

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14563

研究課題名(和文) 機械刺激による神経成長円錐の運動制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of neuronal growth cone motility by mechanical stimulation

研究代表者

戸島 拓郎 (Tojima, Takuro)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・研究員

研究者番号：00373332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経軸索の先端構造体である成長円錐は、細胞外環境を感知し自身の運動性を変化させることで軸索を遠隔の標的まで牽引する。過去の研究により、成長円錐の運動性をコントロールする細胞外因子が多数同定され、これらに応じた成長円錐の走化性機構の理解も長足の進歩を遂げてきた。一方、成長円錐の形態が基質の硬さにより影響を受けたり、成長円錐の前進運動に伴って軸索に張力が発生するといったように、発生期の軸索は様々な機械的刺激を受ける。本課題では、神経回路形成における機械情報の役割の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During embryonic development, axonal growth cones migrates along their correct routes toward distant targets to form neuronal networks. Many previous studies have identified a large number of extracellular axon guidance cues that control growth cone motility. In addition to such chemical cues, migrating axons and growth cones receive a variety of mechanical stimuli from extracellular environments. In the present study, we examined the role of mechanical information in the regulation of growth cone motility during neuronal network formation. We found that axon growth rate is affected by the stiffness of the culture substrate. In addition, our data suggest that the mechanosensitive channel Piezo1 is involved in the regulation of axon growth induced by the substrate stiffness.

研究分野：神経科学

キーワード：成長円錐 軸索伸長 軸索ガイダンス 機械刺激

1. 研究開始当初の背景

神経回路形成過程の神経軸索の先端部に現れる成長円錐は、アメーバのように運動しながら細胞外環境を感知し、自身の運動性を变化させることで軸索を遙か遠隔の標的まで正しく牽引する。本課題の研究代表者を含む多くの研究者により、成長円錐の運動性をコントロールする細胞外因子として、軸索ガイダンス因子、接着因子、神経栄養因子といった非常に多くの生理活性物質が同定され、これら細胞外リガンドに対する受容体や、その下流において惹起される細胞内シグナル伝達経路も次々に明らかになった(文献)。その結果、成長円錐の「化学情報受容」や「走性」のメカニズムについてはその概要がほぼ明らかになりつつある。

ところで、成長円錐が走行する生体内は組織ごとに特有の「硬さ」を持つ。また、伸長中の軸索には成長円錐の前進運動に伴って張力が発生する。さらに、発生期に神経回路が一旦完成した後も動物の体の成長は長期に渡って続くため、これに対応して神経回路を構成する軸索もその長さを延長しなければならない。このように、細胞外から加わる力学情報が成長円錐の運動や軸索の形態形成に大きな影響を及ぼすことが強く予測されるが、そのメカニズムについてはこれまで見過ごされてきた。例えば、成長円錐を材料に用いた先行研究は、ほとんどの場合、2次元の硬いガラス基質に培養された神経細胞を使って行われてきたが、この硬さ環境は生体内とは大きく異なっている。2次元培養環境において成長円錐は、扁平で大きく広がった形態をとり、粒状の明瞭な接着斑構造を多く持つ。一方で、柔らかい組織内の成長円錐は比較的サイズが小さく円錐形の形態をとり、粒状の接着斑構造はほとんど検出できない。このことから、周辺環境の硬さ情報が成長円錐の形態形成に重要な役割を果たしていることが強く予測され、2次元培養下で得られてきた先行研究の結果が完全なアーティファクトであった可能性も考えられる。しかしながら、基質の硬さを考慮に入れた研究はこれまでにほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、発生期の神経軸索や成長円錐が、細胞外からの力を受容し自らの形態・運動性の变化に至るまでの一連のシグナル伝達経路を同定し、神経回路形成における機械情報の重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験材料として、ニワトリ胚(胎生 9-10 日目)の脊髄後根神経節細胞を用いた。通常の硬いガラス培養皿に加えて、組織中を模した柔らかい基質として、マトリゲルを用いた。また詳細は後述するように、3次元(3D)組

織内での神経細胞の微細形態・運動を高い時空間分解能でライブイメージングするための方法として、高感度カメラと冷却イメージングインテンシファイアを搭載した独自のスピニングディスク式共焦点顕微鏡法の開発を進めた。

4. 研究成果

(1) 培養系での解析

まず神経軸索の伸長に対する培養基質の硬さの影響を解析した。柔らかいマトリゲルの上にニワトリ胚脊髄後根神経節細胞を分散培養し、その軸索の長さを計測したところ、硬いガラス基質上の神経細胞と比較して有意に短い軸索を持つことが明らかになった。すなわち、硬い基質は軸索伸長に対して促進的に働くことが明らかになった。

