

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22683

研究課題名(和文)母体状態・薬剤が胎生期器官の細胞周期に及ぼす影響：子宮内ライブ評価系の構築

研究課題名(英文)Intrauterine live imaging of embryonic neural stem cells

研究代表者

宮田 卓樹(Miyata, Takaki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70311751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内の胎生13-14日目マウス胎仔を対象として深部への観察力に優れることで知られる二光子顕微鏡を用いたライブ観察を行った。特定の細胞あるいは全ての細胞が光るようなトランスジェニックマウスを用いて、母マウスを麻酔後に開腹し子宮を露出し、手製の支持体などを用いて、二光子顕微鏡の対物レンズを接触させ、胎仔の大脳原基の中の神経幹細胞が分裂する様子をライブで観察することができた。分裂の前後に随伴する核・細胞体と呼ばれる部分の運動性も観察された。本研究は、母体の全身状況および母胎連関が胎内の器官形成にどう影響を及ぼすか理解を深める上で有用な方法論を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内で育つ胎児の器官において発生中の組織が正しく成長するのに不可欠な細胞産生(細胞分裂)に関しては、これまで、間接的な方法(核酸アナログ物質の投与からの追跡)を通じて把握されるのみであった。これでは、母体の変調がどう子宮内胎児の器官形成の場における細胞産生に即座の影響を及ぼしうるかというような、鋭敏な(時間分解能に優れた)把握をすることは不可能であった。本研究が目指し、一定の達成を果たした「子宮内のマウス胎仔の脳原基における細胞産生」の「直接、ライブでの観察」は、今後、高血圧、糖尿病などの疾患、薬剤の影響などをリアルタイムで調べていく取り組みの基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have explored the dynamic behaviors of mammalian neural progenitor cells (NPCs) using slice cultures in which three-dimensional systems conserve in vivo-like environments to a considerable degree. However, live observation of NPCs existing truly in vivo has yet to be established in mammals. Here, we performed intravital two-photon microscopic observation of NPCs in the developing cerebral cortex in utero. Fetuses in the uterine sac were immobilized and observed through a window made in the uterine wall and the amniotic membrane while monitoring blood circulation, which enabled us to quantitatively assess NPC behaviors, such as division and interkinetic nuclear migration, at embryonic day (E) 13 and E14. This study will facilitate future understanding of how organogenetic cellular behaviors occur or are pathologically influenced by the systemic maternal condition and/or maternal-fetal relationships.

研究分野：発生学

キーワード：生体内イメージング 細胞分裂 二光子顕微鏡 神経幹細胞 細胞移動

### 1. 研究開始当初の背景

出生後まで細胞産生がつづく多くの器官と異なり、大脳を初めとする多くの脳領域では、細胞づくりが胎生初期～中期のみに起きる。これは、胎生後期から生後にかけて進むべき神経回路形成と細胞新生とを同時に行なうことが細胞作業的に困難であるためと考えられている。このように「あとで遅れを取り戻す」ことが叶わないので、本来の予定期間のうちに確実に十分な細胞を生み出す必要がある。さもないと、生後の脳機能に悪影響がでる恐れがある。こうした脳原基において、正しく細胞づくりが進んでいるかを評価する最も確実な方法は、「現場において間近に見る」ということである。

