

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14819

研究課題名（和文）ニューロン遊走における細胞核弾性率の調節機構およびDNA損傷保護機構の解明

研究課題名（英文）A study on the regulation of nuclear mechanics and DNA damage protection in neuronal migration

研究代表者

中澤 直高（Nakazawa, Naotaka）

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：90800780

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：発生過程の小脳組織内を遊走する小脳顆粒細胞において、細胞核の物性に関わるLaminAタンパク質レベルを調べたところ、脳発生過程でそのレベルが変動することを突き止めた。LaminAを強制発現した小脳顆粒細胞では遊走効率が低下したことから、LaminAを介した細胞核弾性率の調節がニューロン遊走に関わることが示唆された。また、ニューロン核への機械的なストレスによって発生するDNA損傷については、狭小な空間を通過した際に53BPが一時的に凝集することを見出した。さらにin vitro実験系と薬剤処理による分子の攪乱実験により、上述のDNA損傷は非相同末端結合によって修復されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の移動は脳内の神経細胞に限った現象ではなく、組織の形づくりや免疫の機能、がん転移など多くの細胞で観察される。先行研究により、人工的な条件下で上皮がん細胞を狭い間隙の中を通過させることで、細胞核の著しい変形が起こりDNA損傷が誘引されることが報告された。これらの研究は、単純な環境における細胞の動きを報告したものであり、これまでに身体の中で同様の現象が起こるか不明であった。本研究の遂行により、からだの中のような複雑な環境下で同様の現象を検証することが可能となる。そのため、本研究は神経細胞移動の仕組みの解明にとどまらず、様々な種類の細胞が移動できる仕組みの理解に波及する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We found that LaminA protein levels fluctuated in migratory cerebellar granule cells during cerebellum development. In addition, overexpression of LMNA in cerebellar granule cells reduced migration efficiency. These suggest that LMNA-mediated regulation of nuclear stiffness is critical for neuronal migration. On the other hand, we found that 53BP transiently aggregated in the nucleus when the migratory neurons passed through confined space. Our experiments using in vitro system and inhibitor treatment revealed that DNA damage by mechanical stress in migratory neurons was repaired by non-homologous end joining.

研究分野：神経科学、細胞生物学、発生生物学

キーワード：ニューロン遊走 細胞核 マイクロデバイス流路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精緻な脳皮質は、分裂層で誕生したニューロンが神経組織間隙を長距離遊走して秩序正しく配置することで形成される。これまで、機械的な力を介した細胞骨格によるニューロン遊走の調節機構に関する研究がおこなわれており、他の体細胞の遊走と同様に微小管およびアクチン細胞骨格におけるモーター分子の活性とその関連因子が重要であることが明らかとされてきた (Trivedi and Solecki, 2011)。ニューロン遊走は、神経突起を伸ばした後に細胞核が細胞質内を移動するという方式をとることが知られており、この点が、他の体細胞が示す遊走とは大きく異なる。小脳切片培養下で顆粒細胞の遊走を観察すると、顆粒細胞がもつ細胞核が大きく変形しながら狭い組織内を遊走する様子が観察された。物体の変形を理解するためには、変形に直接寄与する機械的な力、および物体自身もつ機械的な性質の両者を明らかにする必要がある。両者のうち、ニューロン核がもつ機械的な性質に着目した研究は、ほとんどおこなわれていなかった。

2. 研究の目的

ニューロン遊走は、神経突起を伸ばした後に細胞核が細胞質内を移動することで進行するため、正常な遊走のために細胞核の柔軟性が保持される必要があると考えられる。一方、その柔軟性ゆえ、外環境から受ける機械的ストレスによる DNA 損傷の誘導が予想される。そこで、本研究では、遊走中のニューロン細胞核がもつ弾性率の調節による遊走の促進機構、および DNA 損傷の保護機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発生過程の小脳顆粒細胞におけるニューロン核ラミナ分子の発現レベルの変化の検出
細胞核の内膜では、核ラミナと呼ばれる網目構造が形成されており、細胞核内膜の機械的な性質を規定している。そこで、生後4日、9日、12日、15日の異なる発生過程にある小脳顆粒細胞からタンパク質を抽出し、核ラミナを構成する主なタンパク質である Lamin A、Lamin B1、Lamin B2、Lamin B receptor のタンパク質レベルをウェスタンブロット法によって調べた。

(2) ニューロン核ラミナ分子の発現レベルを攪乱した際のニューロン遊走の観察

(1)の実験から小脳発生過程において Lamin A、Lamin B receptor のタンパク質レベルが変化していたことから、この中で Lamin A に着目することにした。LMNA の cDNA を含む、プラスミドベクターを電気穿孔法によって小脳内の小脳顆粒細胞に導入し、LMNA 遺伝子を過剰発現させた。さらに、LMNA 遺伝子を過剰発現させた小脳顆粒細胞の遊走が阻害されるかを検証した。

(3) マイクロデバイス流路を用いた DNA 損傷動態の観察

マイクロファブリケーション技術によって、脳組織内の狭い空間を模倣するマイクロデバイス流路を作製し、その中でニューロンを遊走させた。その条件下で、DNA 損傷の修復に関わる分子 (53BP1 タンパク質) を蛍光標識し、DNA 損傷修復の動態をライブ観察した。

