

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06190

研究課題名（和文）脳室内圧による神経幹細胞の増殖・分化の制御

研究課題名（英文）Roles for intraventricular pressure in brain development

研究代表者

嶋村 健児（Shimamura, Kenji）

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：70301140

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）：本研究は、脳のサイズ決定の要因となる神経幹細胞の増殖期から分化期への移行について、発生期の脳室内圧に起因する力学的要因が果たす役割を明らかにするのが目的である。まず、発生中の胚の脳室内圧を測定する方法を開発し、脳発生の各段階における脳室内圧の変化を調べた。次に、脳室内圧の変化が、神経幹細胞の増殖・分化に及ぼす影響を明らかにするため、ニフトリ胚を用いて脳室内圧を変化させる実験を行った。その結果、脳室内圧の変化に呼応して神経幹細胞の増殖、および分化状態が変化した。これらの結果より、脳脊髄液を介した脳室内圧による力学刺激は、脳発生に重要な働きをしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の多様性をもたらした発生のしくみは、ヒトの脳の成り立ちの理解につながる点で学術的、社会的に関心が高い。神経幹細胞の増殖から分化への移行メカニズムは、エピゲノム制御などの内的要因、分泌シグナル等の外的要因が研究されているが、力学的要因に着目した本研究知見はこれに新たな展開をもたらす。一般に、発生現象における時間制御は、代謝等の生化学的反応に基づくしくみが知られているが、純粋に物理的要因によるしくみは画期的である。また、微小空間の微小圧力の計測法は、発生のみならず、疾患、損傷、臓器再生時の細胞を取り巻く物理的環境を明らかにし、オルガノイド作製など *in vitro* で再現するために有用である。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to understand mechanisms underlying transition from proliferation to differentiation phase of the neural stem cells (NSCs), which have a primary impact on the size of the brain. We investigated roles of physical stimuli exerted by the cerebrospinal fluid (CSF) in the brain ventricle in the regulation of embryonic NSC. We established methods to measure the internal pressure of the ventricle in the developing embryos. We also examined the impacts of the pressure alteration on proliferation and differentiation of the neural stem cells, finding that decline of the pressure facilitates the cells to shift the phases. These results suggest that physical stresses exerted by CSF play a critical role in the regulation of NSCs, which possibly influence the brain size.

研究分野：発生生物学

キーワード：脳発生 神経幹細胞 力学刺激 細胞増殖・分化 脳脊髄液 脳室内圧 細胞間張力

### 1. 研究開始当初の背景

発生期の神経幹細胞は、まず盛んに自己増殖を行ってその量を増やしたのちに分化モードへと移行し、以後はその数を増やすことなく、ニューロン、そしてグリアといった脳神経機能の担い手を産生する。また、脳のサイズは動物種間できわめて多様化しており、神経幹細胞の増殖から分化へのモード移行時期の違いがもたらす幹細胞プールのサイズが、最終的な脳のサイズを左右する前提段階として位置づけられる。この時間軸に沿った神経幹細胞の挙動変化のメカニズムについて、これまで神経幹細胞に内在的なエピゲノム制御、転写制御ネットワーク、および神経幹細胞に作用する細胞外シグナルについて研究が進み、一定の理解がもたらされたものの、全容解明には至っていない。特に、個々の神経幹細胞の自律的な発生時計によって、例えば大脳皮質全体のおよそ同期したモード移行をどう説明するかなど、大きな問題が残されていた。本研究は、神経幹細胞を取り巻く力学的環境に着目することで、この問題に対する新たな展開をもたらすことができるのではないかと考えた。実際に、主にニワトリ胚を用いた先行研究で、脳室内圧の神経上皮細胞の増殖と脳胞の形態形成における役割が報告されていた。しかし、神経幹細胞の分化に及ぼす影響については報告がなく、脳室内圧の種間差についての知見もごく限られていた。一方で、力学刺激が細胞増殖に及ぼす作用については、主に培養細胞を用いた研究が進んでおり、Hippo/Yap シグナル経路が中心的な役割を担うことが明らかにされていた。

