

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05125

研究課題名（和文）脳脊髄液の産生組織におけるメカノセンシング動態の解明

研究課題名（英文）Analysis of mechanosensory dynamics in the tissue producing cerebro-spinal fluid

研究代表者

野々村 恵子 (Nonomura, Keiko)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70799246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳脊髄液の産生組織におけるメカノセンシング動態を解明するために、メカノセンサー分子の下流の細胞内シグナルを可視化する系を立ち上げ、この系を用いた解析を行なった。また、メカノセンサー分子を活性化する薬剤を用いた際の、細胞応答をライブイメージング系により解析した。この解析により、脳脊髄液の産生組織および神経上皮において、メカノセンサー分子依存的な細胞内シグナルの動態についてのデータを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳脊髄液は脳実質を取り巻く液体であり、老廃物の除去・栄養の供給・頭部へ物理的な衝撃が加わった際の脳の保護作用を担う。このように正常な脳機能に対して重要性が高い脳脊髄液のメカニカルな要素の制御機構についてはほとんど不明である。本研究において、脳脊髄液産生組織のライブイメージング系を立ち上げたことにより、特定の発生ステージにおけるメカノセンサー分子と細胞内シグナルの関係について明らかにすることが出来た。

研究成果の概要（英文）：This research has aimed to elucidate the mechanosensory dynamics in the tissue producing cerebrospinal fluid. For this purpose, we set up a live imaging system to monitor the intracellular signaling downstream of mechanosensory proteins. We also utilized the drug activating the mechanosensory proteins. With these, we succeeded to obtain data about the dynamics of intracellular signaling downstream of mechanosensory proteins in the tissue producing cerebrospinal fluid.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：メカノセンサーチャネル 脳 イメージング 神経科学 発生生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「脳内に宿命的に存在する圧刺激による脳機能の基盤形成原理」については生物学的・医学的に極めて高い潜在的重要性を持つものを見過ごされてきた課題であった。具体例としては、脳脊髄液は脳の内側の空間である脳室と脳の周囲を満たす液体であり、重力や外部から加わる衝撃などから脳を保護し、脳内で産生されるタンパク質などを輸送路としても機能する(Bothwell et al., 2019, Fluid Barriers CNS)。脳脊髄液の体積は成人で約 130mL であり、脳室内を流れ、1日に約 3、4 回入れ替わる。脈絡叢は脈絡叢上皮細胞から形成されるシート構造と内部の毛細血管および結合組織から構成されており、血漿成分の一部を脈絡叢上皮細胞膜の特定の面に局在するチャンネルやトランスポーターを介して脳室側へと送り出すことにより脳脊髄液を産生する。脳脊髄液の量や圧は脳機能に大きく影響することが知られており、例えば脳脊髄液の貯留量が増加すると脳機能の障害や脳形態の異常である水頭症が生じ、外傷などにより脳脊髄液が外部へ漏出すると起立性頭痛やめまいなどを症状とする脳脊髄液減少症が起こる。しかしながら、脳脊髄液の量や圧、流れなどの機械的な要素が生体内でどのように制御されているのかについてはほとんど判っていなかった。脳脊髄液の影響は、このような成体に限ったものでなく、脳の発生過程および生後発達段階においても予想されてきたが、その生理的な影響の詳細および分子機構については不明であった。これに対し、野々村は脳を構成する複数の細胞種において、メカノセンサー分子の発現を見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「脳内に宿命的に存在する圧刺激による脳機能の基盤形成原理」について、メカノセンサー分子の役割に着目したと解析から明らかにすることであった。より具体的には 1) 発生過程における脳脊髄液量増加に伴う神経上皮組織の伸展に対する神経幹細胞の応答の解明と 2) 脈絡叢上皮での脳脊髄液産生における力学フィードバック的調節機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

