

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05126

研究課題名（和文）脳脊髄液圧依存的な組織伸展と神経幹細胞への圧縮刺激による神経発生の調節機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of brain development by compressive stress on neural stem cells and brain tissue

研究代表者

中澤 直高（Nakazawa, Naotaka）

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：90800780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳発生に関わる1) 新生ニューロンの遊走、2) 神経芽細胞や神経幹細胞の増殖・分化、に着目した。従来の生化学的・細胞生物学的手法や遺伝学的手法にマイクロデバイス流路を用いたイメージング手法を組み合わせることで、1) 脳組織内を遊走するニューロンが細胞外環境からの圧刺激を検知することで外環境に応じた力学機構を発動させ、狭小な空間を通過する分子機構、2) 細胞外環境からの圧刺激を受けた神経芽細胞およびその細胞核ではいくつかの遺伝子群の発現が変動すること、を明らかにした。さらに、脳組織に圧刺激を付加する新規の実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳はからだ全体を調節する役割を担っていることから、脳の形態形成・機能発現の仕組みを理解することは、我々の健康をどのように維持していくのか？という問いに対する答えの礎となる。本研究の実施により、圧刺激を検知するメカノセンサー分子によって脳発生過程のニューロン遊走が調節されることや分化能をもつ神経芽細胞への圧刺激によって遺伝子発現が調節されることが明らかとなった。これらは、神経科学における積年の謎の一端を明らかにしただけでなく、脳内の圧刺激の検知機構が脳機能に影響を与えるという新たな着眼点を含んでいることから、本研究の研究成果は脳病態の理解や新たな医療技術開発に大きな波及効果があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on 1) cell migration of newborn neurons and 2) proliferation and differentiation of neuroblasts and neural stem cells, which are involved in brain development. By combining conventional biochemical, cell biological, and genetic methods with imaging techniques using a microfluidic device, we have identified 1) the molecular mechanisms of neuronal migration driven by pressure stimuli from the extracellular environment in confined brain tissue, 2) mechanical compression to neuroblasts and their nuclei alters gene expression. Furthermore, we established a novel experimental system to add pressure stimulation to brain tissue.

研究分野：生体医工学

キーワード：神経発生 メカノバイオロジー メカノレスポンス 神経細胞移動

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は全身の制御を司る器官であり、脳が正常に機能するためには神経細胞の精緻なネットワークが瑕疵なく形成される必要があると考えられている。神経細胞の空間配置に影響する要素として、脳発生過程の神経幹細胞の分裂の空間的パターンや神経細胞の遊走が挙げられる。これらの現象は脳内の混み合った環境で起こることが多く、未分化な神経幹細胞や遊走するニューロンがもつ細胞核が外環境からの圧縮力を受けることが予想される。それでは、脳内の圧縮力による刺激は脳内の細胞によってどのように検知され、また神経ネットワーク形成の基盤である神経幹細胞の分化やニューロンの遊走にどのような影響を与えるのだろうか、ということはいまだあまり明らかとなっていない。

神経幹細胞から分化したニューロンは、神経突起同士が複雑に絡みあった狭い空間をかいくぐりながら遊走する。中澤は、小脳切片培養下におけるニューロン遊走の観察により、ニューロン遊走に伴って細胞核が著しく変形することを見出した。興味深いことに、原子間力顕微鏡を用いて細胞核弾性率(硬さ)を測定すると、遊走期の生後3日齢、9日齢マウスのニューロンがもつ細胞核と比較して、遊走終了期の生後15日齢マウスのニューロンでは約2倍硬くなっていることがわかった。中澤は著しい細胞核の変形がDNAに損傷を与えているのではないかと考え、固定した小脳スライス標本において二重鎖DNAの損傷マーカー(リン酸化型H2AX)の集積を大学院生と共に調べたところ、遊走後のニューロンでこれが一過的に上昇することを見出した。中澤らが人工的な狭小通路を通過する細胞核の詳細な形状や空間の狭さとDNA損傷との関係を解析した結果、外環境からの圧縮によって細胞核が変形し、 γ H2AXが一過的に上昇することを確認した。さらにこのDNA損傷が、非相同末端結合に寄与するDNA ligase IVにより修復されることを見出した。これらにより、小脳の遊走ニューロンは狭小間隙を遊走することでその細胞核が強い圧縮力を受けた結果、核内のDNAが損傷を受けるものの、非相同末端結合によって修復されることが示唆された。

上述のように、申請者は脳内を遊走するニューロンを用いた研究から、柔軟な細胞核に加わる圧刺激が、柔らかい細胞核の移動やDNA損傷・修復という複数の異なる細胞機能に関与する可能性を見出した。しかしながら、ニューロンやニューロンがもつ細胞核に加わる圧刺激がどのように検知され、ニューロン遊走や神経幹細胞分化などを介して、神経ネットワーク形成の基盤となる脳発生に影響するのかはほとんど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