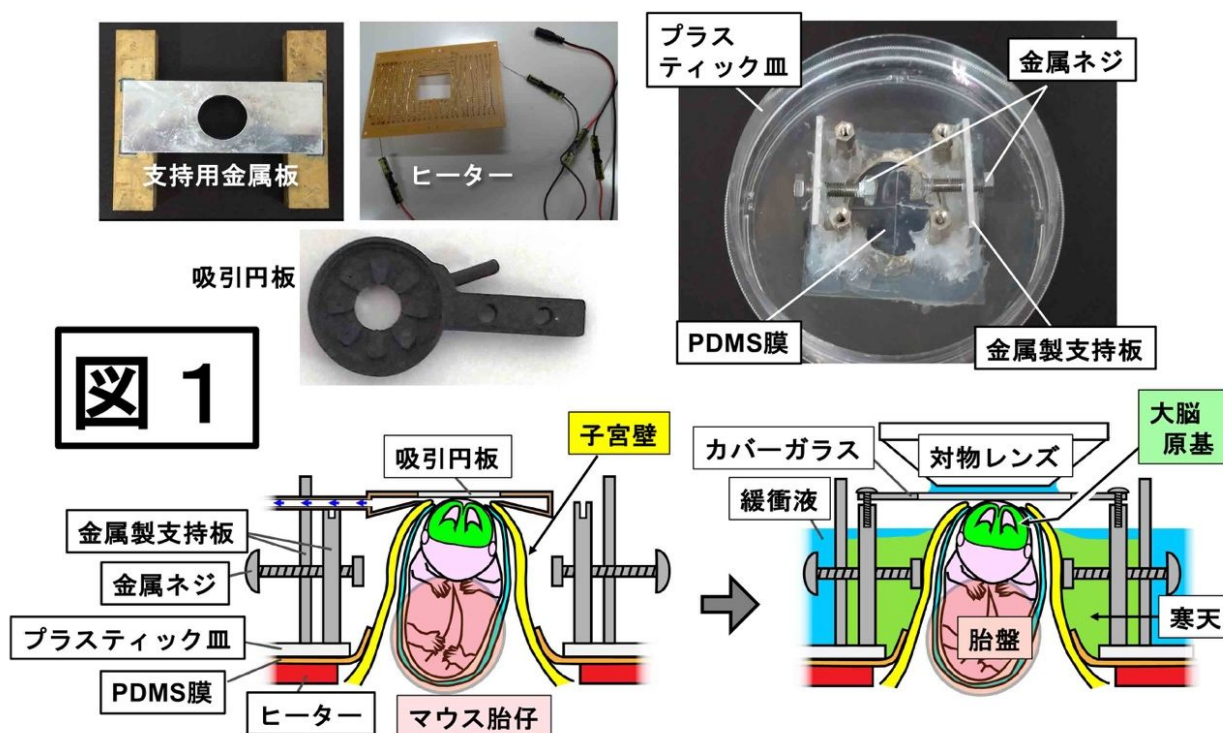
直接「一つの細胞が二つになる」という過程を見つめるということは、プラスチック皿上で培養された細胞に対しては20世紀中から達成されてきたが、三次元的に形成されつつある脳原基組織においては、21世紀初頭に「スライス培養」という手法を用いて、蛍光標識された幹細胞が分裂する様子がライブ観察できるようになった。この「スライス培養」では、確かに三次元性は維持されているものの、スライスされた時点で胎生期マウス個体や母体からは切り離されているので、例えば、母体の状況変化が脳原基の幹細胞のふるまいに対してどのような影響を及ぼすかについて調べることはできない。つまり、理想的には、母体・子宮の中において成長しつつある脳原基に対してそのまま(傷つけることなく)うまく向き合って、本来の生息地において活躍する幹細胞の分裂の様子を観察できるようになりたい。

### 2. 研究の目的

これまでに研究推進者がスライス培養において幹細胞分裂を詳しく観察してきた胎生13～14日目マウス(胎仔)を対象として深部への観察力に優れることで知られる二光子顕微鏡を用いたライブ観察を行い、神経幹細胞の分裂やその他の細胞動態を、培養下ではなく、生体内・子宮内で捉える。

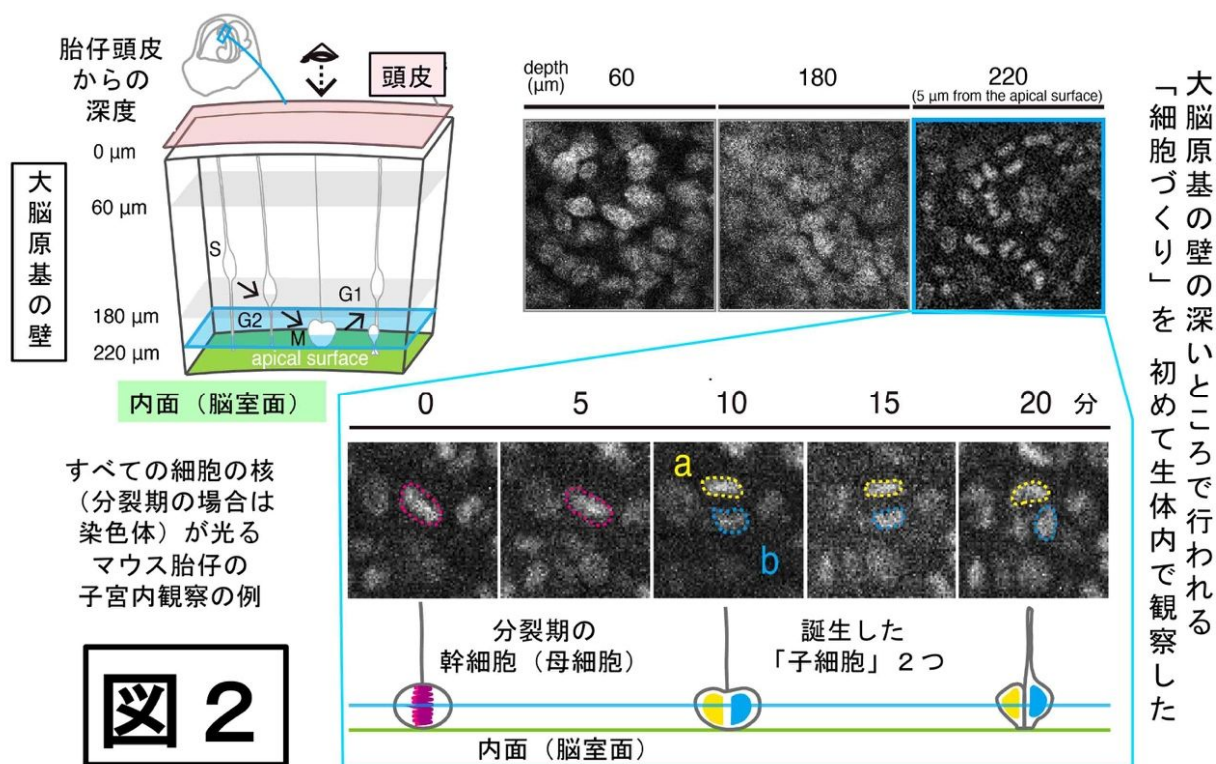
### 3. 研究の方法

イソフルランによる麻酔を施した母マウスを開腹し子宮を露出し、体温管理のためのヒーターや手製の支持体などを用いて、二光子顕微鏡の対物レンズを接触させ(図1)、視野を得た。



