

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07224

研究課題名（和文）子宮内ライブ観察を用いた頭部形成機構の研究：脳原基内外の細胞の会合と協働

研究課題名（英文）Study on the mechanisms of head formation using in utero live imaging: association and cooperation of cells intra- and extra-brain primordium.

研究代表者

齋藤 加奈子 (Saito, Kanako)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：50746906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マウス胎仔頭部のイメージングを通じて、研究対象を脳原基だけに焦点を当てるのではなく、頭部全体に視野を広げ、異なる種類の細胞群の時空間的關係性を意識し研究を進めた。この為、組織内での関わり合いを維持しつつ、一細胞レベルでの観察をおこなうことで、頭部の様々な器官形成への理解を深めた。また、発生初期の組織形成の変化の要因である細胞の内因的要因と、近隣細胞・組織から受ける外因的要因があるが、その一つである脳を囲む表皮・結合組織に注目して、脳、頭部組織の形態変化を力学的な観点からも考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オルガノイド作成技術は日進月歩で、消化器系なら、複数の異なる器官を同時に、それらの間にあるべきつながりを持たせて、生じさせるにまで至っている。しかし、本来より幹細胞の持つ「自己組織化」と称される自己複製能や多分可能による工程も多い。本研究は、将来、異種細胞の会合・協働を人為的にコントロール出来る為により有用になると思われる。また、これらの成果は、頭部のさまざまな器官形成のしくみについて、新しい理解をもたらすと予想される。

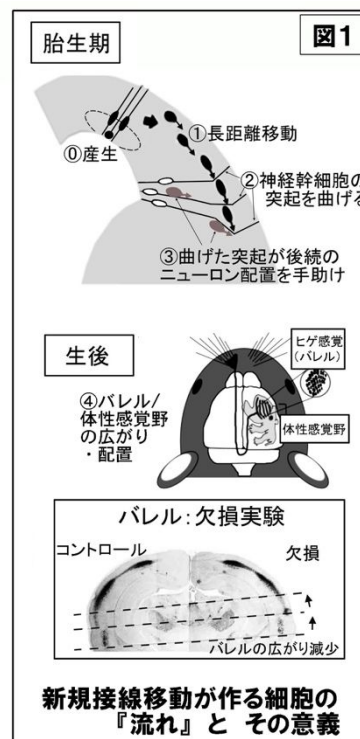
研究成果の概要（英文）：This study, through the imaging of the embryonic mouse head, the view was extended to the whole head, not just the brain primordium, with an awareness of the spatiotemporal relationships between different types of cell groups. This allowed us to deepen our understanding of the various organogenesis of the head by observing at the single-cell level, while maintaining the relationships within the tissue. We also examined the morphological changes in the brain and head tissue from a mechanical perspective, focusing on the epidermis and connective tissue surrounding the brain, which is one of the factors that contribute to changes in tissue formation during early development, both intrinsic factors in cells and extrinsic factors received from neighbouring cells and tissues.

研究分野：神経発生

キーワード：神経幹細胞 ニューロン マウス頭部発生 ライブ観察

1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初において、胎生早期・中期のマウス大脳皮質原基を対象とした「スライス培養法を用いた細胞動態観察」と「in vivo 機能実験」を組み合わせた研究を行い、早期に生じるニューロンの群れが腹側向けに流れること、この「流れ」が、別種の脳原基細胞（放射状グリア）に対して「曲げる」という力学的影響を与えること、その「曲げ・曲げられ」が、その後に起きるべき事象（放射状グリアのファイバ一群に沿って後続的に生じたニューロンが移動・配置され、適切な広さ・領野パターンの大脳皮質が成立すること）に重要であると見いだした（図1: Saito et al., *Cell Reports*, 2019）。この「ニューロンの流れ」は脳膜、あるいは間充織を足場として牽引して始まる可能性があるため、この事象の完全な理解のためには「スライス培養用に取り出した脳原基だけ」ではない、生体内の脳原基をライブ観察する必要があると考えた。また、in vivo では認められる「力学的負荷に対する神経幹細胞の応答」が、スライス培養では必ずしも再現できない、という発見(Saito et al., *Neurochem. Res.* 2018)から、より正確に脳原基発生を理解するには「脳膜・頭部間充織に囲まれた状況下の脳原基」を観察するべきだと考え、力学的完全さを考慮しつつ、「すべての異なる細胞タイプが欠落なく勢揃いしている」ことを強く意識して、「異種細胞群が勢揃いした状況での集団動態は、どうなっているのか?」、「異なる種類の細胞たちは、どう共存しているのか?」などの疑問を理解すべく、脳原基から頭部全体に視野を広げてた研究を計画した。



2. 研究の目的

全ての細胞が揃っているが細胞の動きが完全に停止している「固定標本による組織学的解析」だけでなく、可能な限り生来の生理環境下での観察を試み、発生の「過程」も正確に理解することを目指し研究を計画した。哺乳類の器官形成、頭部発生に対する胎生早期では「頭部」内で多種細胞群が動き回っていると予測できる。従来の器官培養下の観察にもとづいてある程度の理解は進んではいるが、ゼブラフィッシュで達成されているような「個体まるごとライブ観察」を行ったらどう動いて見えるだろう、というのは全くの未知である。ある細胞の動き・形態変化に別の細胞の動きが影響するということは、我々が明らかにした上記の例に限られるのではなく、無数の例がありそうに思えることから、このような現象がどれ程行われているのかを、哺乳類頭部に焦点を当て、さらに明らかにする。

