が明らかになり、特に神経幹細胞は前後方向と左右方向にいる細胞に対する応答が異なっていることなどがわかった(論文執筆中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Adachi Kyosuke, Takasan Kazuaki, Kawaguchi Kyogo	4. 巻 4
2. 論文標題 Activity-induced phase transition in a quantum many-body system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PHYSICAL REVIEW RESEARCH	6. 最初と最後の頁 13194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/physrevresearch.4.013194	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 Adachi Kyosuke, Kawaguchi Kyogo	4. 巻 104
2. 論文標題 Surface wetting by kinetic control of liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PHYSICAL REVIEW E	6. 最初と最後の頁 L042801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/physreve.104.1042801	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 Adachi Kyosuke, Kawaguchi Kyogo	4. 巻 100
2. 論文標題 Chromatin state switching in a polymer model with mark-conformation coupling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PHYSICAL REVIEW E	6. 最初と最後の頁 060401(R)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevE.100.060401	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 Sharir Amnon, Marangoni Pauline, Zilionis Rapolas, Wan Mian, Wald Tomas, Hu Jimmy K, Kawaguchi Kyogo, Castillo-Azofeifa David, Epstein Leo, Harrington Kyle, Pagella Pierfrancesco, Mitsiadis Thimios, Siebel Christian W, Klein Allon M, Klein Ophir D	4. 巻 21
2. 論文標題 A large pool of actively cycling progenitors orchestrates self-renewal and injury repair of an ectodermal appendage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NATURE CELL BIOLOGY	6. 最初と最後の頁 1102--1112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-019-0378-2	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 該当する

1. 著者名 Kailin R. Mesa, Kyogo Kawaguchi, Katie Cockburn, David Gonzalez, Jonathan Boucher, Tianchi Xin, Allon M. Klein, and Valentina Greco	4. 巻 23
2. 論文標題 Homeostatic epidermal stem cell self-renewal is driven by local differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 677--686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.09.005	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 該当する

1. 著者名 Yohei Nakayama, Kyogo Kawaguchi, and Naoko Nakagawa	4. 巻 98
2. 論文標題 Unattainability of Carnot efficiency in thermal motors: Coarse graining and entropy production of Feynman-Smoluchowski ratchets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Review E	6. 最初と最後の頁 22102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevE.98.022102	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21件 (うち招待講演 21件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 『これから一緒に研究する君へ』
3. 学会等名 脳科学若手の会 関西支部セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Nonequilibrium and topological concepts in multicellular dynamics
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 生物系の多体现象と非平衡物理
3. 学会等名 東京大学工学部 物理工学科 ワークショップ「物理工学の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Chiral Dynamics and Boundary Wave of Active Nematic Neural Progenitors
3. 学会等名 Special Virtual Seminar, The University of Chicago (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Chiral dynamics and boundary wave of active nematic neural progenitors
3. 学会等名 Informal meeting : Variety and universality of bulk-edge correspondence in topological phases: From solid state physics to transdisciplinary concepts (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 細胞集団運動のキラリティとトポロジー
3. 学会等名 東京大学 理学系研究科 生物科学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 アクティブネマティック細胞とキラリティ
3. 学会等名 山田研究会「動的過程における右と左」-非平衡、非対称、非線形が紡ぐ学際研究-」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Applying condensed matter concepts to collective cell dynamics and tissues
3. 学会等名 ASHBi Retreat (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 細胞集団運動の非平衡物理とトポロジー
3. 学会等名 待兼山コロキウム, 大阪大学 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 細胞集団運動とトポロジー
3. 学会等名 筑波大学物性セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Active nematic cells and topology
3. 学会等名 East Asia Joint Seminars on Statistical Physics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 細胞集団運動とトポロジー
3. 学会等名 KUIAS-Heidelberg-RIKEN iTHEMS joint workshop, Kyoto Univ. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Nonequilibrium properties of multicellular systems
3. 学会等名 RIKEN Summer School Retreat (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Physical properties of homeostatic and active tissues
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Nonequilibrium physics of collective cell migration and tissue homeostasis
3. 学会等名 Academia Sinica (seminar) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 成体組織恒常性の普遍モデルとその性質
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 成体組織恒常性の非平衡物理
3. 学会等名 北大MMCセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Nonequilibrium physics of multicellular dynamics
3. 学会等名 定量生物学の会・年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Multicellular systems and nonequilibrium physics
3. 学会等名 Yukawa Institute & RIKEN iTHEMS joint meeting (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 Spatio-temporal fate coordination in skin homeostasis
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口 喬吾
2. 発表標題 成体組織恒常性の普遍モデルとその性質
3. 学会等名 日本細胞生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 足立 景亮, 川口 喬吾	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 416
3. 書名 "相分離生物学の全貌"	

1. 著者名 パリティ編集委員会 編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 166
3. 書名 "物理学, この1年 2020 (Parity)"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------