

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0212

研究課題名（和文）新規素材とマイクロ加工技術で再現する脳微小空間を用いたニューロン遊走機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of neuron migration mechanism using brain microspace reproduced by new materials and microfabrication technology

研究代表者

見学 美根子（Kengaku, Mineko）

京都大学・高等研究院・教授

研究者番号：10303801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類脳の皮質形成過程で、神経組織間隙の最適経路を選んで遊走する新生ニューロンは、組織の物理的環境を読み取り、細胞骨格流動を調節する力発生機構を実装していると考えられる。本研究では微小加工技術を駆使して力学的なマイクロ環境を操作できる培養空間を設計し、小脳ニューロンが組織間隙を遊走する運動制御機構を解析した。細胞の微細構造や応力分布の動的変化の高解像ライブ観察と薬理・分子操作実験により、隘路侵入による細胞膜張力の上昇で機械受容チャネルPiezo1が活性化してカルシウムが流入し、PKC-Ezrin経路を介してミオシンが後方細胞膜で収縮し、ニューロンを後方から押す力を生じることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでニューロン遊走は細胞種により異なる細胞機構で制御されると考えられてきたが、本研究でニューロンが細胞外の物理環境を読み取り、複数の分子経路のうち最適な力発生機構を動員することが明らかになった。この発見はニューロン遊走機構の概念を変えるもので、ニューロン遊走の異常を伴う先天的脳奇形や精神神経疾患の病因解明に繋がる可能性もある。また本研究で開発したマイクロ加工デバイスは、様々な遊走性細胞における物性制御の解析にも応用でき、脳発生・変性過程の多くの問題に新しいパラダイムと方法論を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Newly born neurons migrate in crowded brain tissue to their individual sites of function in the developing cortex. This study explored the mechanism by which neurons sense the local physical environment and generate cytoskeletal force to pass through the confined 3-dimensional space. We organized an interdisciplinary team to elucidate the novel mechanism of neuronal migration. We designed micropatterned substrates mimicking the size and geometry of interstitial space of the developing brain tissue and observed cytoskeletal dynamics during confined migration at a high spatiotemporal resolution. Pharmacological and molecular perturbation analyses clarified that the increase in plasma membrane tension activated a mechanosensitive channel PIEZO1. PIEZO1-induced calcium influx triggered the PKC-ezrin cascade, which recruited actomyosin and transmitted its contractile force to the posterior plasma membrane. Our results demonstrate a novel mechano-sensing mechanism of neuronal migration.

研究分野：神経発生学

キーワード：メカノバイオロジー マイクロファブリケーション ニューロン移動 神経発生 細胞骨格 ライブイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生過程や病理過程で、多くの細胞種は高密度に重層した周囲の細胞や間質を押し分けて組織内を遊走し、遠隔の目的地へ到達する。遊走は恒常的にターンオーバーしながら流動するアクチンが細胞接着ヘクラッチされることで発生する力で駆動される。遊走方向は、標的細胞や周辺細胞から発せられる誘引・忌避分子の分布や勾配が、細胞接着分布と細胞骨格動態の偏りを生むことで規定されると説明されてきた。しかし分子の濃度勾配による細胞遊走では細かいランダムウォークの加算で徐々に標的に近づくと予想され、多くの細胞遊走が狭い空間の壁から受ける大きな応力に拮抗しながらも最短ないし最適な経路を通る現象を説明できない。

研究代表者は培養皿上で遊走させたニューロンが基質の形態により著しい変形を起こして軌道修正し、また組織間隙を模した孔に侵入する傾向を持つことを見出した。これらの予備結果から、細胞が物理的環境を読み取り、細胞骨格流動を調節する力発生機構が存在すると考えた。その証明には、ニューロンの物性や動態に最適化したカスタムメイドのマイクロ流体デバイスの開発が必要であったため、本共同研究の発案に至った。

2. 研究の目的

哺乳類脳の皮質形成過程で、新生ニューロンは神経組織間隙に分け入り最適経路を選んで遊走する。この経路選択はシグナル分子の勾配のみでは説明できず、組織の形や配向、硬さ、伸展などの物理的環境が細胞膜に負荷され、遊走の駆動力となる細胞骨格流動を調節する機構が存在すると考えられる。本研究では異分野融合国際共同研究チームを編成し、メカノバイオロジー、マイクロファブリケーション、スマートポリマーの最新知見と技術を駆使して力学的なマイクロ環境や微小刺激を操作できる培養空間を設計し、遊走する細胞の微細構造や応力分布の動的変化を高速高解像ライブ観察で解析する実験系を開発する。これを用い、マイクロ流体力学の概念を用いて組織内を遊走するニューロン運動の新たな分子力学機構を解明することを目標とした。

3. 研究の方法

シンガポールメカノバイオロジー研究所 (MBI) にて、Grenci と中澤が共同して顆粒細胞が組織間隙を通過する現象を再構成する通路状のマイクロスペーサー基板を作成する。京大にてライブ共焦点顕微鏡によりニューロンが通路を通る際の核、細胞骨格、接着のダイナミクスを観察する。骨格ダイナミクスの空間分布を、平面基板を遊走するニューロンと比較解析しつつ、隘路に侵入するためのアクチンの編成機構を解析する。