(4) in vitro 実験系による DNA 損傷の修復機構に関わる分子機構の同定

任意の大きさの穴をもつトランズウェル膜と種々の阻害剤を用いて、DNA 損傷の修復機構に関わる分子を探索した。

4. 研究成果

(1) 発生過程の小脳顆粒細胞において、LaminA タンパク質量は変動する

生後4日、9日、12日、15日の異なる発生過程にある小脳顆粒細胞からタンパク質を抽出し、核ラミナを構成する主なタンパク質である Lamin A、Lamin B1、Lamin B2、Lamin B receptor のタンパク質レベルをウェスタンブロット法によって調べた結果、Lamin A タンパク質は、発生が進行するに従って増加した。一方、Lamin B receptor のタンパク質は発生が進行するに従って、減少した。Lamin A タンパク質の上昇は、細胞核の弾性率を上昇させることが知られていることから、予備実験によって明らかとなっていた細胞核の弾性率の変化と正の相関が観察された。さらに、異なる発生ステージにある小脳顆粒細胞において、LMNA 遺伝子の mRNA の転写レベルの変化を示唆するデータを得たため、遺伝子発現の調節に関わる LMNA 遺伝子の発現調節領域 (CpG アイランド) のメチル化状態を調べた。しかしながら、異なる発生段階で LMNA 遺伝子の DNA メチル化に差は観察されなかった。このことから、小脳発生過程において LMNA 遺伝子の転写レベルの調節機構の存在が示唆されたものの、その分子機構の同定までは至らなかった。

(2) LMNA 遺伝子発現の変動を介した細胞核弾性率の調節が、小脳組織内のニューロン遊走に

影響する

(1)の実験から小脳発生過程において LMNA 遺伝子の発現レベルが変化していたことから、LMNA の cDNA を含むプラスミドベクターを作製した。さらに電気穿孔法によって小脳内の小脳顆粒細胞に導入し、LMNA 遺伝子を過剰発現させた。LMNA 遺伝子を過剰発現した小脳顆粒細胞が、発生過程の小脳内顆粒層に到達する割合を調べたところ、コントロールのサンプルと比較して、その割合が有意に低下していることがわかった。この結果から、LMNA 遺伝子発現の変動を介した細胞核弾性率の調節が、小脳組織内のニューロン遊走に影響することが明らかとなった。

(3)狭小な空間を通過する際にニューロン核内で DNA は損傷し、非相同末端結合によって修復される

まず、GFP 融合型 53BP1 遺伝子を発現するプラスミドベクターを作製し、小脳顆粒細胞に導入した。さらに、この小脳顆粒細胞を脳組織内の狭い空間を模倣するマイクロデバイス流路内で遊走させ、DNA 損傷・修復の動態をライブ観察した結果、狭小な通路を通過した後の細胞核内における 53BP1 の集積が観察された。また、DNA 損傷のマーカであるリン酸化 H2AX を指標として、修復に関わる分子を探索した結果、非相同末端結合に関わる ligase IV の阻害によって、機械的なストレスによって遊走された DNA 損傷が修復されないことが分かった。このことから、機械的なストレスによって誘導されたニューロン核内の DNA 損傷は、ligase IV を介した非相同末端結合で修復されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 N. Nakazawa and M. Kengaku	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 1-11
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8件（うち招待講演 8件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naotaka Naotaka, Gianluca Grenzi, 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 (MBI 3M) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naotaka Naotaka, Gianluca Grenzi, 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回日本生物物理学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中澤直高、Gianluca Grenzi, 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 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中澤直高、Gianluca Grenzi, 見学美根子
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 Naotaka Nakazawa
2. 発表標題 Cellular responses to mechanical influences of the extracellular environment
3. 学会等名 The Japan Society of Mechanical Engineers Hokkaido Branch-Biomechanics Research Meeting (33rd Seminar) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, William Theoputra, Jiang Zixian, Masaki Utsunomiya, Gianluca Grenzi, Shigehiro H. Yoshimura, and Mineko Kengaku
2. 発表標題 Nuclear mechanics in migratory cerebellar granule cells
3. 学会等名 Looking to the future of Developmental Cell Biology Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Mechano-responses to the extracellular environment in migratory neurons
3. 学会等名 International Symposium on nanoarchitectonics for mechanobiology (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Gianluca Greci, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Molecular mechanisms of mechano-sensing / -response for neuronal migration in 3D brain tissue
3. 学会等名 Neuro2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中澤直高、見学美根子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 5
3. 書名 生体の科学 2019年08月号 (通常号) (Vol.70 No.4)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>中澤研究室のウェブサイト https://nakazawalab.com/ iCeMSニュースレターVol.7 (特集メカノバイオロジー) https://www.icems.kyoto-u.ac.jp/ja/pr/pdf/iCeMS_Our_World_Your_Future_v07_j.pdf</p>
--

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

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

シンガポール	シンガポール国立大学メカノバイオロジー研究所			
シンガポール	シンガポール国立大学メカノバイオロジー研究所			
シンガポール	Mechanobiology Institute	National University of Singapore		