

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19453

研究課題名（和文）機械的刺激による軸索ガイダンスの分子・力学基盤

研究課題名（英文）Molecular and dynamic basis of axon guidance by mechanical stimulation

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脳組織の構造的性質や形態形成運動に伴う応力分布の動的変化が、標的に向かい伸展する軸索の伸張方向の制御に關する可能性を検証した。微細加工技術を用いた再構成系の構築とライブ観察、走査電子顕微鏡観察、微小力学測定法を組み合わせた解析により、軸索成長円錐は基質との接着が強い辺縁部で求心性の力を発生し、基質の形状に合わせて伸展方向を決定することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路配線は遺伝的プログラムに従ったタンパク質情報で規定されるというパラダイムを超え、組織空間の機械的性質が軸索走行の制御に關することが示唆された。また最新の生物学、材料科学の技術を取り入れ、細胞の微小物理量を計測する新たな解析系の開発を行なった。これらの知見と技術を発展させれば、細胞自身のもつ力学的性質を利用して細胞運動を自在に誘導するスキャフォールドをデザインすることが可能となり、将来、器質的・機能的に損傷した脳部位への再生医療の基盤技術となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We sought to identify a novel mechanism of axon guidance by mechanical properties of the developing brain tissue. Using nanoimprint lithography, we developed culture substrates with various line & space patterns and observed the growth of primary hippocampal and cerebellar neurons. We found that hippocampal neurons extend the axon perpendicularly to the narrow lines below 200 nm, while it runs along the thicker lines, indicating that axonal growth is influenced by the shape of extracellular substrates. Traction force microscopy revealed the generation of centripetal force at the periphery of extending growth cones. In contrast, actin fibers form random meshwork in the growth cones independently of the growth orientation as observed by scanning electron microscopy. Ongoing efforts to improve the patterned substrates with novel smart materials will clarify dynamic force generation during the oriented axonal elongation by confocal and TIRF microscopy.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：軸索ガイダンス ナノパターン メカノバイオロジー 細胞密着

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

2000年代までの内外の研究で、軸索線維が遠隔の標的ニューロンに到達するまでの道標となる多くの接着因子と分泌因子が同定され、軸索ガイダンス機構についてはその全貌が見えつつある。一方で細胞が外環境の物性を感知して分子シグナルに変換し、細胞運動や転写活性を調節するメカノトランスダクションの機構が徐々に明らかにされている。軸索も外環境の機械的刺激に反応し、培養基質の形状により形態や運動方向を変える事例が近年多数報告されているが、いずれも *in vitro* での現象の記載に留まり、生理的意義や分子機構は殆ど明らかでなかった。本研究は、研究代表者のもつ *in vitro* 再構築系と高解像イメージングにおける技術的優位性を活かしつつ、微小力学計測技術などの新しい解析法を取り入れ、機械的刺激による軸索ガイダンスの細胞分子機構とその生理的意義の解明を目指した。

### 2. 研究の目的

中枢神経系の神経回路形成過程で、ニューロンの軸索は標的細胞や周辺細胞から発せられる誘引・忌避分子の誘導を受けて遠隔の標的に投射する。一方脳組織の構造的性質(間隙、硬さ、形態)や形態形成運動に伴う引張・圧縮などの応力分布の動的変化も軸索伸長に強く影響すると考えられる。小脳顆粒細胞は生後発生過程で軸索を小脳長軸の左右両方向に伸展して平行線維を形成するが、この双極性の軸索伸長は化学シグナルの軸索ガイダンスでは説明不可能で、機構は全く明らかでない。顆粒細胞の軸索伸長に影響を与える物理的環境として、(1)軸索が接する脳組織内の細胞または細胞外基質の配向、(2)軸索形成期の小脳形態形成運動に伴う組織の引張刺激、の2つの可能性がある。本研究ではこれらの物理的刺激が軸索成長円錐の接着と細胞骨格編成を制御し、その分布の偏りにより進行方向を舵取りする分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)組織の構造による軸索ガイダンス：ナノインプリント法で様々な幅・深さの溝を加工した基板を作成し、ニューロンを分散培養して分化させる。高解像ライブ観察技術を用いて成長円錐上の接着複合体の大きさと分布を各幅の溝で比較解析した。また成長円錐の骨格構造の配向を走査電顕で解析した。