続いて、この軸索伸長促進効果における機械受容チャネルの寄与について検証した。研究当初は機械受容センサーとして TRP チャネルについて解析予定であったが、最近になってカルシウム透過性の機械受容チャネルとして新たに Piezo1 が同定され、これが神経軸索投射にも重要な働きを果たすことが示される(文献)など、大きな注目を集めはじめた。そこで、Piezo1 を活性化する薬剤である Yoda1 (文献) を培養神経細胞に投与し、ガラス上・マトリゲル上での軸索伸長に与える効果を解析した。硬いガラス上における速い軸索伸長は、Yoda1 により抑制される傾向があった。その一方で、柔らかいマトリゲル上での遅い軸索伸長は、Yoda1 存在下では促進され、その軸索長はガラス上での軸索長と同程度であった。以上の結果から、基質の硬さ依存的な軸索伸長効果は、機械受容チャネル Piezo1 の活性化を介して促進されることが示唆された。また、Piezo1 の過剰な活性化は軸索伸長に対して抑制的な効果を持つことも考えられる。

(2) 生体組織解析技術の開発

本課題の遂行には、柔らかいゲルや組織中の神経細胞を生きたままで 3D 観察する技術が不可欠である。我々が独自に開発を進めている高感度カメラ、冷却イメージングインテンシファイア、分光器(3色同時観察が可能)を搭載したスピニングディスク式共焦点顕微鏡により、組織透明化試薬(SeeDB)処理した細胞標本を観察したところ、マトリゲル深部においても高い XYZ 解像度を持った蛍光立体像を得ることに成功した。また、本顕微鏡法の時空間分解能をさらに大幅に向上させるために、高速カメラ(1000 frames/s)による光子数計数と帯域外挿デコンボリューションアルゴリズムを独自に開発し、固定標本では約 70 nm の空間分解能を達成した。また、ピエゾ三角波駆動によりタイムラグなしの高速 3D 撮像(20 volumes/s)に成功した。これにより、細胞内を高速で動き回る輸送小胞の詳細な時空間ダイナミクスが捉えられ

るようになってきた。

(3) 展望

今後は、上述の顕微鏡技術を駆使することにより、張力に応じた軸索シャフトや成長円錐でのカルシウム応答や、さらにカルシウム下流で惹起されていることが予想されるCaMKII、カルシニューリンと言った効果器分子、さらには細胞骨格、接着因子、膜交通系の再編などを可視化解析してゆく予定である。これにより、軸索や成長円錐が細胞外からの力学情報を感じし形態変化に至るまでの一連のシグナル伝達経路が明らかになる。さらに、将来的な損傷神経の再生医療への応用を目指して、軸索に人工的に張力を付加することにより効率的に伸長させるなどの試みを行ってゆく。このような研究により、将来的にはリハビリテーションの効果や有効性の科学的根拠やメカニズムの理解が得られ、人工的な機械刺激により再生軸索の伸長を促進するといった臨床的治療戦略がさらに推進されることが強く期待される。

<引用文献>

Tojima et al, *Nature Neuroscience* 10: 58-66. (2007)

Tojima et al, *Journal of Neuroscience* 29: 7886-7897. (2009)

Tojima et al, *Neuron* 66: 370-377. (2010)

Tojima et al, *Nature Reviews Neuroscience* 12: 191-203. (2011)

Tojima, *Neuroscience Research* 73: 269-274. (2012)

Tojima et al, *Journal of Neuroscience* 34: 7165-7178. (2014)

Tojima and Kamiguchi, *Development, Growth & Differentiation* 57: 291-304. (2015)

Koser et al, *Nat Neurosci*, 19: 1592-1598 (2016)

Syeda et al, *eLife*, 4: e07369 (2015)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Rurika Itofusa, Takuro Tojima, and Hiroyuki Kamiguchi. (2017) Visualization of clathrin-mediated endocytosis during Semaphorin-guided axonal growth. *Methods in Molecular Biology* 1493: 287-298.(査読有) doi: 10.1007/978-1-4939-6448-2_21

Hiroki Akiyama, Tetsuko Fukuda, Takuro Tojima, Viacheslav Nikolaev, and Hiroyuki Kamiguchi. (2016) Cyclic nucleotide control of

microtubule dynamics for axon guidance. *Journal of Neuroscience*, 36:5636-5649. (査読有) doi: 10.1523/JNEUROSCI.3596-15.2016.

[学会発表](計 18 件)

戸島拓郎. 神経軸索ガイダンスを制御する膜交通ダイナミクス. 第1回オルガネラゾーン研究会, 東京医科歯科大学(東京都文京区), 2018年3月8日

戸島拓郎. 高速超解像顕微鏡法により捉えたミリ秒スケールの細胞内膜交通ダイナミクス. 第14回エクストリームフォトンクス研究会, 理化学研究所(埼玉県和光市), 2018年2月6日

戸島拓郎, 中野明彦. Membrane traffic in the neuronal growth cone. 平成29年度4D細胞計測全体会議, 理化学研究所(兵庫県神戸市), 2018年2月1日

