

令和元年6月5日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14584

研究課題名(和文)メカニカルストレスの生理的機能の解析

研究課題名(英文)Physiological function of mechanical stress

研究代表者

清水 健史 (Shimizu, Takeshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60398237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニューロンに髄鞘(ミエリン)を形成する中枢神経系のオリゴデンドロサイト(OL)に着目した。まず、機械的刺激(メカニカルストレス)を感受して細胞内の化学シグナルへ変換するメカノセンサーに着目した。その結果、OLがメカニカルストレスをうけてメカノセンサーp130Cas, YAPが活性化すると、OLの形態形成と成熟が抑制されることを明らかにした。また、機械刺激に応答したシグナルが、OLの何れの発生段階に活性化されるかを調べるために、牽引力センサープローブを調製し、OL細胞内で負荷される牽引力を可視化する研究を進めてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体の恒常性の維持や個体発生に関わる因子として、メカニカルストレスは非常に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、中枢神経系の構成細胞の中でも力学的な影響が大きいと考えられるOLに着目した。その結果、メカニカルストレスが、OLの形態形成と成熟を制御することを明らかにした。従来の液性因子シグナルとは性質が異なる細胞外の物理的な環境が重要な役割を果たすことを明らかにすることにより、中枢神経系の形成に関わる新しい学術的な知見や、神経疾患に関わる新規タンパク質の作用機序を明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes (OLs) are myelinating cells of the central nervous system. Recent studies have shown that mechanical factors influence various cell properties. The molecular mechanisms underlying the mechanical regulation of OLs by mechanosensors remain largely unknown. We found that the mechanosensor p130Cas and YAP respond to mechanical stress within OL lineage cells, and control OL morphogenesis and maturation. In addition, in order to investigate when mechanical stresses influence OLs during developmental stages, we have prepared a traction force biosensor and have conducted research to visualize the traction force loaded in OL cells. The traction force sensor probe uses fluorescence resonance energy transfer (FRET) system. Since FRET is highly sensitive to the distance between the fluorophores, FRET efficiency decreases by the loading of traction force in OL cells.

研究分野：分子生物学、生化学、遺伝子操作を用いた中枢神経系を対象とした神経生理学、神経科学

キーワード：オリゴデンドロサイト メカノセンサー 機械刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、機械的刺激(メカニカルストレス)に反応して活性化される化学的シグナルによって各種細胞の性質が制御される機構が注目されてきている。また、個体発生、疾病発症が、メカニカルストレスによって制御されることが報告されているが、未だ中枢神経系におけるエビデンスは極めて少ない。オリゴデンドロサイト(以下 OL)は、前駆細胞からミエリン形成 OL になる過程で、膜面積が約 6500 倍にも拡大するため、OL は中枢神経系細胞の中でも形態変化が著しく、力学的な影響が大きい細胞である。そこでまず、メカニカルストレスを感受して細胞内の化学シグナルへ変換するメカノセンサーに着目し、それらが OL の形態形成、および OL の分化、成熟にどのような影響を及ぼすかを検討した。

一方、細胞の形態が変化すると、細胞膜や細胞骨格の動態変化に伴い、細胞内で牽引力が発生する。一般的に、細胞膜や細胞骨格が伸展する度合いが大きいほど、大きな牽引力が発生することが知られている。神経軸索はニューロンのサブタイプによって直径が異なるため、ミエリン膜を巻きつける OL の突起の先端では、各々の軸索径に依存して、発生する牽引力が異なると考えた。また、神経軸索が盛んに伸長し、神経回路網を構築する段階では OL はミエリン形成を行わず、一旦、神経回路網が形成され、軸索の伸長が落ち着くとミエリン形成が開始される。申請者は、神経軸索が伸長し回路網を構築する最中にはミエリン形成を阻害する機構が働いていると仮定した。その機構として、神経軸索のダイナミクスに伴うメカニカルストレスを OL が感受することを想定した。これらの疑問にアプローチするためには、OL 内で発生する力の計測は極めて重要であると考えられる。そこで本研究課題では、ミエリン形成過程で OL が発生する牽引力をダイレクトに可視化する計画を立てた。そのために申請者は、蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer : FRET)を使った牽引力センサーに着目した。このセンサーは負荷された牽引力に応じて FRET の効率が変化する原理を利用している。すなわち、通常は 2 種類の蛍光分子の距離が至近であるため FRET の効率が良いが、力が負荷されると蛍光分子間の距離が大きくなるため FRET の効率が低下する。細胞内で発生する力の変化をダイレクトに計測することにより、メカニカルストレスが OL の発生過程に関与しているかどうかを調べた。