(2)組織張力による軸索ガイダンス：生後発達期の小脳容積・表面積の急激な拡大に伴い、軸索は周辺組織から強い引張刺激を受けると考えられる。小脳顆粒細胞を弾性膜(シリコーンシート)上に培養し、Strex社製の培養細胞伸展システムで引張刺激を負荷後、双極性軸索の伸長方向に及ぼす影響を解析した。牽引力顕微鏡法には、0.5% SDSゲルに蛍光マイクロビーズを懸濁して凝固し、ラミネン塗布後顆粒細胞を培養した。成長円錐の進展に伴うビーズの動きをPIVアルゴリズムを適用してイメージ解析した。

### 4. 研究成果

基質の構造に依存するガイダンス機構の探索のため、ナノインプリント法を用いて様々な幅・深さの line & space を加工したシリコン基板を作成し、屈折率がガラスと同程度の COP に転写して培養基質を作成した。小脳顆粒細胞と海馬錐体ニューロンを分散培養して分化させ、軸索走行を観察したところ、顆粒細胞は溝の幅に関わらず平行に軸索を伸長したが、錐体ニューロンは溝の幅 200nm 程度を境に垂直から平行に軸索伸長する方向を変えることが明らかになった。

高解像ライブ観察技術を用いて成長円錐上の接着複合体の大きさと分布の解析を試みたが、基質の厚みと溝の反射の問題で接着面付近の蛍光観察ができなかった。基質の厚みを 800 nm からカバーガラスと同等の 200 nm まで下げて作成したが、症状は改善せず、底面の歪みが生じて焦点面が安定しない問題も発生したため、接着の蛍光観察は断念した。そこでパターン上に培養した軸索末端の走査電子顕微鏡解析を行い、成長円錐の超微形態を詳細に解析した。その結果、成長円錐の糸状仮足はパターン幅 200nm 以下だと line の尾根上を伸びていることがわかった。一方成長円錐中心部のアクチン骨格配向には極性は見られず、成長円錐中心部で網目状に分布していた(図1)。

また、成長円錐で発生する力の定量を行なった。当初計画では張力センサーの TsMod を用いる予定であったが、十分な FRET 効率を得られなかったため、牽引力顕微鏡法を導入した。ニューロンの微弱な力を定量するため 300Pa 以下のヤング率

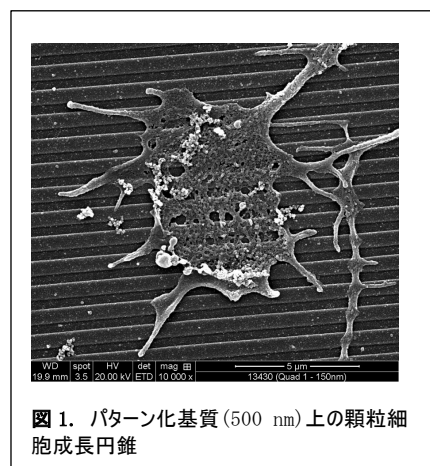


図1. パターン化基質(500 nm)上の顆粒細胞成長円錐

を持つ柔らかいゲルを作成し、ゲル内に懸濁したビーズの位置揺らぎを解析した。その結果、成長円錐は成長に伴い断続的に接着が強い辺縁部で求心性の力を発生していることが明らかになった(図2)。

さらに小脳形態形成運動に伴う組織伸展の機械的刺激が軸索伸長に及ぼす影響を検証するため、小脳顆粒細胞を弾性膜上に培養してStrex STB-1400で最大30%/6時間の異方性引張刺激を負荷し、双極性軸索の伸長方向に及ぼす影響を解析した。しかし引張刺激に対し軸索伸長方向に有意な変化は見られず、組織の成長に伴う引張刺激が軸索ガイダンスを行うという仮説を裏付ける証拠は得られなかった。