具体的には、観察対象と定めた胎仔の大脳半球・頭部付近を覆う子宮壁および羊膜に小窓を開けたのち、胎仔の頭部を「吸引円板」を用いて「仮保持」(図1下段左)した上で、子宮本体に対して、下方のPDMS膜および金属製垂直支持板から発された金属ネジによる支えを施しつつ、寒天による安定的な支持を行なった(図1下段右)。この「ネジ・寒天による支持」ののち、緩衝液を満たして胎仔の乾燥を防ぐ措置を施したのち、胎仔頭部に対してカバーガラスをあて、視野を定めた。

こうした手順を得るまでに、胎仔の保持ができない、保持できても生存させられない(胎盤からの血流を維持できない、母体・胎仔の体温が低下する)など、多くの問題が発生し、対策が必要であった。



**図 2**

細胞標識の方法としては、特定の細胞タイプが光るような仕掛けがなされたトランスジェニックマウスを使用する、蛍光タンパク質を発現するための遺伝子を二光子顕微鏡による観察の数日前に子宮内電気穿孔法によって入れておく、などを組み合わせた。

図2に「すべての細胞の核(分裂中の場合は染色体)が光るようにしたマウス」を用いた観察の例を示す。

#### 4. 研究成果

胎生13日目において、子宮内で生育中のマウス胎仔の大脳原基の神経幹細胞(母細胞)が、壁の最深部、脳室と呼ばれる液腔に面する箇所(すなわち新しい「子細胞」たちが誕生する)様子をライブで観察することができた(図2)。

また、分裂に先立って幹細胞が見せることがスライス培養で観察されていた運動性(核・細胞体と呼ばれる部分が脳原基の内面に向けて動く現象)が、生体内においてどう進むのかを捉えることもできた(Kawasoe et al., Dev. Growth & Differ. 62, 118-128, 2020)。

胎生14日目において、子宮内で生育中のマウス胎仔の大脳原基のミクログリアが脳膜に向けて誘引されて動く様子も観察できた(Hattori et al., Nat. Commun. 11, 1631, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hattori Y, Naito Y, Tsugawa Y, Nonaka S, Wake H, Nagasawa T, Kawaguchi A, Miyata T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transient microglial absence assists postmigratory neurons in proper differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15409-3	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 Kawasoe R, Shinoda T, Hattori Y, Nakagawa M, Pham TQ, Tanaka Y, Sagou K, Saito K, Katsuki S, Kotani T, Sano A, Fujimori T, Miyata T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Two-photon microscopic observation of cell-production dynamics in the developing mammalian neocortex in utero.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 118-128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12648	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 宮田卓樹	4. 巻 38
2. 論文標題 大脳皮質の発生における力学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 TsujiKawa K, Saito K, Nagasaka A, Miyata T	4. 巻 5
2. 論文標題 Mechanical collaboration between the embryonic brain and the surrounding scalp tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Rxiv	6. 最初と最後の頁 442865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.05.05.442865	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 Nagasaka A and Miyata T	4. 巻 9
2. 論文標題 Comparison of the Mechanical Properties Between the Convex and Concave Inner/Apical Surfaces of the Developing Cerebrum.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 702068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.702068	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 Tsujikawa K, Saito K, Nagasaka A, Miyata T	4. 巻 2022
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 451
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hattori Y, Itoh H, Tsugawa Y, Nishida Y, Kurata K, Uemura A, Miyata T	4. 巻 42
2. 論文標題 Embryonic Pericytes Promote Microglial Homeostasis and Their Effects on Neural Progenitors in the Developing Cerebral Cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 362-376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1201-21.2021	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 服部祐季、宮田卓樹
2. 発表標題 胎生期脳におけるミクログリア分布の時空間的制御とその生理学的意義
3. 学会等名 第10回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠田友靖, 宮田卓樹
2. 発表標題 脳室面に存在するElastinは、発生期大脳の力学的特性を担うことで脳発生に関与している
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻川 幸一郎, 齋藤 加奈子, 長坂 新, 宮田 卓樹
2. 発表標題 胎生期の脳と周囲頭皮組織の力学的相互作用について
3. 学会等名 日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻川 幸一郎, 齋藤 加奈子, 長坂 新, 宮田 卓樹
2. 発表標題 胎生期の脳の成長と周囲頭皮組織のなす力学的相互作用と協働的形態形成
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------