

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02656

研究課題名（和文）脳発生の組織・細胞メカニクス：弾性・残留応力の意義と生成・感知の分子機構

研究課題名（英文）Mechanics of brain development: elasticity, residual tissue stress, and mechanosensing

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） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、胎生早・中期（頭蓋骨形成前の）脳原基という中空のドーム型という形状の壁に注目し、ドーム壁がどのようにして頑強さ・適正曲率を持ちつつ劇的な肥厚・成長・形態変化を果し得るのかを理解するために、壁内でどんな細胞がどの向きのどんな力を生じさせ、また受け取るか、個別および集団としての力学的様態を明らかにすることをめざして、応力解放試験を柱とする解析を行った。その結果、胎生中期の大脳原基の壁は、増加し充満したニューロンが「圧縮材」（押し・押され）役、壁の内外面をつなぐ細長い形をした神経前駆細胞（放射状グリア）が「張力材」（引張られ・縮み）役として力学的な協働関係にあることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

建築物・工業製品であれ地球上構造であれ、何かが生じる・作られる場合に「ちから」は必ず意識され、力学的に「どうある」かの理解が「カタチ」の成立を説明する。しかし「哺乳類の脳づくり」は、どんな形態成立原理の探求にも本来欠かせないはずの力学的な視点と、それに沿った解析法をほとんど持たないままであった。本研究がもたらした、胎生期の脳原基における力学的な理解、すなわち、どんな細胞がどの向きのどんな力を受け取るか、は、将来的に「mechanopathy メカノパシー」と括られることになる可能性のある分子病態の理解のための細胞・組織力学の基盤となり得ると予想され、重要である。

研究成果の概要（英文）：When circumferential continuity of the midembryonic cerebral wall was reduced to a degree to leave only a cube-like structure, such cubes observed in culture medium spontaneously changed their overall shapes in 30-60 min, showing the bulging of the neuronal zones to the lateral direction, which was coupled with the thinning of the entire wall. These results indicate that pressure-relieving recoil of the intramural neurons lateral to and beyond the slice edges upon surgery always resulted in thinning of the neuronal layers and shortening of neural progenitor cells along the apicobasal axis. It is therefore suggested that in vivo neurons, packed in a manner compressed centripetally parallel to the wall surfaces (along the circumferential plane including the anterior-posterior and dorsoventral axes), use their counteractingly expansive property to orthogonally (thus apicobasally) stratify themselves to thicken the wall. The wall is therefore under self-tightening for mechanical stability.

研究分野：発生学，解剖学，神経科学

キーワード：脳発生 力学的要因 弾性 圧縮 張力 応力解放試験 アクトミオシン 神経前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

建築物・工業製品であれ地球上構造であれ、何かが生じる・作られる場合に「ちから」は必ず意識され、力学的に「どうある」かの理解が「カタチ」の成立を説明する。例えば、世界五大大陸や日本の山脈・内海の現在のありようと起こりが地中プレートによる押し・引きずりの力で語られるように、あるいは、ろくろ回しに供された粘土が、陶芸家の手指に発された「ちから」を受けてこそ一定の形状をとることで明らかのように、しかしながら「哺乳類の脳づくり」は、どんな形態成立原理の探求にも本来欠かせないはずの力学的な視点と、それに沿った解析法をほとんど持たないまま、もっぱら遺伝子発現、タンパク質機能、化学反応等による理解を目指す形式で研究されてきた。近年、培養皿上の細胞のふるまいの分子原理は、いわゆる「メカノバイオロジー」研究の進展により明らかになってきたが、*in vivo*・三次元の状況の理解に関しては、隔靴搔痒が続いている。生体内、とくに胎生期の脳原基においては、どんな細胞がどういう形をしてどの向きのどんな力を受け取るか、その隣には別のいかなる細胞がいて、個別に、そして集団として、力学的にどう暮らしているか、など、脳の発生過程における力学的要因とその意義に関しての謎が深い。このような問題の研究は、将来的に「mechanopathy メカノパシー」と括られることになる可能性のある分子病態の理解のための細胞・組織力学の基盤となり得ると予想され、重要である。

2. 研究の目的

本研究「脳発生の組織・細胞メカニクス：弾性・残留応力の意義と生成・感知の分子機構」は、胎生早・中期（頭蓋骨形成前の）脳原基という中空のドーム型という形状の壁に注目し、ドーム壁がどのようにして頑強さ・適正曲率を持ちつつ劇的な肥厚・成長・形態変化を果し得るのかを理解するために、壁内でどんな細胞がどの向きのどんな力を生じさせ、また受け取るか、個別および集団としての力学的様態を明らかにすることを最重要の目的と位置付けた。