野々村は脳を構成する複数の細胞種において、メカノセンサー分子の発現を見出した。そこでこの分子に着目し、遺伝子改変マウスを用いて脳組織に認められる異常の解析、メカノセンシング動態を解明するために、メカノセンサー分子の下流の細胞内シグナルを可視化する系を立ち上げ、この系を用いた解析を行なった。また、メカノセンサー分子を活性化する薬剤を用いた際の、細胞応答をライブイメージング系により解析した。この解析により、脳脊髄液の産生組織および神経上皮において、メカノセンサー分子依存的な細胞内シグナルの動態についてのデータを取得することに成功した。脈絡叢 *ex vivo* 系では数時間程度の短時間の解析は可能であるが、多くの細胞応答には数時間から数日程度の時間を要する。そこで脈絡叢オルガノイド系を用いることで、数時間から数日程度の時間でメカノセンサー分子下流の細胞応答について明らかにすべく、オルガノイド系を用いた実験と解析を実施した。どちらの研究についても本計画研究班構成員である野々村と岡本の他、本学術変革領域研究(B)のメンバーである中澤、森松、平田との共同研究として研究を遂行した。

4. 研究成果

野々村班は 1) 発生過程における脳脊髄液量増加に伴う神経上皮組織の伸展に対する神経幹細胞の応答の解明(岡本、野々村、平田、中澤)と 2) 脈絡叢上皮での脳脊髄液産生における力学フィードバック的調節機構の解明(野々村、中澤、森松、岡本、平田)に向けた研究を行なった。

「発生過程における脳脊髄液量増加に伴う神経上皮組織の伸展に対する神経幹細胞の応答の解明」に関する野々村班の成果：野々村班では、「発生過程における脳脊髄液量増加に伴う神経上皮組織伸展に対する神経幹細胞の応答」の仮説としてメカノセンサー分子が寄与する可能性の検証を、野々村が保有するメカノセンサー分子の Cre 依存的欠損マウス系統について、大脳皮質発生の専門家である岡本が解析することにより実施した。神経前駆細胞が生み出す娘細胞の運命の追跡実験、および、カルシウムイメージングを行った結果、メカノセンサー分子が大脳皮質発生において重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、このメカノセンサー分子が大脳組織に存在する力を実際に感知して神経前駆細胞の運命の調節を行っているかどうかを調べるために、細胞伸展装置であるストレッチチャンバーを用いて大脳組織へ力学刺激を与える実験を実施した。平田と共同研究により、チャンバーのコーティング法を検討し、大脳組織の伸展に成功した。本実験からは、このメカノセンサー分子が大脳発生過程における神経前駆細胞の動態の制御にどのように関わるのか、非常に興味深いデータを得ることができた。これらを論文としてトップジャーナルに投稿準備中である(岡本、野々村、平田ら)。2023 年度には奈良女子大学にて独立した研究室を主催し、本研究を引き続き行った。このメカノセンサー分子による力の感知の下流でどのようなシグナルカスケードが働き、神経前駆細胞の運命の制御につながるのか、その分子メカニズムについて現在引き続き解析を進める。また、上述のように中澤班が作成した「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」を用いてライブイメージングを行うことにより、より *in vivo* に近い力学刺激条件下におけるメカノセンシングおよびメカノレスポンスの関係についての、詳細な解析が可能となると見込んでいる。このよう、「脳内に宿命的に存在する圧刺激による脳機能の基盤形成原理」に関して顕著な研究成果を得た。

「発生過程における脳脊髄液量増加に伴う神経上皮組織の伸展に対する神経幹細胞の応答の解明」に関する野々村班の研究成果：本研究は脳の発生と機能におけるメカノセンシング機構の生理的な役割の解明を目指すものである。そのために、メカノセンサーとしての機能をもつタンパク質に着目し、その発現が認められる脳内の細胞種について、機械的な要素の変動が細胞挙動に及ぼす影響を解析する。2021 年度および繰越期間中には、機械的な刺激の負荷がどのような細胞内シグナル系の変動を伴い細胞挙動の変化をもたらすのかについて、ダイナミクスを含めて検証を行うためのイメージングシステムの検討とセットアップを、脳のライブイメージングを専門とする中澤から助言を得つつ行なった。これにより、蛍光タンパク質レポーターを遺伝的に発現させたマウスの脳組織の *ex vivo* 系において、ライブイメージングにより細胞挙動および細胞内シグナル系の変動を解析できるようになった。このライブイメージング系を用いて、対象脳組織の *ex vivo* 培養に対し、薬剤を添加した場合の細胞内シグナルの変動について解析した。並行して、ライブイメージング系に機械的な刺激を負荷するための系について、組織や細胞に対する力学負荷の影響に詳しい平田の助言を得つつ検討を進めた。導入予定の一部の機器について、新型コロナウイルス流行に伴う製造および物流の遅延の影響を受けたものの、翌年である令和 4 年度に繰り越すことで支障なく検証することができた。森松班により作成された圧刺激負荷チャンバーを含め、複数の種類の機械的な刺激について方法を検討した。また、令和 5 年度には、脳組織の *ex vivo* 系を用いたライブイメージング系において、メカノセンサー分子を活性化する薬剤を添加することにより、顕著な細胞内シグナル変化を検出することに成功した。さら

