

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 8 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06207

研究課題名(和文) 神経幹細胞の分裂パターンと細胞形態変化の統合的理解

研究課題名(英文) Integrative study of division patterns and morphological changes in neural stem cells

研究代表者

藤田 生水 (Fujita, Ikumi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員

研究者番号：80615138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頂端面における細胞間接着のダイナミクスの定量化のため、効率的な細胞セグメンテーションと細胞系譜トラッキングを可能とする解析プラットフォームを共同研究により構築した。神経産生期における頂端面の神経幹細胞ダイナミクスを解析し、一定時間・一定区画に存在する全細胞の頂端面の形態や細胞間接着関係、及び細胞系譜についての定量的データを取得した。共同研究により、得られた定量データを時間発展ネットワークとして解析し、神経幹細胞のふるまいが近傍の細胞の分裂や分化に及ぼす影響について解析した。神経幹細胞の全長にわたる形態のダイナミクスを追跡するため、細胞膜や細胞質を多様に標識するシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳類の大脳新皮質発生の根幹をなす、神経幹細胞のダイナミクスを定量的に解析する基盤を提供した。本研究におけるマウスを用いた解析では、神経幹細胞間で振る舞いに協調性が見られず、自律的かつ典型的な振る舞いの集合であることが示唆された。比較的シンプルな構造であるマウスの大脳皮質と比較し、ヒト大脳皮質はより大きく複雑な構造を形作る。本研究をさらに発展させ、ヒト組織における神経幹細胞の振る舞いの協調性やランダム性を明らかにすることで、ヒト大脳皮質発生の理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To quantify the dynamics of cell-cell adhesion at the apical surface, we established an analysis platform for efficient cell segmentation and cell lineage tracking through collaborative research. We analyzed neural stem cell dynamics at the apical surface during the neurogenic stages and obtained quantitative data on apical morphology, cell-cell adhesion relationships, and cell lineage of all cells present at a given time and in a given region. Through collaborative research, we analyzed the quantitative data obtained as a time-evolving network and analyzed the effects of neural stem cell behavior on the division and differentiation of neighboring cells. To track the dynamics of the morphology of neural stem cells over their entire length, we constructed a system to label cell membranes and cytoplasm in a variety of ways.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経発生 大脳皮質 神経幹細胞 放射状グリア 細胞間接着 細胞分裂

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発生過程において、組織を構成する細胞は細胞種の特성에応じて分裂し、移動し、変形する。それらの振舞いは周囲の細胞から様々な影響を受け、ばらつきや不確定性が生じる。様々な細胞が集団となることで、どのようにして組織の秩序が形成されるのかを知ることは、発生研究の重要な課題である。

哺乳類の大脳新皮質の発生は、頂端及び基底の上皮構造を持つ神経幹細胞（放射状グリア，RG）が構成する神経上皮シートに始まる。RG から生み出された様々な神経前駆細胞やニューロンが層状に積み上がってゆくことで、最終的に6層構造の秩序が形成される。RG は組織の頂端側の脳室帯（VZ）で核を上下運動させ、分裂する。研究代表者らのこれまでの研究により、RG が頂端構造を失った際、発生初期の「増殖期」には頂端構造を再生する能力を持つことが明らかとなっている（Fujita et al., 2020）。より発生が進み「神経産生期」になると、頂端構造の再生能は減弱する。するとRG はVZに留まることができず、基底側へと移動してしまう。基底側に移動したRG はouter RG (oRG)という神経幹細胞に転じ、VZの外に新たな幹細胞層（OSVZ）を形成するようになる。

この研究における詳細な観察によって、頂端構造が再生する際、周囲の細胞を“足場”として伝えていることが強く示唆された。そこで研究代表者は、増殖期と神経産生期の再生能の違いは、これらの時期における周囲の細胞の振舞いの違いで説明できるのではないかと発想した。増殖期から神経産生期に移行することで分化する細胞の割合が増える。分化する細胞は頂端面から離脱するため、頂端面まで繋がっていない“足場”の割合が増える。このような周囲の分裂パターンの変化が要因となって、頂端構造の再生が起こりにくくなるのではないかという仮説を立てた。これを検証するためには、細胞集団の分裂パターンや移動様式が刻々と変化してゆく中で、それら周囲の細胞が一つの細胞の振舞いに及ぼす影響を定量的に分析する必要がある。そこで、研究代表者がこれまで開発してきた脳発生における分裂系譜のシミュレーションをもとに、細胞間接着等の要素を組み合わせて現象を再現することで、定量的な回答を与えることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では哺乳類大脳皮質発生において、時間とともに変化する細胞集団の振舞い（分裂パターン、分化/未分化状態、形態、等）の特徴量を組織ライブイメージングから収集し、それらの間にある関係を解析することを目的とした。また、計測したパラメータに基づくシミュレーション及び数理モデルを構築することを目指した。具体的には、細胞系譜を確率的遷移モデルで、細胞座標と細胞間接着を骨格モデルで単純化し、大脳皮質発生における細胞の振る舞いの量的変化を再現することを目指した。これらのことを通して、形態再生能の変化がoRGの産生を引き起こし、OSVZの形成に至るまでの時間発展を定量的に解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 頂端面における細胞間接着ダイナミクスの定量