壁内でどこにどんな向きの「押し」と「引張り」の力が生じ、それらがどう組み合わせられるかに関する研究の例として、以下が参照に値する。

新鮮な植物の中空果実（ピーマン、パプリカなど）や葉鞘（白ネギの茎部）の横断リングは、一箇所をカットすると、カット箇所を広げるように外に開く・反る。同様の「カットされたリングの開き・反り」自動現象は、ヒトを含む哺乳類の大動脈や消化管のリングでも起き、いずれも「元の、輪としての状態においては蓄え・閉じ込められていた組織内の力（＝残留応力：成長期の植物の場合、成長応力と称される）」の外科的解放による反動（リコイル）と見なされる。こうした「切り目入れ・カット」は、基本的な力学的検査法として生物から工業製品にまで広く用いられる残留応力解放試験の一つである。外への開き・反りは、元の輪の深部・内腔面沿いの水胞層が押し（され）合いの状況に、そしてそのせいで外表面近くのクチクラ層が引張り（られ）の状況に、それぞれ「あった」ということを反映している。構造が機能を下支えするしくみの中で、押し（され）・引張り（られ）の組み合わせとしての残留応力が貢献する例は多い。植物は「種子を遠くへ飛ばすバネ仕掛け」や「葉や茎が雨粒や雪の重みに耐える」などに用いており、前述の中空果実・葉鞘の「開き」で知り得る残留応力も「中空」を保つ強度への貢献を示唆する。内腔面沿いの層から水が失われた（しなびた）状態では、外表面近くのクチクラ層の引張りが弱まるために外縁方向に対する力学的抵抗性が弱まる（カットしても「開き・反り」が鈍い）。弾性・反動性の消失・虚脱・減弱が動脈・消化管の機能に悪影響を及ぼすことは医学的に周知である。また、建築の工法・技術として、いかに建材の組み合わせ方により残留応力を仕込むかの調整が重要とされてもいる。これらの例を参照しながら、さまざまな空間分解能の応力解放試験

を柱とする解析を通じて、発生期の脳原基ドーム壁の力学的様態およびその意義について明らかにする。さらに、もう一つの目的として、脳原基ドームと、それを外から取り囲む胎生期頭部内の結合組織との間にどのような力学的関係性があるのかについても解析し、明らかにする。

3. 研究の方法

胎生中期（14日目）のマウス胎仔から大脳半球原基を取り出し、DMEM/F12培養液を入れたプラスチック皿（6 cm 径）中で、実体顕微鏡下に、微細ピンセットを用いて脳膜を除去したのち、同培養液（～3 ml）を載せた透明シリコンゴム底皿（10 cm 径、市販のシリコンゴムを流し込み固化させて作成、手製まな板として使用）上で、冠状断等さまざまな方法で微小メスを用いて徒手的にスライス（0.3～0.5 mm 厚）を作成し、そのまま一部を4%パラホルムアルデヒド液で固定、残りを培養液中で観察し、その状況で起きるリコイル等のスライス挙動を記録した。リコイル反応後のスライスも4%パラホルムアルデヒド液で固定。それぞれ凍結切片を作成し蛍光免疫染色に供した。一定時間の連続観察記録は、5% CO₂ 40% O₂ 混合ガスを供給しながら加温式顕微鏡上チャンバーを使用し、倒立顕微鏡により10x対物レンズを用いて行った。

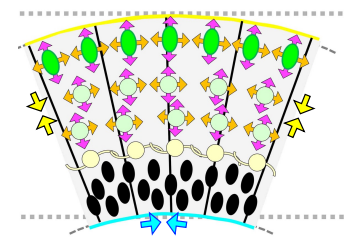
一方、新鮮な大脳壁を座布団状に（2 mm x 2mm 程度）切り出し、原子間力顕微鏡（以下AFM）による壁内面（頂端面）の弾性率測定、レーザー焼灼によるリコイル検査を実施した。

脳周囲の結合組織に対する力学的検査としては、実体顕微鏡下に、早期～中期（12～15日目）のマウス胎仔頭部に対する切開等の操作をDMEM/F12培養液を入れたプラスチック皿（6 cm 径）中で行った。同じ観察系を用いて、結合組織の接線方向収縮性を増減させるための薬理学的実験も行った。一方、ビブラトームで作成した頭部の冠状断スライス（0.5 mm 厚）から脳部分または周囲結合組織部分を取り去ることで起きるリコイル反応の観察も行った。