私たちの研究グループでは、脳進化における脳脊髄液の役割について研究を行っており、霊長類とマウスの違いについて多くの予備的知見を得ていた。サルやヒトでは、脳脊髄液の産生器官である脈絡叢が非常に発達しており、大きく膨らんだ終脳胞をもっていることから(図1) 脳脊髄液の著しい増加とそれに伴う脳室内圧の上昇が示唆され、本研究の着想に繋がった。

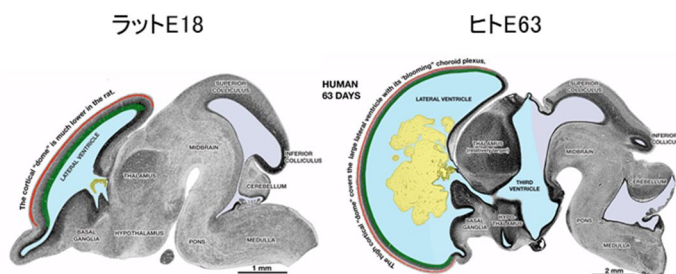


図1 ヒト胚における脳胞と脈絡叢の拡大

### 2. 研究の目的

本研究では、発生期の神経幹細胞の増殖から分化モードへの移行メカニズムの解明を目的として、脳脊髄液による力学刺激(液圧およびそれに起因する神経幹細胞間の張力)が、神経幹細胞の増殖・分化にどのような影響を与えるのかを明らかにし、脳発生過程における力学刺激の経時的变化が、組織として調和のとれた神経幹細胞制御のタイマーとして寄与するという仮説を検証することが最優先事項である(図2)。また、動物種間の脳サイズの違いを規定するしくみに繋がると考えた。そのために、(1) 発生中の脳室内圧の測定と経時的变化、(2) 脳室内圧による神経幹細胞の増殖・分化への影響とその背後にある分子カスケード、(3) 脳発生における脳室内圧の生理的意義について明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 胚発生期の脳室内圧の測定  
発生における脳室内圧の変化を明らかにするために、安価であること、持ち運びが可能で、かつ設定、運用が容易であること、の2点を重視して、マイクロ流路を用いた測定器具を作製した(熊本大学先端科学研究部中島准教授との共同研究)。妊娠マウスを麻酔下で開腹し、子宮内の胚の側脳室に測定器具に接続したガラスキャピラリーを挿入し、マイクロ流路内の水位の変化から圧力を算出した。

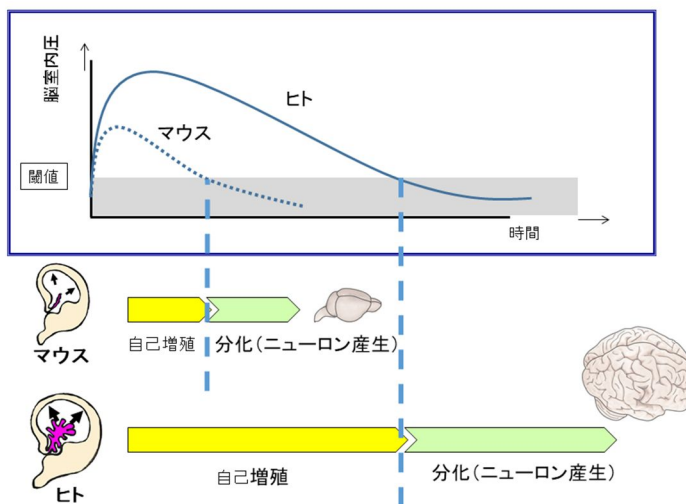


図2 脳室内圧の経時的变化による神経幹細胞のモード移行の概念図(本研究の作業仮説)

また、市販のピエゾチップ圧電センサーを利用した微小圧力測定装置を作製し(熊本大学先端科学研究部中島准教授との共同研究)、マウス胚の脳室内圧を測定した。

#### (2) 脳室内圧が神経幹細胞の増殖・分化に及ぼす影響

脳室内圧の変化が神経幹細胞の挙動に及ぼす影響を調べるために、胚の操作性に優れたニワトリ胚を用いて脳室内を加圧、あるいは減圧して孵卵を続け、数日後に回収した。回収した脳より切片を作製し、免疫染色によって比較解析を行った。染色マーカーとして、神経幹細胞の増殖性を示すリン酸化 Yap、分裂細胞を示すリン酸化ヒストン (PH3)、Sox2 (神経幹細胞)、TuJ1 抗原 (幼若ニューロン)、NeuN (成熟ニューロン) 等を用いた。