にこの変化がメカノセンサー分子を遺伝的に欠損させたマウスの脳組織を用いた場合には認められないことについて確認した。加えて、機械的な刺激を負荷した場合にも、細胞内シグナルがメカノセンサー分子依存的に変動することを示唆する予備的結果を得た。今後、解析個体数を増やし統計的な解析を進めた後に、これらの結果を国際的な科学雑誌に報告する予定である。

脈絡叢 ex vivo 系では数時間程度の短時間の解析は可能であるが、多くの細胞応答には数時間から数日程度の時間を要する。そこで脈絡叢オルガノイド系を用いることで、数時間から数日程度の時間でメカノセンサー分子下流の細胞応答について明らかにすることを計画した。本研究期間中には、領域アドバイザーのひとりである京都大学・医生物学研究所永樂元次教授のご協力のもと、野々村研究室においても脈絡叢オルガノイド系についてセットアップを進めた。各種試薬やプラスチック器具などの検討も含めた条件検討の結果、ヒト iPS 細胞由来の神経組織オルガノイド作成についても、組織の分化に関して良好な結果を得た。今後、オルガノイド系においても、薬剤や機械的な刺激の添加にも応じた細胞・組織応答に関して、RNA シークエンスや免疫染色などによる細胞応答解析を進める。これに加えて、ライブイメージング系と組み合わせた解析を行うことで、脳脊髄液産生組織のメカノセンシングダイナミクスについて、より詳細な解析を進める。このように「発生過程における脳脊髄液量増加に伴う神経上皮組織の伸展に対する神経幹細胞の応答の解明」に関して、本研究期間中に研究上最も難しい各種系のセットアップおよび良好な予備実験の取得を達成することができた。今後は、研究室に参入した大学院生らと共に、よりスピードアップして研究を進め、研究成果をトップジャーナルに投稿することを目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 野々村恵子
2. 発表標題 プレッショ脳神経科学の創生：閉鎖空間における圧縮刺激を介した脳機能の発現原理
3. 学会等名 第33回日本神経回路学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keiko Nonomura, Mayumi Okamoto, Naotaka Nakazawa, Hiroaki Hirata
2. 発表標題 PIEZ01-mediated mechanosensation controls multiple events during brain development
3. 学会等名 第46回分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野々村恵子
2. 発表標題 生体の多彩なメカノセンシングを担うPIEZ0チャンネル（2021年ノーベル生理学・医学賞に寄せて）
3. 学会等名 第23回計測自動制御学会 システムインテグレーション部門講演会 SI2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野々村恵子
2. 発表標題 1. 機会受容感覚(皮膚触覚・固有感覚・肺の伸展受容)を司るPIEZ0メカノセンサーチャンネル
3. 学会等名 第55回日本味と匂学会大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京工業大学 野々村研究室
<https://www.nonomura-lab.bio.titech.ac.jp/hp/>

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	岡本 麻友美 (Okamoto Mayumi) (30551965)	奈良女子大学・自然科学系・准教授 (14602)	

	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
研究協力者	森松 順賢 (Morimatsu Masatoshi)		
研究協力者	平田 宏聡 (Hirata Hiroaki)		
研究協力者	中澤 直高 (Nakazawa Naotaka)		

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
---------	---------