本研究では、機械的刺激への応答機構として、細胞骨格の再編成に伴う軸索ガイダンスの可能性を検証した。仮説を裏付ける現象の再構成は見られなかったが、マイクロファブリケーション技術と微小力学計測技術を応用して、細胞遊走に伴う応力場の動的変化(文献7)、基質パターンに依存するアクチン骨格の再編成(文献2)、細胞運動のイメージ解析技術(文献6,8)などの基盤技術が確立された。現在矩形波を生じ連続刺激を与えるのが難しい伸展装置に替え、異方性に伸展する新規素材の開発に着手しており、機械的刺激による軸索ガイダンスの存在を検証していく予定である。

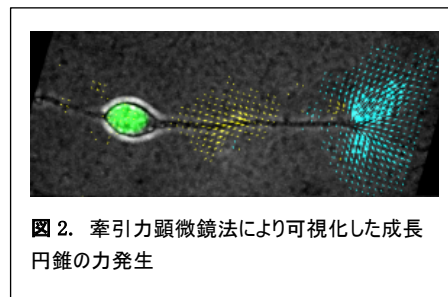


図2. 牽引力顕微鏡法により可視化した成長円錐の力発生

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kengaku, M. Cytoskeletal control of nuclear migration in neurons and non-neuronal cells. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2018, 94(9):337-349. <Review> DOI:10.2183/pjab.94.022.
- ② Linke, P., Suzuki, R., Yamamoto, A., Nakahata, M., Kengaku, M., Fujiwara T., Ohzono, T., Tanaka, M. Dynamic Contact Guidance of Myoblasts by Feature Size and Reversible Switching of Substrate Topography: Orchestration of Cell Shape, Orientation and Nematic Ordering of Actin Cytoskeletons. Langmuir. 2018 in press. 査読有 DOI:10.1021/acs.langmuir.8b02972.
- ③ Fujishima, K., Kawabata Galbraith, K., Kengaku, M. Dendritic Self-Avoidance and Morphological Development of Cerebellar Purkinje Cells. Cerebellum. 2018, 17(6):701-708. <Review> DOI:10.1007/s12311-018-0984-8.
- ④ Kawabata Galbraith, K., Kengaku, M. Multiple roles of the actin and microtubule-regulating formins in the developing brain. Neurosci Res. 2019, 138:59-69. <Review> DOI:10.1016/j.neures.2018.09.008.
- ⑤ Wu Y.K., Kengaku, M. Dynamic Interaction Between Microtubules and the Nucleus Regulates Nuclear Movement During Neuronal Migration. J Exp Neurosci. 2018, 12:1179069518789151. <eCollection> DOI:10.1177/1179069518789151.
- ⑥ Kawabata-Galbraith, K., Fujishima, K., Mizuno, H., Lee, S.J., Uemura, T., Sakimura, K., Mishina, M., Watanabe, N., Kengaku, M. MTSS1 regulation of actin-nucleating formin DAAM1 in dendritic filopodia determines final dendritic configuration of Purkinje cells. Cell Rep. 2018, 24(1):95-106. 査読有 DOI:10.1016/j.celrep.2018.06.013.
- ⑦ Umeshima, H., Nomura, K.I., Yoshikawa, S., Hörning, M., Tanaka, M., Sakuma, S., Arai, F., Kaneko, M., Kengaku, M. Local traction force in the proximal leading process triggers nuclear translocation during neuronal migration. Neurosci Res. 2019, 142:38-48. 査読有 DOI:10.1016/j.neures.2018.04.001.
- ⑧ Wu, Y.K., Umeshima, H., Kurisu, J., Kengaku, M. Nesprins and opposing microtubule motors generate a point force driving directional nuclear motion in migrating neurons. Development. 2018, 145(5) pii: dev158782. 査読有 DOI:10.1242/dev.158782.