生後発達期の小脳容積・表面積の急激な拡大に伴い、周辺組織から受けるズリ応力がニューロン遊走の方向性決定に影響する可能性を検証する。宇都 (物質・材料研究機構) が刺激により徐々に異方性に伸長する生体適合性スマートポリマーを開発し、中澤がこの上で顆粒細胞を培養して、基質からの連続的な引張刺激がニューロン遊走の方向付けに寄与するかを検証する。張力に依存する新たなニューロン遊走制御機構の存在が明らかになった場合、責任分子であるメカノセンサーを同定する。

Grenci (MBI) は微細パターン加工、マイクロ流路の設計と作成を行う。宇都 (物質・材料研

究機構)は透過光観察出来る素材、硬さや形態が変化する生体適合性スマートポリマーを開発する。中澤(京大)はニューロンの分子操作とイメージング実験を行う。見学(京大)は細胞実験を行い、研究全体を統括する。 _

4 . 研究成果

マイクロリソグラフィ技術で作成した通路状のスペーサー基板を用い、小脳ニューロンが組織間隙を隘路遊走する運動制御機構を解析した。高解像ライブ観察により、隘路侵入による細胞膜張力の上昇で機械受容チャネル Piezo1 が活性化してカルシウムが流入し、PKC-Ezrin 経路が活性化してミオシンが後方細胞膜に集積してニューロンを後方から押す力を生じることを証明した。

また、150~4000 nm の様々な幅の Line & space 基板を設計し、ニューロンの成長が組織の地形に影響を受ける可能性を検証した。その結果、複数種のニューロンが溝に垂直に軸索を伸展し、平板な基質上の軸索伸長には必要な細胞外基質を要しないことが明らかになった。この現象を地形ガイダンス(topography guidance)と名付けた。