頂端面における細胞間接着のダイナミクスを効率的に定量化するため、頂端面のセグメンテーションと系譜追跡を可能とする画像解析プラットフォームを構築する。

この解析プラットフォームを用いて、接着結合の構成因子に蛍光タンパク質を結合したトラ

ンスジェニックマウスの胎児脳スライス培養で取得したライブイメージング画像を解析し、頂端面における細胞形態及び細胞間接着関係の変化、細胞分裂と細胞分化のダイナミクスを定量化する。これらのパラメータ間の関係性を解析し、細胞の振る舞いの空間的な協調について明らかにする。

さらに、大脳皮質発生初期（増殖期）と後期（神経産生期）でそれぞれ状態遷移パラメータを計測し、時期に応じた細胞ダイナミクスの変化を解析する。

(2) 細胞系譜モデルの構築

これまでに研究代表者が開発した細胞周期待ち時間と状態遷移を組み合わせた細胞系譜モデルを拡張し、細胞分化によって引き起こされる頂端面からの離脱や、離脱後の RG に沿った遊走といった状態変化も考慮した細胞系譜モデルを構築する。マウス胎仔脳の生組織イメージングによって、これら状態遷移の頻度を定量化する。

そのために、頂端面だけでなく、細胞の全形態を測定可能な細胞標識システムを開発し、トランスジェニックマウス ES 細胞株及びトランスジェニックマウス、トランスジェニックヒト iPS 細胞株を新たに樹立する。

(3) 統合モデルの評価, in vivo 研究へのフィードバック

作製した統合モデルの結果を、生組織タイムラプスにおける結果と比較する。細胞種の数・比率、クローンの多様性等の時間発展で評価する。

パラメータの変更実験を行い、oRG 産生効率や、細胞種の構成比率、多様性等に影響を及ぼすパラメータを推定する。そのパラメータ変更に対応した実験を in vivo で検証する。さらに、フェレット胎仔、ヒト iPS オルガノイドで同様のパラメータ群を取得し、種による OSVZ 形成の差を生み出す原因を究明する。

4. 研究成果

(1) 頂端面における細胞間接着のダイナミクスを定量化するための画像解析プラットフォームを共同研究により構築した。細胞のセグメンテーションと細胞系譜のトラッキングを半自動化し、効率的なデータ取得を可能とした。

(2) 構築した画像解析プラットフォームを用いて、神経産生期中期（E13.5）並びに後期（E15.5）における頂端面の神経幹細胞ダイナミクスを解析した。観察した一定時間・一定区画に存在する全細胞の頂端面の形態、細胞同士の隣接と系譜についての定量データを取得した。

(3) 共同研究により、この定量データを細胞をノード、接着関係をエッジとする時空間ネットワークとして表現した。このネットワーク構造を機械学習の手法を用いて解析し、神経幹細胞のふるまいが近傍の細胞の分裂や分化に及ぼす影響について解析した。その結果、近隣の RG 間で分裂のタイミングや細胞運命選択には関連性が見出されなかった。このことから、個々の神経幹細胞は高い独立性を保って振る舞っており、空間的な協調性が乏しいことが示唆された。

(3) RG 細胞の側面における細胞間相互作用の定量化に向け、大脳皮質の深部にまでわたる神経幹細胞の形態ダイナミクスを追跡するための細胞標識システムの開発を行なった。多光子顕微鏡観察に適した蛍光タンパク質を複数用いて、細胞膜と細胞質を標識するマーカーをランダムに発現するコンストラクトを作製し、細胞毎に細胞膜あるいは細胞質を多様に標識するシステムを構築した。そして、このシステムを導入したマウス ES 細胞株を樹立した。このトランスジェニック ES 細胞株から大脳皮質オルガノイドを作製し、マーカー遺伝子の発現を誘導して、細胞標識効率と細胞区画の判別性能について評価した。その結果、個々の細胞が効率良くランダムに標識される様子が観察され、高い判別性能を持つことが確認された。

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 1件）

1. 著者名 Ikumi Fujita, Akatsuki Kimura, Akira Yamashita	4. 巻 24
2. 論文標題 A force balance model for a cell size dependent meiotic nuclear oscillation in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e55770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202255770	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 I Fujita, T Suetsugu, C Kishida, A Omori, Q Wu, Y Tsunekawa, D Konno, A Fujimori, F Matsuza
2. 発表標題 Modeling microcephaly in mice: Induction of outer radial glia potentiates microcephaly phenotype in the Aspm mutant
3. 学会等名 Cell Bio Virtual 2021: An Online ASCB EMBO Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 I Fujita, A Shitamukai, F Kusumoto, S Mase, T Suetsugu, A Omori, K Kato, T Abe, G Shioi, DKonno, FMatsuzaki
2. 発表標題 Regeneration ability of the epithelial structure in neural stem cells alters mammalian cortical architecture
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------