

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	臨界期可塑性によるニューロン樹状突起形態変化と神経回路再編成の機構
研究機関・ 部局・職名	京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授
氏名	見学 美根子

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	92,000,000	92,000,000	0	92,000,000	92,000,000	0	0
間接経費	27,600,000	27,600,000	0	27,600,000	27,600,000	0	0
合計	119,600,000	119,600,000	0	119,600,000	119,600,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	3,137,263	25,121,695	13,963,940	30,394,037	72,616,935
旅費	0	827,300	438,810	27,760	1,293,870
謝金・人件費等	0	1,769,734	1,825,883	11,472,509	15,068,126
その他	0	275,142	1,146,672	1,599,255	3,021,069
直接経費計	3,137,263	27,993,871	17,375,305	43,493,561	92,000,000
間接経費計	383,447	1,251,834	2,670,925	23,293,794	27,600,000
合計	3,520,710	29,245,705	20,046,230	66,787,355	119,600,000

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
パソコン	Dell Precision T3500 ベシックパッケージ	1	534,765	534,765	2011/3/31	京都大学
共焦点スキャナボックス	CV1000-SP47・横河電機株式会社製	1	17,850,000	17,850,000	2012/1/25	京都大学
共焦点スキャナボックス用追加対物レンズ	CV1000-SP47用・横河電機株式会社製	1	661,237	661,237	2012/2/24	京都大学
ガス混合装置	衛トクケン TK-MIGM01-02	1	997,500	997,500	2012/12/27	京都大学
超高感度マイク	オリンパス株式会社製・FV12-HSD	1	5,250,000	5,250,000	2013/7/25	京都大学
顕微鏡用チャンバ	株式会社東海ヒートトッ フヒーター-金属2つ割れ タイプ UK-B13J	1	831,600	831,600	2013/7/25	京都大学
FVコントロールユニット	オリンパス株式会社製 (設置調整費含む)	1	519,750	519,750	2013/8/9	京都大学

5. 研究成果の概要

脳内の各種ニューロンが機能に応じて多様な分岐パターンを発達させるメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、分化中のニューロンを1週間以上連続観察するために独自に開発した長期タイムラプス観察系を用い、培養下のプルキンエ細胞、海馬錐体細胞、歯状回顆粒細胞が徐々に複雑な樹状突起を発達させる過程を観察し、伸長・退縮・分岐などのダイナミクス成分の特性を明らかにした。また、発達に伴い急速に容積を拡大していく樹状突起のエネルギー供給のしくみを明らかにした。樹状突起パターンの異常は、様々な発達障害の症状のひとつであり、本研究成果はこれらの疾患の病態理解に貢献できる可能性がある。将来的には、器質的・機能的に障害された神経回路の再生治療への応用の可能性も広がる。

課題番号	LS064
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	臨界期可塑性によるニューロン樹状突起形態変化と神経回路再編成の機構
	Mechanisms underlying the critical period plasticity of dendrite arborization and neural circuit formation
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授
	Kyoto University・Institute for Integrated Cell-Material Sciences・Professor
氏名 (下段英語表記)	見学 美根子
	Mineko KENGAU

研究成果の概要

(和文): 神経回路は、個体が置かれた環境に適応して柔軟に結合パターンを書換えるしくみをもつ。本研究では、神経入力を受信するニューロン樹状突起の複雑な分岐形態が、神経活動や細胞間相互作用により調節される機構を解析した。革新的ライブイメージング技術と定量生物学的解析を融合し、樹状突起が伸長・分岐・退縮の組合せで形作られる原理を明らかにした。また樹状突起が互いに回避し重複を防ぐ機構および伸長中の樹状突起のエネルギー恒常性維持機構を明らかにした。本研究成果は、成長過程での脳神経回路の精密化過程の理解や樹状突起形成不全を伴う発達障害の原因解明に波及効果をもたらす。

(英文): We sought for the mechanisms of how branch patterns in neuronal dendrites are regulated by external environments. Using advanced live imaging techniques and mathematical modeling, we identified the branch dynamics governing shape characteristics of dendritic arbors. We further demonstrated the mechanism and significance of contact-dependent branch retraction in non-overlapping dendrites. The present study provides an important clue for better understanding of physiology and pathology of dendrite patterning during neural circuit development.