[学会発表] (計 10 件)

【研究代表者】見学美根子

- ① Mineko Kengaku Cytoskeletal control of neuronal migration in the developing brain. The SPIRITS International Symposium-2019 Regulation of cell fate and disease treatment (招待講演) 2019.01.28-29, Kyoto, Japan
- ② Mineko Kengaku High-resolution Imaging of Neuronal Migration in the Developing Brain. Kyoto University-UCLA International Symposium/25<sup>th</sup> iCeMS International Symposium “Harnessing Physical Forces for Medical Application: Convergence of Physics, Nanomaterials, Cell Biology and Cancer Research” (招待講演) 2018.11.15-16, Los Angeles, CA USA
- ③ Mineko Kengaku Cytoskeletal control of nuclear movement during neuronal migration. Capital Medical University Symposium ‘A New Era of Molecular and Cellular Neuroscience’ (招待講演) 2018.10.10, Beijing, China
- ④ Mineko Kengaku Dynamics and mechanisms of nuclear migration in brain cells. iCeMS-iTHEMS Joint Workshop on Interdisciplinary Biology (招待講演) 2018.07.04, Kyoto, Japan
- ⑤ Kazuto Fujishima and Mineko Kengaku Molecular mechanism of cytoarchitecture formation of cerebellar neurons. The 3<sup>rd</sup> Japan-US Technical Information Exchange Forum Blast Injury (JUFBI 2018) <Plenary lecture> 2018.05.09-11, Tokyo, Japan
- ⑥ Mineko Kengaku Developing neurons on the move - dynamic sculpting of one-of-a-kind dendritic trees. BSI Retreat (招待講演) 2017 2017.10.31, Omiya Saitama, Japan

【研究分担者】亀井謙一郎

- ⑦ 亀井謙一郎 ボディ・オン・チップ：マイクロ・ナノ工学による「ヒト」モデルの開発とその展望. 第90回大阪大学工業会機械工学系技術交流会 2018.05.11 大阪
- ⑧ 亀井謙一郎、眞下泰正 細胞外微小環境スクリーニングデバイスの開発. 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2017.10.31-11.02 広島 <ポスター>
- ⑨ 亀井謙一郎 マイクロ・ナノ微細加工技術による3次元組織工学. 日本組織培養学会第90回大会 2017.06.30 岡山
- ⑩ Kenichiro Kamei Solving the environmental issues for cells: Towards precise regulation of stem cell functions. 25th ESACT Meeting 2017.05.14-17, Lausanne, Switzerland

【図書】(計2件)

- ① 今井猛、見学美根子 11章 身体の司令塔 脳と神経. 『京大発！フロンティア生命科学』講談社, 2018, 169-177. ISBN: 9784065038017
- ② 梅嶋宏樹、見学美根子 23章 細胞移動と脳層構造の形成. PartIV 脳神経系の高次機能・構造をコントロールする分子群 『脳神経化学 -脳はいま化学の言葉でどこまで語れるか-』化学同人, 2018, 241-253. ISBN: 9784759817263

【産業財産権】

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

【その他】

<アウトリーチ活動>

見学美根子 『ライブイメージングで解く脳皮質形成の細胞運動』25th Cardiovascular Metabolism and Aging Conference 2018年12月21日(金) 18:30~20:00 武田薬品株式会社グローバル本社6階会議室

見学美根子 『培養再構成系を用いた脳発生研究』第41回日本神経科学大会 教育講演 2018年7月27日(金) 11:50-12:50 神戸国際展示場2A会議室

見学美根子 『ライブ観察で解く脳皮質形成のメカニズム』第96回京都大学丸の内セミナー 2018年7月6日(金) 18:00-19:30 京都大学東京オフィス(新丸ビル10階)

見学美根子 『中枢神経系ニューロンの形態ホメオスタシス』大日本住友製薬株式会社創薬研究に関する講演 2017年6月12日(月) 13:30-17:00 大日本住友製薬株式会社研究本部

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 亀井 謙一郎

ローマ字氏名： KAMEI, Kenichiro

所属研究機関名： 京都大学

部局名： 高等研究院

職名： 准教授

研究者番号（8桁）： 00588262

※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。