上述のように、中澤らは脳内を遊走するニューロンを用いた研究から、柔軟な細胞核に加わる圧刺激が、細胞核移動やDNA損傷・修復という複数の異なる細胞機能に関与する可能性を見出した。

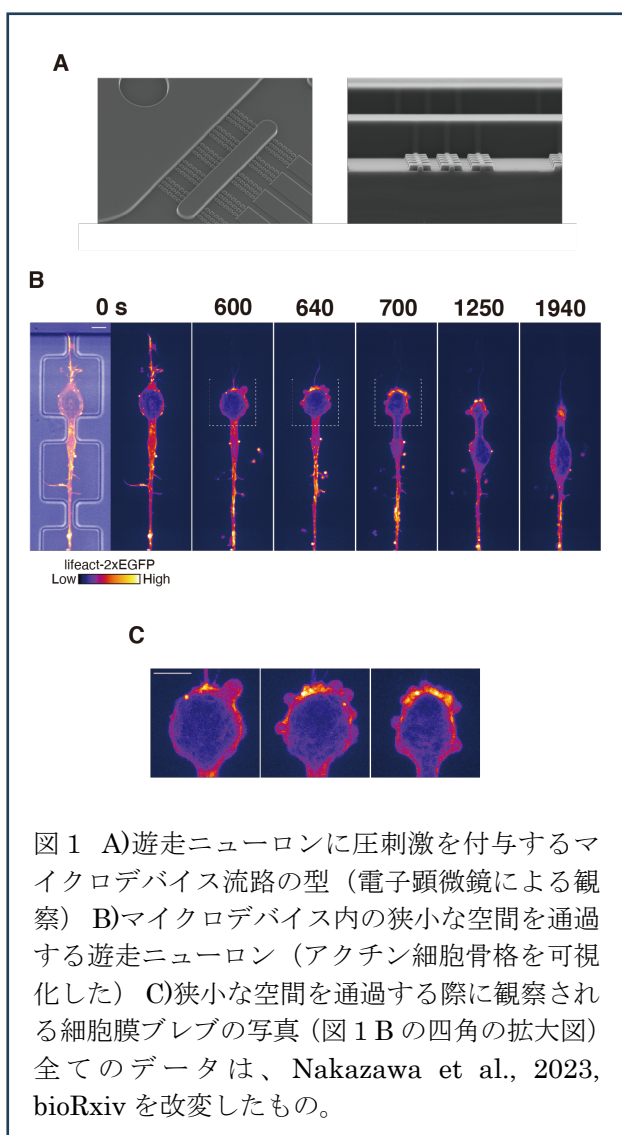


図1 A)遊走ニューロンに圧刺激を付与するマイクロデバイス流路の型(電子顕微鏡による観察) B)マイクロデバイス内の狭小な空間を通過する遊走ニューロン(アクチン細胞骨格を可視化した) C)狭小な空間を通過する際に観察される細胞膜ブレブの写真(図1Bの四角の拡大図) 全てのデータは、Nakazawa et al., 2023, bioRxivを改変したもの。

しかしながら、ニューロンやニューロンがもつ細胞核に加わる圧刺激がどのように検知され、ニューロン遊走や神経幹細胞分化などを介して、神経ネットワーク形成の基盤となる脳発生に影響するのかが明らかでない。そこで、本研究は、初期脳発生期における遊走ニューロンや神経幹細胞に着目し、脳発生期における脳内の圧刺激の機能を明らかにすることを目的とした。これまで発生過程のニワトリ胚において脳脊髄液を漏出させた実験や、神経管の閉鎖が完了しないため脳脊髄液が外部へ漏出する遺伝子改変マウス胚の解析により、脳脊髄液が神経上皮構造に及ぼす影響については示唆されてきたものの、脳脊髄液の静水圧あるいは体積増加による神経上皮組織の伸展が神経上皮の発生に及ぼす影響について、直接的に検証した研究はまだない。すなわち、本研究の遂行により、神経ネットワーク形成の基礎となる神経上皮形態形成の原理に新たな着眼点を与えるとともに、神経科学分野、発生生物学分野などに新しい方法論とパラダイムを与えることができると考えられる。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、1) 脳組織およびマイクロデバイス流路内で圧刺激を受けながら遊走するニューロンの動態観察、2) マイクロデバイス流路内で圧刺激を受けた神経芽細胞における増殖・分化に関わる遺伝子発現の解析、3) 脳脊髄圧を模倣するマイクロデバイスの開発、という3つの実験を行った。