戸島拓郎, 中野明彦. 神経成長円錐における膜交通機構. 次世代脳プロジェクト・冬のシンポジウム, 一橋大学(東京都千代田区), 2017年12月22日

戸島拓郎, 中野明彦. 神経成長円錐の進路選択メカニズム. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017), 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 2017年12月6日

戸島拓郎, 須田恭之, 石井みどり, 黒川量雄, 中野明彦. トランスゴルジ網における膜交通の時空間ダイナミクス. RAP第5回シンポジウム「光量子工学」, 仙台市中小企業活性化センター(宮城県仙台市), 2017年11月29日

戸島拓郎. 膜交通による神経成長円錐の運動制御機構. 東京理科大学第11回脳学際研究部門脳科学セミナー, 東京理科大学(千葉県野田市), 2017年11月24日

Takuro Tojima, Yasuyuki Suda, Midori Ishii, Kazuo Kurokawa, and Akihiko Nakano. 4D imaging of coat and adaptor proteins on the trans-Golgi network. Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young Researchers, Taipei (Taiwan), 2017年11月1日

門井宏平, 戸島拓郎, 上口裕之, 秋山博紀, 佐々木貴広, 石川達也, 中山綾子, 寺崎朝子. DRG由来神経細胞の成長円錐の運動におけるlasp-2のSH3 domainの役割. 日本動物学会第88回大会, 富山県民会館(富山県富山市), 2017

年 9 月 21 日

戸島拓郎, 須田恭之, 石井みどり, 黒川量雄, 中野明彦. トランスゴルジ網における膜交通ダイナミクスの可視化解析. 理研公開シンポジウム「観る・測る・解く」4次元細胞計測の現状と未来, 理化学研究所(埼玉県和光市), 2017年6月28日

戸島拓郎, 須田恭之, 石井みどり, 黒川量雄, 中野明彦. トランスゴルジ網における被覆・アダプタータンパク質の時空間動態. 第69回日本細胞生物学会大会, 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2017年6月1日

Takuro Tojima, Yasuyuki Suda, Midori Ishii, Kazuo Kurokawa, and Akihiko Nakano. Spatio-temporal dynamics of coat and adaptor proteins on the trans-Golgi network. The 7th RIKEN JOINT RETREAT, 浜名湖ロイヤルホテル(静岡県浜松市), 2017年2月2日

Takuro Tojima, Yasuyuki Suda, Midori Ishii, Kazuo Kurokawa, and Akihiko Nakano. Spatio-temporal dynamics of coat and adaptor proteins on the trans-Golgi network. 4D細胞計測全体会議, 理化学研究所(埼玉県和光市), 2017年1月25日

戸島拓郎, 須田恭之, 石井みどり, 黒川量雄, 中野明彦. ゴルジ体における膜交通のライブイメージング解析. 第13回エクストリーム・フォトニクス研究会, ホテル竹島(愛知県蒲郡市), 2016年11月14日

戸島拓郎, 須田恭之, 石井みどり, 黒川量雄, 中野明彦. トランスゴルジ網における膜交通機構の可視化解析. 理研シンポジウム 第4回「光量子工学研究 若手・中堅研究者から見た光量子工学の展開」, 理化学研究所(埼玉県和光市), 2016年10月31日

戸島拓郎. 膜動態による神経成長円錐の運動性制御機構. 第89回日本生化学会大会, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市), 2016年9月25日

戸島拓郎. 膜トラフィッキングによる神経軸索ガイダンス機構. 第3回4D細胞計測プロジェクト若手の会, KKR 熱海(静岡県熱海市), 2016年8月31日

石川達也, 中山綾子, 戸島拓郎, 秋山博

紀, 上口裕之, 寺崎朝子. 神経細胞の成長円錐における lasp-2 の役割. 第68回日本細胞生物学会大会, 京都テルサ(京都府京都市), 2016年6月15日

〔図書〕(計 1 件)

戸島拓郎, 上口裕之. (2016) 損傷した神経回路は修復できるか. こころの科学増刊: ここまでわかった! 脳とこころ 2016年7月, pp.86-90 (査読無) <https://www.nippsyo.co.jp/shop/book/7173.html>

〔その他〕

<アウトリーチ活動>

RIKEN 和光サイエンス合宿 2017. 生きている細胞のゴルジ体を観察してみよう. 理化学研究所(埼玉県和光市), 2017年7月26-28日

2017年理化学研究所和光研究所一般公開. 身近な生き物を顕微鏡で観察しよう!. 理化学研究所(埼玉県和光市), 2017年4月22日

2016年理化学研究所和光研究所一般公開. 身近な生き物を顕微鏡で観察しよう!. 理化学研究所(埼玉県和光市), 2016年4月23日

<ホームページ>

戸島拓郎の研究者個人ホームページ. <http://tojimat.web.fc2.com/index.html>

理化学研究所光量子工学研究センター生細胞超解像イメージング研究チームのホームページ. http://www.riken.jp/research/labs/rap/live_cell_superresolution_img/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸島 拓郎 (TOJIMA, Takuro)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・研究員

研究者番号: 00373332