3. 研究の方法

「全細胞可視化」用のトランスジェニックマウスや、子宮内エレクトロポレーション法を用いて細胞を可視化することで、組織内での関わり合いを維持しつつ、一細胞レベルでの観察をおこない、細胞の分裂や、そこから生まれたニューロン細胞の挙動・移動経路など、また全細胞の流れや停滞の様子を記録・追跡した。

さらに、同じ「大脳」でも将来の皮質部と、将来の基底核部は、脳室に対してそれぞれ「凹」、「凸」という対照的な形態を呈する事より、脳原基壁の周囲の間充織・脳膜原基の細胞動態・力学的特性がこうした「凹凸差」に関与していないかを問うため、上記データを分析した。また、採取した間充織組織に対する応力解放試験を行なった。

4. 研究成果

脳は、頭蓋骨にとどまらず、多くの器官に守られるかの様に囲まれて存在する。特に下垂体は間脳組織のみから形成されるのではなく、口腔にある口腔外胚葉が間脳視床下部細胞からの刺激により袋状の下垂体原基を形成する事が知られている。これら異なる器官の会合・協働の様子を捕らえるため、まずは全体の核を可視化できる H2B-mCherry マウス用い、形態的な変化があらわれ始める E9~10 のマウス胎子を用いライブイメージングをおこなった。その際に、組織の一部のみを取り出すのではなく、頭部全体の断面を可視化し、腹側間脳と口腔外胚葉 及びその周辺の間葉系細胞の分裂や移動等の動態を捕らえる事ができ、また、それぞれ領域が互いに縄張り争いをするかの様に組織形態を変化させる様子を観察する事ができた(図2)

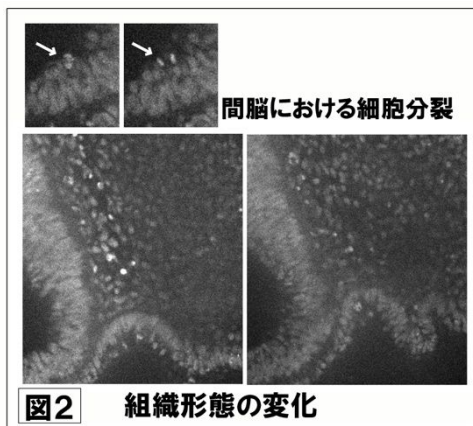


図2 組織形態の変化

さらに、力学的な観点からも考察した。発生初期、筒状の形態をしている脳は、発生が進むにつれて大脳、中脳、延髄、眼などに区分される様、それぞれの領域が拡張しつつ、曲がり、折り畳まれ、突出するなど、全体として劇的な変化を見せる。この変化をもたらすには、細胞自身の遺伝子発現など内因的要因と、近隣細胞・組織から受ける外因的要因があると考えられる。その外的要因の一つとして 脳を囲む表皮・結合組織に注目して、脳、頭部組織の形態変化をリアルタイムで観察し、残留応力解放試験を行った。頭部全体を横断スライスした上で『脳部分だけ抜き取る』と、脳原基、脳室が広がるのに対し、表皮・結合組織が求心的に狭まった。これらの事から脳原基は、こうした『外からの狭まり・拘束』に抗しながら外に向けての成長・拡張を果たしていることが分かった(図3)。この成果の一つとして、マウス頭部発生時における、脳原基形成を力学的な観点からも考察し、『発生早期の脳と周囲組織の間の力学的な「引き伸ばし・押し込み」関係と協働性』についての成果を Cell Dynamics 誌に共同第一著者として論文報告した。

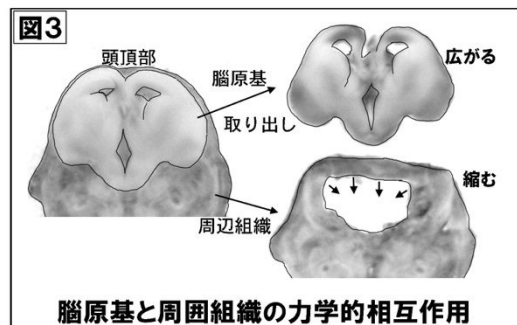


図3 脳原基と周囲組織の力学的相互作用

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 TsujiKawa Koichiro, Saito Kanako, Nagasaka Arata, Miyata Takaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Developmentally interdependent stretcher compressor relationship between the embryonic brain and the surrounding scalp in the preosteogenic head	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	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） 10.1002/dvdy.451	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤加奈子, 亀山俊樹, 国田勝行, 小谷侑, 河田美穂, 中島昭, 長崎弘
2. 発表標題 Pax6 expression analysis in anterior pituitary stem cells of adult rodent.
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河田美穂, 小谷 侑, 亀山俊樹, 齋藤加奈子, 須賀英隆, 長崎 弘
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞由来視床下部・下垂体オルガノイドに存在する下垂体幹/前駆細胞の分離法
3. 学会等名 第49回神経内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤加奈子, 亀山俊樹, 小谷侑, 河田美穂, 中島昭, 長崎弘
2. 発表標題 Mechanism of regionalization of vasopressin・oxytocin neuronal nuclei in the hypothalamus.
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------