#### (3) 脳室内圧による神経幹細胞間に掛かる張力の定量

細胞間張力に応じて変化することが想定された上皮細胞の細胞接着装置の構成因子 (N カドヘリン、カテニン、ピンキュリン、アクチン、ZO1 など) に対する免疫染色を行って、染色性の変化によって細胞間に掛かる張力の増減を推定した。検体として、前述の脳室内圧操作を行ったニワトリ脳、および発生ステージの異なるマウス胚を用いた。

#### (4) 脳組織片に対する in vitro での張力、または圧縮応力の印加

脳室内圧の影響について、一次的作用 (静水圧) と、二次的作用 (細胞間に生じる張力) を分離して検討するために、マウスの終脳から切り出した神経上皮組織片を、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のチャンパーに貼り付け、張力、あるいは圧縮応力を印加しつつ培養した。12~36 時間培養したのち、回収、固定し、免疫染色を行って細胞増殖・分化について検討した。

#### (5) 力学応答から細胞増殖、細胞分化に至るカスケードの探索

脳室内圧の変化を受けて発現が変動する因子を探索するために、(3) の脳室内圧を操作した脳サンプルを集めて、バルクでのトランスクリプトーム解析を行い、対照群に対して発現変動が見られた遺伝子について解析を行った。

すべての動物実験について「熊本大学動物実験指針」を遵守し、熊本大学動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号 A2022-043、A2023-065)。

### 4. 研究成果

#### (1) 胚発生期の脳室内圧の測定

研究開始時点で、生体内の微小圧力を測定する方法がいくつか報告されていたが、本研究遂行のために、安価かつ持ち運び、セットアップが容易な測定方法を開発した。PDMS 製のマイクロ流路を利用した測定デバイスを作製した (熊本大学先端科学研究部中島准教授との共同研究)。想定されるレンジの任意の静水圧を付与してキャリブレーションを行い、印加圧力と液面の移動度に線形の相関があることを確認し、脳室内圧の測定に使用可能であると結論づけた (M. Akaike ら投稿準備中)。これは過去に例のない装置である。実際に、麻酔下のマウス子宮内で測定を繰り返し、脳室に挿入するガラスキャピラリーの形状、表面処理など改良を加え、最終的に一定の数値 (数百パスカル) を得ることができた (M. Akaike ら投稿準備中)。しかしながら、胚の個体差に加えて、対象とする胚の側脳室はきわめて微小空間であることから、主に計測手技に起因すると考えられる測定値の偏差が大きく、発生に伴う経時的変化については、おおよその傾向を把握するにとどまった。この問題を解決するために、先行研究で報告のあったピエゾチップ圧電素子を用いた工業用の圧力センサー (HSC Series, Honeywell) を用いて電氣的に微小圧力を計測する方法を本研究に最適化した。その結果、比較的安定した計測が可能となり、現在測定データを蓄積、解析中である。なお、当初計画した脳室内圧の種間比較については、ニワトリ胚、モルモット胚などで試験的に行ったものの、主要な標的であったサル胚については、研究期間中に測定可能な検体を入手することができず、組織染色用の検体の収集にとどまったため、今後の課題として残された。