4. 研究成果

初代培養した遊走ニューロン（マウス小脳発生過程における小脳顆粒細胞）をマイクロデバイス流路に播種し、その遊走過程を観察した。その結果、広大な空間を通過する際には観察されない特殊なアクトミオシン動態によって狭小な空間を通過することが分かった（図1）。この動態観察から、狭小な空間を通過する際、遊走ニューロンは細胞外からの圧刺激に晒されている可能性が考えられた。そこで狭小な孔をもつ薄膜材料を用いて、この動態に関わる分子を探索したところ、メカノセンサー分子である PIEZO1 の関与が示唆された。またこの検討中に、細胞膜とアクチン細胞骨格を物理的にアンカーする Ezrin とその動態に関わるプロテインキナーゼ $C\beta$ (PKC β) が小脳顆粒細胞の遊走に

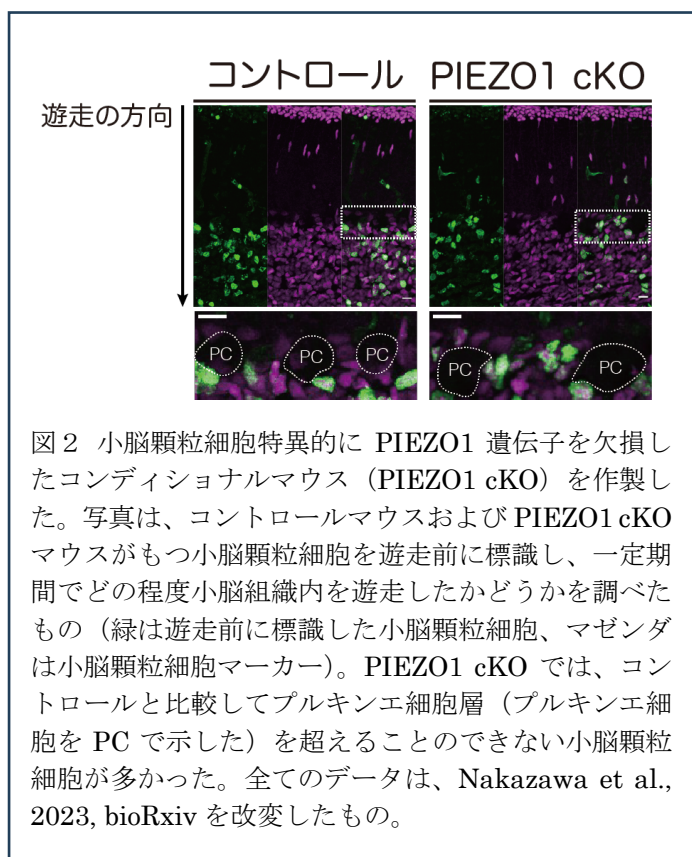


図2 小脳顆粒細胞特異的に PIEZO1 遺伝子を欠損したコンディショナルマウス (PIEZO1 cKO) を作製した。写真は、コントロールマウスおよび PIEZO1 cKO マウスがもつ小脳顆粒細胞を遊走前に標識し、一定期間でどの程度小脳組織内を遊走したかどうかを調べたもの（緑は遊走前に標識した小脳顆粒細胞、マゼンダは小脳顆粒細胞マーカー）。PIEZO1 cKO では、コントロールと比較してプルキンエ細胞層（プルキンエ細胞を PC で示した）を超えることのできない小脳顆粒細胞が多かった。全てのデータは、Nakazawa et al., 2023, bioRxiv を改変したもの。

関わるということが判明し、新たに PIEZO1 との関連を調べた。その結果、PIEZO1 による細胞内カルシウムの上昇によって、PKC β が活性化することで Ezrin が細胞膜に局在し、アクトミオシン動態を調節することが判明した。2022 年度には近畿大学にて独立した研究室を主宰し、本研究を引き続き行った。野々村 恵子博士（野々村班・研究代表者）と共同で、小脳顆粒細胞特異的に PIEZO1 を欠損させたトランスジェニックマウス (PIEZO1 cKO マウス) を作製し、その小脳を調べたところ、小脳組織内で密に細胞が詰まっているプルキンエ細胞層を通過できない小脳顆粒細胞が多数含まれていることが分かった（図2）。また、中澤らと同時期に独立した亀尾 佳貴 博士（芝浦工業大学・准教授）らと共同で、狭小な空間を通過する際の遊走ニューロンの動

態を模倣するコンピューターシミュレーションを作成し、観察されるアクトミオシン動態による細胞膜の収縮が狭小な空間を通過するのに十分であることを確かめた。これらの成果はプレプリント論文として発表し (Nakazawa et al., bioRxiv, 2023)、現在この内容を元にした論文を投稿中である (査読中)。引き続き、森松班と共同で開発した細胞核への機械的なストレスを可視化するプローブ等を用いて、細胞膜のみならず細胞核への圧刺激の影響の検証を続ける。