2. 研究の目的

近年、液性因子のみならず、機械的刺激(メカニカルストレス)に反応して活性化される生化学シグナルによって各種細胞の性質が制御される機構が注目されてきている。各器官の形成過程においてはメカニカルストレスが重要な役割を担うと考えられるが、未だ不明な点が多い。本研究では、ニューロンに髄鞘(ミエリン)を形成する中枢神経系のオリゴデンドロサイト(以下OL)に注目した。OLは、前駆細胞からミエリン形成OLになる過程で、膜面積が約6500倍にも拡大するため、中枢神経系細胞の中でも形態変化が著しく、力学的な影響が大きい細胞である。まず初めに、メカニカルストレスを感受して細胞内の化学シグナルへ変換するメカノセンサーの役割について調べることを目的とした。OLでの発現が観察されたメカノセンサーの内、p130CasとYAPの生体内の機能解析を行うためにp130CasとYAPのノックインマウスを新たに樹立したので、それぞれの過剰発現マウスとノックダウンマウスの解析を行った。また、OL内で発生する力の測定は極めて重要である。そこで、OL細胞内で発生する牽引力が、OLの発生段階に依存してどのように変化するかを調べることを目的とした。牽引力センサープローブを新たに調製した後に、OL細胞に導入し、牽引力の負荷をダイレクトに可視化する研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1)中枢神経系のOLで発現する2種類のメカノセンサーp130Cas, YAPが果たす役割を明らかにするために、すでにp130Cas, YAPの過剰発現、ノックダウンが可能なノックインマウス2系統を自ら樹立している。オリゴデンドロサイト特異的かつ時期依存的にp130Cas, YAPを過剰発現、ノックアウトするために、PLP-tTAマウス、PLP-tTSマウスと交配した。ドキシサイクリンの投与により、時期特異的にこれらのメカノセンサーをノックアウトしたり、神経回路網を構築する前後に異所的にメカノセンサーを過剰発現させたりして、神経回路網の構築過程に対して時期依存的にアプローチする。p130Cas, YAP遺伝子改変マウスの脳切片を作成した後、OLの形態変化およびOLの分化、成熟度について免疫組織化学染色およびin situ hybridization解析を行う。

(2)蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer: FRET)を使った牽引力センサーが報告されている。この牽引力センサーのコンストラクトは、負荷される牽引力に応じてFRETの強度が変化する原理を利用している。ナノファイバーを適当な基質でコートしておく、OL細胞はその人工的なファイバーにミエリンを形成することが報告されている。人工的

にナノファイバーの直径や、硬度を設定して作製することが可能である。そのため、神経軸索の物理的な特性に対する OL の応答を調べるための優れたツールであると考えた。OL は軸索径の太い、細いを選別して、ミエリンを形成することが知られているが、その機構はよく分かっていない。そこで、直径の太いナノファイバーと細いナノファイバーの2種類を用意し、OL が各々にコンタクトした時の牽引力センサーの FRET の強度を計測する。ファイバー直径の大きさによって OL 突起の先端に負荷される力が変化するかどうかを観察する。

4 . 研究成果

本研究では、ニューロンに髄鞘(ミエリン)を形成する中枢神経系の OL に着目した。まず、OL に発現するメカノセンサーが機械刺激を感受し、OL の分化、成熟を制御するシグナルの研究を行った。また、機械刺激に応答したシグナルが、OL の何れの発生段階に活性化されるかを調べるために、牽引力センサープローブを調製し、OL 細胞に負荷される牽引力を可視化する研究を進めてきた。

(1) 生体内の OL 分化、成熟過程において、メカノセンサー p130Cas, YAP が果たす役割を明らかにするために、既に p130Cas-STOP-tet0 マウス、YAP-STOP-tet0 マウスの2系統を自ら樹立した。オリゴデンドロサイト特異的に p130Cas, YAP を過剰発現、ロックアウトするために、PLP-tTA マウス、PLP-tTS マウスと交配した。その後、YAP 過剰発現マウス、および p130Cas 過剰発現マウスの脳切片を作成した。OL の形態変化および分化、成熟度を調べるために、in situ hybridization 法、免疫組織化学染色法、および OL 形態の蛍光解析法を行った。その結果、OL がメカニカルストレスをうけてメカノセンサー p130Cas, YAP が活性化すると、OL の形態形成と成熟が抑制されることを明らかにした (Shimizu et al., GLIA 2017, Shimizu et al., J Neurochem, in press)。

また、OL 内で発生する力の測定は極めて重要である。OL 内で発生する力を可視化するために、蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer : FRET)システムを用いた牽引力センサープローブを利用した。このセンサーは、牽引力に応じた FRET の強度変化から、負荷された力を検量できる。この牽引力センサーを培養 OL に導入した後、FRET の計測を行った。当初、mTFP1-Venus の蛍光ペアを使用していたが FRET のシグナルが弱かったため、蛍光ペアを変更したら良好なシグナルを得ることができた。この計測システムを用いて、OL が軸索状

のファイバーに突起をコンタクトする時に発生する牽引力に着目した。太さの異なるファイバーに対して OL が突起をコンタクトしたときに、ファイバー径の太い細いに応じて発生する牽引力の変化を観察しているところである。

5 . 主な発表論文等

Shimizu T, Osanai Y, Tanaka KF, Thai TQ, Abe M, Natsume R, Sakimura K, and Ikenaka K
Mechanical regulation of oligodendrocyte morphology and maturation by the mechanosensor p130Cas

Journal of Neurochemistry, in press

Shimizu T, Osanai Y, Ikenaka K
Oligodendrocyte-neuron interactions: impact on myelination and brain function
Neurochemical Research 43: 190-194 2018

Shimizu T, Osanai Y, Tanaka KF, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Ikenaka K
YAP functions as a mechanotransducer in oligodendrocyte morphogenesis and maturation
GLIA 65: 360-374, 2017

〔雑誌論文〕(計 3 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし
研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。