他にも、生後発達期の脳の急激な拡大に伴う張力がニューロン遊走に影響する可能性を実験的に検証するため、異方性伸長するスマートポリマーの開発を進めた。分子構造の最適化により、生体と同程度の時間スケール(数~数十時間)で最大 100%伸長する PEG ハイドロゲル基材を得た。期間内に異方性に伸長し、細胞実験に適用可能な分解制御法を確立するには至らなかったが開発を続行している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakazawa Naotaka, Greci Gianluca, Kameo Yoshitaka, Takeda Noriko, Sawada Tsuyoshi, Kurisu Junko, Zhang Zhejing, Adachi Taiji, Nonomura Keiko, Kengaku Mineko	4. 巻 2023.01.17
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 524464
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 ZHOU CHUYING, KENGAKU MINEKO	4. 巻 46
2. 論文標題 Possible mechanisms of bidirectional nuclear transport during neuronal migration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 2357 ~ 2361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32604/biocell.2022.021050	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 Takahashi Toshio, Fujishima Kazuto, Kengaku Mineko	4. 巻 22
2. 論文標題 Modeling Intestinal Stem Cell Function with Organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10912 ~ 10912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222010912	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 -
1. 著者名 Nakato Mitsuhiro, Shiranaga Naoko, Tomioka Maiko, Watanabe Hitomi, Kurisu Junko, Kengaku Mineko, Komura Naoko, Ando Hiromune, Kimura Yasuhisa, Kioka Noriyuki, Ueda Kazumitsu	4. 巻 296
2. 論文標題 ABCA13 dysfunction associated with psychiatric disorders causes impaired cholesterol trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100166 ~ 100166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.015997	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 Fujishima Kazuto, Kurisu Junko, Yamada Midori, Kengaku Mineko	4. 巻 147
2. 論文標題 III spectrin controls the planarity of Purkinje cell dendrites by modulating perpendicular axon-dendrite interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev194530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.194530	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, Kengaku Mineko	4. 巻 8
2. 論文標題 Mechanical Regulation of Nuclear Translocation in Migratory Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00150	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33件 (うち招待講演 18件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 Force Transmission to the Nucleus during Neuronal Migration in the Developing Brain.
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chuying Zhou, You Kure Wu, Takahiro Fujiwara, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Nesprin-2 coordinates opposing motors to drive nuclear translocation during neuronal migration.
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zhejing Zhang, Noriko Takeda, Hiroyuki Sasanuma, Andres Canela, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Cerebellar granule cells form transient DNA double-strand breaks during postnatal development.
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 見學美根子、中澤直高
2. 発表標題 脳発生におけるニューロン3D遊走は複数の動力で制御される。 3D neuronal migration driven by multiple engines.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 見學美根子、中澤直高、呉攸、Grenci Gianluca
2. 発表標題 脳皮質発生におけるニューロン遊走を制御する細胞骨格モーターの動的連携機構。 Dynamic interplay of cytoskeletal motors during neuronal migration in the developing brain.
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chuying Zhou, You Kure Wu, Takahiro Fujiwara, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Nesprin-2 coordinates opposing motors to drive nuclear translocation in migrating neurons.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤直高、Grenci Gianluca、野々村恵子、栗栖純子、見学美根子
2. 発表標題 組織において神経細胞移動を駆動するメカノセンシング/レスポンスの分子機構
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 Cytoskeletal forces driving neuronal migration in 3D brain tissues.
3. 学会等名 International Symposium on Development and Plasticity of Neural Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷本梨帆、荏原充宏、宇都甲一郎
2. 発表標題 幹細胞機能に関わる動的力学特性を制御可能なハイドロゲルの設計
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 Multiple engines driving nuclear migration in neurons during brain development.
3. 学会等名 RIMS Workshop Mathematical Mechanobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見学美根子
2. 発表標題 ライブイメージングで解くニューロン遊走における核輸送の制御機構
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Gianluca Grenzi and 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 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chuying Zhou, You Kure Wu, Takahiro Fujiwara, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Nesprin-2 mediates bidirectional nuclear transport through a co-dependent interplay between dynein and kinesin-1 in migrating cerebellar granule neurons.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 初田茜、藤島和人、栗栖純子、大野伸彦、見学美根子
2. 発表標題 Oscillation of AMPK activity regulates mitochondrial fission and dendritic development in hippocampal neurons.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本梨帆、荏原充宏、宇都甲一郎
2. 発表標題 幹細胞機能操作のための酵素分解性ハイドロゲルの設計
3. 学会等名 第16回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riho Tanimoto, Mitsuhiro Ebara, Koichiro Uto
2. 発表標題 Design of enzymatically degradable hydrogels for unraveling the dynamic mechanical response of human mesenchymal stem cells
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本梨帆、荏原充宏、宇都甲一郎
2. 発表標題 ヒト間葉系幹細胞の力学応答解明に向けた酵素分解性ハイドロゲルの設計
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riho Tanimoto, Mitsuhiro Ebara, Koichiro Uto
2. 発表標題 Design of enzymatically degradable hydrogels for maneuvering the human mesenchymal stem cells behavior
3. 学会等名 MANA International Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見学美根子
2. 発表標題 Neuronal migration in 3D brain tissue.
3. 学会等名 第14回ニッチ脳神経脈管カンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Gianluca Greci, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Mechanical stress by extracellular confinement trigger a mode transition of neuronal migration.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤島和人、見学美根子
2. 発表標題 Beta IIIスペクトリンのプルキンエ細胞-平行線維間の直交回路形成における役割.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chuying Zhou, You Kure Wu, Mineko Kengaku
2. 発表標題 The dynamic interplay between microtubule-based motors and nuclear movement in migrating cerebellar granule cells.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuto Fujishima, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Cytoskeletal regulation of Purkinje cell dendritic arbor morphology. プルキンエ細胞樹状突起形態形成の細胞骨格制御メカニズム
3. 学会等名 第53回日本発生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Gianluca Grenci, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Mechanical stress by extracellular confinement trigger a mode transition of neuronal migration.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 You Kure Wu, Chuying Zhou, Hiroki Umeshima, Naotaka Nakazawa and Mineko Kengaku
2. 発表標題 Nuclear Migration in 3D Brain Tissue Driven by Cytoskeletal Forces.
3. 学会等名 20th LSACJ2019-International Conference on Interdisciplinary Life Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤直高
2. 発表標題 微小間隙を遊走するニューロンのメカノレスポンス
3. 学会等名 メカノバイオロジー研究を学ぶ 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mineko Kengaku, You Kure Wu, Naotaka Nakazawa, Gianluca Grenci
2. 発表標題 Cytoskeletal forces driving nuclear migration in developing neurons.
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuto Fujishima, Kelly Kawabata-Galbraith and Mineko Kengaku
2. 発表標題 Cell-extrinsic control of dendritic tree patterns of the cerebellar Purkinje cell.
3. 学会等名 Current Trends and Future Directions of Synapse-Circuit Plasticity Research (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤直高、Gianluca Grenci、見学美根子
2. 発表標題 Mechano-responses to the extracellular environment in migratory neurons.
3. 学会等名 日本メカノバイオロジー研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 見学美根子
2. 発表標題 発生中のニューロン核移動を制御する細胞骨格モーターの力発生機構. Mechanisms of force generation by cytoskeletal motors during nuclear migration of developing neurons.
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 Cytoskeletal control of neuronal migration in the developing brain.
3. 学会等名 The SPIRITS International Symposium-2019 Regulation of cell fate and disease treatment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa
2. 発表標題 Mechano-responses to the extracellular environment in migratory neurons.
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 High-resolution Imaging of Neuronal Migration in the Developing Brain.
3. 学会等名 Kyoto University-UCLA/25th iCeMS International Symposium "Harnessing Physical Forces for Medical Application: Convergence of Physics, Nanomaterials, Cell Biology and Cancer Research" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	宇都 甲一郎 (UTO KOICHIRO) (30597034)	国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・独立研究者 (82108)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	中澤 直高 (NAKAZAWA NAOTAKA) (90800780)	京都大学・高等研究院・特定助教 (14301)	

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