#### (2) 脳室内圧が神経幹細胞の増殖・分化に及ぼす影響

実験操作が容易で自由度が高いニワトリ胚をもちいて、脳室内圧を増加、あるいは減少させて、神経幹細胞の増殖・分化への影響を調べた。なお、ニワトリ胚は基本的に大気圧下で発生し (哺乳類胚は子宮内圧下で発生)、脳室内圧はマウスよりも著しく低いことを確認している。孵卵 3 日目胚の脳室に微細なガラスキャピラリーを挿入して脳室内圧を開放し、2 日後に中脳領域の免疫組織染色を行ったところ、増殖性を示す細胞が減少していた。一方で、分化したニューロンの数は増加しており、脳室内圧の低下によって、神経幹細胞は増殖から分化モードへの移行が促進されることが示唆された。また、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの合成阻害剤 -D-Xyloside (BDX) を脳室に投与すると、浸透圧変化によって脳室内圧が上昇することが報告されている。BDX を脳室内に投与した検体では、中脳は有意に拡大し、増殖細胞は増加、分化したニューロンは減少した。よって脳室内圧の上昇は神経幹細胞の増殖から分化への移行を遅延させることが示唆された。これらの結果は、脳室内圧の変化と神経幹細胞の挙動の因果関係を示すものであり、本研究における作業仮説の基盤に実験的根拠をもたらした。

マウスを用いて同様の実験を試みたが、BDX を投与した胚はすべて致死となり、解析を行う

ことができなかつた。脳室内圧の減少実験については、さまざまな検討を行ったものの、研究期間中に着手することはできず、今後の課題として残された。

### (3) 脳室内圧による神経幹細胞間に掛かる張力の定量

脳脊髄液を介した脳室内圧の神経幹細胞に対する作用として、細胞間張力への影響が想定される。実際に、培養細胞を用いた研究で、細胞間張力の増大は増殖を促進することが報告されている。一般的に、細胞間張力の計測には、レーザーで細胞膜を切断し、その退縮速度から算出する方法が用いられるが、本研究の対象である脳室は閉鎖空間であり、内腔圧を保持したままこの方法で細胞間張力を計測することは困難である。そこで、細胞間張力を反映することが知られる細胞間接着装置の構成因子の局在を調べることで脳胞の神経幹細胞間の張力の推定を試みた。上記(2)の脳室内圧の増減処置を施したニワトリ胚を、張力感応型のカテニン抗体で染色すると、脳室内圧が増加した場合は染色性が亢進し、逆に脳室内圧が減少した場合は減少した。マウス正常胚で調べると、発生の進行とともに張力感応型のカテニンが増加するという結果を得た。ただし、張力感応型カテニンは、細胞密度の増加に伴って増加することが知られており、発生後期には著しく細胞密度が増大することから、発生後期のカテニンの増加が、細胞間張力の増大によるものか、細胞密度の増大によるものかについては、今後さらなる検討が必要である。加えて、内圧を保持したまま脳室面の細胞間張力を計測する新たな方法についても継続して検討が必要である。

### (4) 脳胞組織片に対する in vitro での張力、または圧縮応力の印加

脳室内圧の影響について、一次的作用(静水圧)と、二次的作用(細胞間に生じる張力)を分離して検討するために、人工的に脳組織片に張力、あるいは圧縮応力(または張力の緩和)を作用させる PDMS 製の培養デバイスを作製した(熊本大学先端科学研究部中島准教授との共同研究)。マウスの終脳胞から切り出した神経上皮組織片を、培養チャンパーに強固に貼り付け、張力、あるいは圧縮応力を印加しつつ培養したのち、細胞増殖について検討した。その結果、チミジンアナログを取り込んだ増殖性の細胞は、張力存在下では増加し、圧縮応力下では減少することがわかった。当初の研究計画では、この実験で得られたサンプルを(5)のトランスクリプトーム解析に供す予定であったが、組織染色の結果、各検体間のバラつきが大きいことが判明し、バルクの RNA-seq 解析には適さないと判断して計画を変更した。

### (5) 力学応答から細胞増殖、細胞分化に至るカスケードの探索

脳室内圧の変化から神経幹細胞の挙動変化に至る分子機構を明らかにするために、上記(2)の脳室内圧を増減したニワトリ胚より中脳胞を回収してバルクの RNA-seq 解析を行った。これまでの結果から、細胞の増殖・分化を調節する Hippo/Yap 経路の関与は明らかであったため、この実験では特に Hippo/Yap 経路の上流に該当する因子に焦点を当てた。結果は現在詳細に解析中だが、減圧検体については細胞増殖の指標である Ki67 の発現低下、ニューロン分化の指標である チューブリンの発現上昇が認められ、少なくとも実験として成立していることを確認した。減圧1時間後に発現変動がみられる因子を複数同定しており、今後機能実験を行ってカスケード因子としての検証をすすめる予定である。