神経芽細胞や神経幹細胞が脳発生過程で受ける圧刺激に応じて細胞増殖・分化が調節されるかを検証するため、マイクロデバイス流路内を通過させた神経芽細胞の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、圧刺激によって神経細胞増殖および分化に関わる遺伝子群の発現が攪乱されることが明らかとなった。他方、取り出した細胞核で実施した実験でも同様の結果が得られたことから細胞核への圧刺激によって駆動される遺伝子発現調節機構の存在が示唆された。現在、大脳における神経幹細胞を対象に同様の実験を実施し、全遺伝子の発現解析を実施している。今後は、引き続き細胞核への圧刺激によって調節される遺伝子群の解明、および細胞核が圧刺激を検知する機構の解明に引き続き取り組む。また、森松 賢順 博士 (森松班・研究代表者) と共同で開発した細胞核への機械的なストレスを可視化するプローブ等を用いて、細胞核に加わる圧刺激の動態変化を明らかにする。これらの実験は、2022 年度の独立後に実施した。

大脳発生過程において脳組織が脳脊髄液から受ける圧刺激を模倣するマイクロデバイスを製作し、岡本 麻友美 博士 (野々村班・分担者)、平田 宏聡 博士 (平田班・代表者) と共同で、発生過程の大脳切片に圧刺激を与える実験を実施した。今後は、圧刺激が付与された脳組織切片内の細胞動態の観察結果をまとめ、岡本博士、平田博士と共同で論文を投稿する。これらの実験は、2022 年度の独立後に実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirata Hiroaki, Nakazawa Naotaka, Hirashima Tsuyoshi, Ravasio Andrea	4. 巻 11
2. 論文標題 Editorial: Multicellularity: Views from cellular signaling and mechanics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1172921	査読の有無 無
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 Lai Yi-Ting, Sasamura Takeshi, Kuroda Junpei, Maeda Reo, Nakamura Mitsutoshi, Hatori Ryo, Ishibashi Tomoki, Taniguchi Kiichiro, Ooike Masashi, Taguchi Tomohiro, Nakazawa Naotaka, Hozumi Shunya, Okumura Takashi, Aigaki Toshiro, Inaki Mikiko, Matsuno Kenji	4. 巻 150
2. 論文標題 The <i><i>Drosophila</i></i> AWP1 ortholog Doctor No regulates JAK/STAT signaling for left?right asymmetry in the gut by promoting receptor endocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.201224	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 Nakazawa Naotaka, Grecni Gianluca, Kameo Yoshitaka, Takeda Noriko, Sawada Tsuyoshi, Kurisu Junko, Zhang Zhejing, Adachi Taiji, Nonomura Keiko, Kengaku Mineko	4. 巻 -
2. 論文標題 Migrating neurons adapt motility modes to brain microenvironments via a mechanosensor, PIEZO1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2023.01.17.524464	査読の有無 無
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 Frey Tanita, Murakami Tomonari, Maki Koichiro, Kawaue Takumi, Sugai Ayaka, Nakazawa Naotaka, Adachi Taiji, Kengaku Mineko, Ohki Kenichi, Gotoh Yukiko, Kishi Yusuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Age-associated reduction of nuclear shape dynamics in excitatory neurons of the visual cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2022.08.22.504704	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa
2. 発表標題 Molecular mechanisms of mechano-sensing / -response for neuronal migration in 3D brain tissue
3. 学会等名 大阪大学基礎工学研究科 セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Gianluca Greci, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Molecular mechanisms of mechano-sensing / -response for neuronal migration in 3D brain tissue
3. 学会等名 NEURO2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Gianluca Greci, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Mechanical stress by extracellular confinement triggers a mode transition of neuronal migration
3. 学会等名 Materials, Mimics, and Microfluidics: Engineering tools for Mechanobiology (MBI 3M)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 1.Kandel, Eric R., Koester, John D., Mack, Sarah H., Siegelbaum, Steven, 宮下, 保司, 岡野, 栄之, 神谷, 之康, 合田, 裕紀子, 加藤, 総夫(医学), 藤田, 一郎, 伊佐, 正, 定藤, 規弘, 大隅, 典子, 井ノ口, 馨, 笠井, 清登（第7章共訳：中澤直高、見学美根子）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メディカル・サイエンス・インターナショナル	5. 総ページ数 31
3. 書名 カandel神経科学 第2版	

1. 著者名 Hiroaki Hirata, Andrea Ravaio, Naotaka Nakazawa and Tsuyoshi Hirashima	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Frontiers ebook	5. 総ページ数 138
3. 書名 Multicellularity: Views from cellular signaling and mechanics	

1. 著者名 野々村恵子、中澤直高	4. 発行年 2024年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 6
3. 書名 「生物の科学 遺伝」特集4：PIEZOチャネルによる機械刺激受容の生理学的意義	

〔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			
シンガポール	シンガポール国立大学			