4. 研究成果

（1）胎生中期の大脳原基の壁は、増加し充満したニューロンが「圧縮材」（押し・押され）役、壁の内外面をつなぐ細長い形をした神経前駆細胞（放射状グリア）が「張力材」（引張られ・縮み）役として力学的な協働関係にあることが分かった（*Neocortical Neurogenesis in Development and Evolution*, 2023）。

前駆細胞たちは頂端面において相互接着性を有し、かつ個々の先端の求心的なアクチン・ミオシン依存的収縮性を有するため、壁の内面・頂端面全体として狭くなるとうとする（培養液中のスライスが、内向きに曲がる・巻く）。これは能動的現象として起きていると思われるが、「曲がり・巻き」現象に部分的にリコイル成分が含有される可能性がある。こうした周方向に沿った縮み（図中、水色矢印）に対して、壁内面の近くにある前駆細胞の核・細胞体（図中、黒い楕円形）がまず壁内の圧縮材として存在していると見なせる。さらに壁の中外層では、分化中・移動中（一部は移動終了直後）のニューロン（図中、淡緑色および緑色）が、前駆細胞を大きく上回る規模で存在しており、それらが周方向に沿った圧縮下にあると分かった（図中オレンジ色の矢印）。この理解は、本来は周方向に長く連続的な壁を0.5 mm程度に狭く（バームクーヘンを個人用に小分けするかのよう）に分割すると、左右の断面からニューロンたちが荷崩れするかのよう溢れ出すというリコイル結果から判明した。興味深いことに、この「分割した（周方向の長さが0.5 mmしかない）スライス」は、側方の溢れ出し・荷崩れと同時に、壁の厚さ（すなわち外面を結ぶ長さ）の減少を示した。つまり「側方荷崩れ」というリコイルが、壁の内

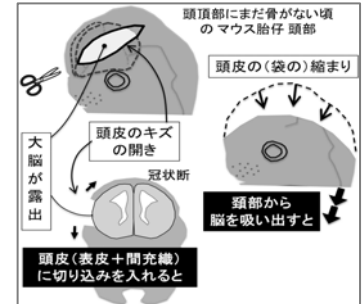


外軸方向への広がり弱めた。このことから、本来の閉じた壁の中にあつては、ニューロンに認

められる側方（周方向に沿った）圧縮は、内外軸に沿った方向への圧縮（図中、ピンク色矢印）と連動しているのだと分かった。この解釈を裏付けるように、そうした「内外軸に沿った圧縮材」配置と同じ軸に沿って共存する前駆細胞（放射状ファイバー部分）を切ると、両断端は縮み、放射状ファイバーは、内外軸に沿った張力材と見なせる（図中、黄色矢印）ことも分かった。こうした状況は「充満」と「自縛」の組み合わせによる壁強度保証と解釈することが可能である。

（2）頭頂側にまだ骨が形成されていない胎生早期～中期の頭部において、外向けに拡大的成長する脳原基は周囲の結合組織（表皮＋皮下組織）を押し広げており、一方でその結合組織は豊富な弾性繊維に基づくリコイルとアクトミオシン依存的収縮性によって接線方向に縮もうとしているという、力学的相互関係が明らかになった（*Dev. Dyn.* 251, 1107–1122, 2022）。

脳による外向けの押し広げ、すなわち接線方向の引張りは、表皮および結合組織の細胞の増殖に対して正の効果を有すると、張力負荷ありなしのもとで行った培養実験によって示唆された。



（3）その他（関連研究）

- ・背側大脳と腹側大脳とで「凹」「凸」という異なる脳室面形状が生じる理由を、頂端面に対する AFM 計測、レーザー焼灼他の手法を組み合わせる問い、F-actin の濃淡を含む複合的な理由がありそうであると見出した（*Front. Cell Dev. Biol.* 9: 702068, 2021）。
- ・血管周囲細胞との相互作用がミクログリア機能に関わっていることを見出した（*J. Neurosci.* 42, 362–376, 2022）
- ・胎生 12 日大脳周囲のマクロファージが薄い蓋板上皮を貫通して脳室へ侵入しさらに脳壁内面にもぐりこみ、やがてミクログリアに分化すると見出した（*Cell Rep.* 42, 112092, 2023）。

論文

Nagasaka A. and Miyata, T. Comparison of the mechanical properties between the convex and concave inner/apical surfaces of the developing cerebrum. *Front. Cell Dev. Biol.* 9: 702068, 2021. [10.3389/fcell.2021.702068](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.702068).