以上の結果の多くはまだ報告がなく、国内外の関連する研究分野にとって重要な研究成果である。現状の懸案事項を解決し、早急に論文発表する必要がある。また、本研究立案時に想定していた脳室内圧と脳室面の細胞間張力、および神経幹細胞の増殖制御の単純化した相関について、実際の発生における分化期への移行については、細胞間張力以外の力学要因についても考慮する必要も示唆され、細胞間張力の定量方法の検討を含め、今後さらなる研究が必要である。

## 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 5件）

1. 著者名 Istiaq Arif, Umemoto Terumasa, Ito Naofumi, Suda Toshio, Shimamura Kenji, Ohta Kunimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Tsukushi proteoglycan maintains RNA splicing and developmental signaling network in GFAP-expressing subventricular zone neural stem/progenitor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2022.994588	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 Kikuchi Koji, Sakamoto Yasuhisa, Uezu Akiyoshi, Yamamoto Hideyuki, Ishiguro Kei-ichiro, Shimamura Kenji, Saito Taro, Hisanaga Shin-ichi, Nakanishi Hiroyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Map7D2 and Map7D1 facilitate microtubule stabilization through distinct mechanisms in neuronal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	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） 10.26508/lisa.202201390	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 Sato Haruka, Hatakeyama Jun, Iwasato Takuji, Araki Kimi, Yamamoto Nobuhiko, Shimamura Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Thalamocortical axons control the cytoarchitecture of neocortical layers by area-specific supply of VGF	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	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） 10.7554/eLife.67549	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 Nasu Makoto, Esumi Shigeyuki, Hatakeyama Jun, Tamamaki Nobuaki, Shimamura Kenji	4. 巻 9
2. 論文標題 Two-Phase Lineage Specification of Telencephalon Progenitors Generated From Mouse Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2021.632381	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 Sato Haruka, Hatakeyama Jun, Iwasato Takuji, Araki Kimi, Yamamoto Nobuhiko, Shimamura Kenji	4. 巻 11
2. 論文標題 Thalamocortical axons control the cytoarchitecture of neocortical layers by area-specific supply of VGF	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	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) 10.7554/eLife.67549	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 3件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sato H, Hatakeyama J, Iwasato T, Araki K, Yamamoto N, Shimamura K.
2. 発表標題 Thalamocortical axons control the cytoarchitecture of neocortical layers by area-specific supply of VGF.
3. 学会等名 Society of Neuroscience Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatakeyama J, Sato H, Shimamura K.
2. 発表標題 Extrinsic factors nurturing neural stem cells
3. 学会等名 第45回日本神経科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatakeyama J, Sato H, Shimamura K.
2. 発表標題 Extrinsic factors contributing cerebral cortical expansion in primates
3. 学会等名 第55回日本発生生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatakeyama J, Sato H, Yoshimochi S, Matsushita R, Shimamura K.
2. 発表標題 The cradle of cerebrospinal fluids nurturing embryonic neural stem cells.
3. 学会等名 International society for stem cell research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato H, Hatakeyama J, Iwasato T, Araki K, Yamamoto N, Shimamura K.
2. 発表標題 Thalamocortical axons control the cytoarchitecture of neocortical layers by area-specific supply of VGF.
3. 学会等名 The International Symposium on Development and Plasticity of Neural Systems (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatakeyama J, Sato H, Shimamura K.
2. 発表標題 Extrinsic factors promoting cortical expansion in primates.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山淳、岡田咲耶、佐藤晴香、鈴木郁夫、岸雄介、岡野栄之、斎藤通紀、嶋村健児
2. 発表標題 脳を育むゆりかご「脳脊髄液」
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hatakeyama J, Sato H, Shimamura K.
2. 発表標題 Extrinsic factors promoting cortical expansion in primates
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究協力者	岡田 咲耶  (Okada Saya)		
研究協力者	畠山 淳  (Hatakeyama Jun)  (90404350)	熊本大学・発生医学研究所・准教授   (17401)	

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