Tsujikawa K. Miyata T. (4 人中 4 番目) Developmentally interdependent stretcher-compressor relationship between the embryonic brain and the surrounding scalp in the preosteogenic head. *Dev. Dyn.* 251, 1107–1122, 2022. <https://doi.org/10.1002/dvdy.451>

Hattori Y, Miyata T (7 人中 7 番目). Embryonic pericytes promote microglial homeostasis and their effects on neural progenitors in the developing cerebral cortex, *J. Neurosci.* 42, 362–376, 2022. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1201-21.2021

Hattori Y, Miyata T (13 人中 13 番目) CD206⁺ macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia. *Cell Rep.* 42, 112092, 2023. DOI:10.1016/j.celrep.2023.1120

Miyata T. Mechanical and physical interactions involving neocortical progenitor cells (Chapter 7), In *Neocortical Neurogenesis in Development and Evolution*, Huttner W. B., ed., Wiley, 2023. <https://doi.org/10.1002/9781119860914.ch7>

招待講演

- 1) Takaki Miyata 「Developing cortex as a mechanophysically growing ‘ecosystem’」
RIKEN CBS Seminar (2023年11月)
- 2) 宮田卓樹 「動物の脳というドーム構造の建築工法」 *日本建築学会* (2022年9月)
- 3) 宮田卓樹 「脳の成長的建築：密に詰まった細胞たちによるセンシングとアクチュエーション」 *日本植物生理学会* (2022年3月)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hiroki Katsuta, Satoru Okuda, Kazuaki Nagayama, Hiroaki Machiyama, Satoru Kidoaki, Masashi Kato, Masahiro Sokabe, Takaki Miyata, Hiroaki Hirata	4. 巻 26
2. 論文標題 Actin crosslinking by α -actinin averts viscous dissipation of myosin force transmission in stress fibers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106090	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 Yuki Hattori, Daisuke Kato, Futoshi Murayama, Sota Koike, Hisa Asai, Ayato Yamasaki, Yu Naito, Ayano Kawaguchi, Hiroyuki Konishi, Marco Prinz, Takahiro Masuda, Hiroaki Wake, Takaki Miyata	4. 巻 42
2. 論文標題 CD206+ macrophages transventricularly infiltrate the early embryonic cerebral wall to differentiate into microglia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112092	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 該当する
1. 著者名 Daisuke Saito, Ryosuke Tadokoro, Arata Nagasaka, Daisuke Yoshino, Takayuki Teramoto, Kanta Mizumoto, Kenichi Funamoto, Hinako Kidokoro, Takaki Miyata, Koji Tamura, Yoshiko Takahashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Stiffness of primordial germ cells is required for their extravasation in avian embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105629	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 Shengming Wang, Yu Fu, Takaki Miyata, Sakiko Matsumoto, Tomoyasu Shinoda, Kyoko Itoh, Akihiro Harada, Shinji Hirotsune, Mingyue Jin	4. 巻 42
2. 論文標題 Functional cooperation of α -synuclein and tau is essential for proper corticogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7031-7046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0396-22.2022	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 該当する

1. 著者名 Yosuke Ogura, Kentaro Sahashi, Tomoki Hirunagi, Madoka Iida, Takaki Miyata, Masahisa Katsuno	4. 巻 13
2. 論文標題 Mid1 is associated with androgen-dependent axonal vulnerability of motor neurons in spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-022-05001-6	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 -

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 BioRxiv	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辻川 幸一郎, 島村 司, 篠田 友靖, 宮田 卓樹
2. 発表標題 胎生早中期の脳室圧は頭皮からの拘束のみならず羊水圧からの影響も被る
3. 学会等名 第129回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Asai Hisa, Hattori Yuki, Miyata Takaki
2. 発表標題 Intraventricular macrophages infiltrate the cerebral wall in association with neural progenitor cells
3. 学会等名 第46回 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koichiro Tsujikawa, Takaki Miyata
2. 発表標題 Interventricular pressure of the developing mammalian brain before skull vault ossification: mechanisms and physical roles of pressure generation
3. 学会等名 第56回 日本発生生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tsukasa Shimamura, Miyata Takaki
2. 発表標題 Searching for the mechanism of emergence of community-level efficiencies in the interkinetic nuclear migration in highly proliferative embryonic mouse neuroepithelium
3. 学会等名 第56回 日本発生生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻川幸一郎, 宮田卓樹
2. 発表標題 頭蓋骨未形成期の脳室内圧とは? -----成立のしくみと力学的意義
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田卓樹
2. 発表標題 動物の脳というドーム構造の建築工法
3. 学会等名 2022年度 日本建築学会
4. 発表年 2022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

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 第81回 日本解剖学会中部支部学術集会
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
---------	---------