1. 執行金額 119,600,000 円

(うち、直接経費 92,000,000円、間接経費 27,600,000円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

哺乳類の神経回路は、遺伝的プログラムとは独立に細胞外環境の変化に対応して結合パターンを柔軟に組み換える機構をもつ。とりわけ生後発達期の一定期間(臨界期)に、外界から受ける刺激により回路の書き換えが頻繁に起こり、神経回路が最適化される現象が多く観察されているが、分子・細胞機構の詳細は明らかでない。本研究では哺乳類脳の臨界期可塑性機構の解明を目指し、小脳プルキンエ細胞の緻密に分岐した樹状突起をモデルとして臨界期の樹状突起パターンリモデリングの細胞・分子機構に取り組んだ。また数理解析を用いて樹状突起パターン形成原理を明らかにすることを目指した。期間中に行った課題は以下3つである。

(1)入力線維の活動による局所的な樹状突起リモデリングの分子機構: プルキンエ細胞に入力する興奮性線維の活動を攪乱した際、樹状突起パターンと局所回路形成に表れる影響を解析し、臨界期可塑性による樹状突起リモデリングの機構を明らかにする。

(2)突起ダイナミクス制御の分子機構: 樹状突起パターン形成ダイナミクスの分子ネットワークを同定する。樹状突起の伸長・分岐・退縮の制御分子機構を解析し、それぞれのシグナルの時空間的拡散を生細胞イメージングにより定量化し、突起ダイナミクスがシグナルのどのような質的量的変化によるものかを検証する。

(3)樹状突起パターンダイナミクスの計算機シミュレーション: 培養プルキンエ細胞の長期ライブイメージング系を用い、突起の伸長・分岐・退縮などの各パラメータの実測値を元に、パターンダイナミクスの計算機シミュレーションを行い、プルキンエ細胞樹状突起の特徴的な空間分布が再現できるか検証する。各パラメータを制御するシグナル経路を数値解析し、樹状突起パターン形成の数理モデル構築を試みる。

4. 研究計画・方法

1) 入力線維の活動による局所的な樹状突起リモデリングの分子機構: Tet-ON システムを用い、二種の興奮性線維の活動をそれぞれ時期特異的に可逆的に抑制できる遺伝子改変マウスを製作する予定であったが、入手した遺伝子改変動物に変異があり、目的の遺伝子改変動物を得られなかった。そのため平行線維入力が生後発達期に消失する vGluT1 欠損動物等の回路異常マウスを分子解剖学的に解析し、入力線維活動による樹状突起パターン修飾が起こる可能性を検討した。

2) 突起ダイナミクス制御の分子機構: 分散培養プルキンエ細胞、海馬錐体ニューロン、歯状回

顆粒細胞を GFP 強制発現により可視化し、各々についてインキュベータ内蔵型蛍光顕微鏡で一週間以上連続観察するシステムを立ち上げた。突起の伸長・分岐・退縮のダイナミクスを定量解析し、さらに薬剤投与や変異遺伝子導入により、樹状突起ダイナミクスの各パラメータの制御に関わる分子を探索した。

3)樹状突起パターンダイナミクスの計算機シミュレーション： 分散培養プルキンエ細胞のタイムラプス観察と定量解析から樹状突起パターン形成を司る突起ダイナミクスのパラメータを抽出し、計算機でプルキンエ細胞の樹状突起成長をシミュレーションするモデル細胞の構築を試みた。

5. 研究成果・波及効果

培養下のプルキンエ細胞、海馬錐体細胞、歯状回顆粒細胞が徐々に複雑な樹状突起を発達させる過程を長期ライブイメージングで観察し、伸長・退縮・分岐などのダイナミクス素成分の特性を明らかにした。さらにプルキンエ細胞について、分岐パターンの発達過程を計算機シミュレーションで再構成することに成功し、ダイナミクス素成分が分岐パターンを如何に形作るかを検証するアクセス系を確立した(図)。突起ダイナミクス

の制御に関わる分子を探索した結果、成長する樹状突起が衝突すると一方が縮退することとその制御に関わる分子を見出し、この縮退が互いに重複しない特徴的な樹状突起パターンの形成に重要であることを実験とシミュレーションで証明した(Fujishima et al., 2013)。さらに突起伸長および安定化には、伸長する樹状突起末端までミトコンドリアが輸送され、局所で産生されたATP がクレアチンキナーゼによりクレアチンリン酸に置換され、突起末端まで補充されることが重要であることを証明した。

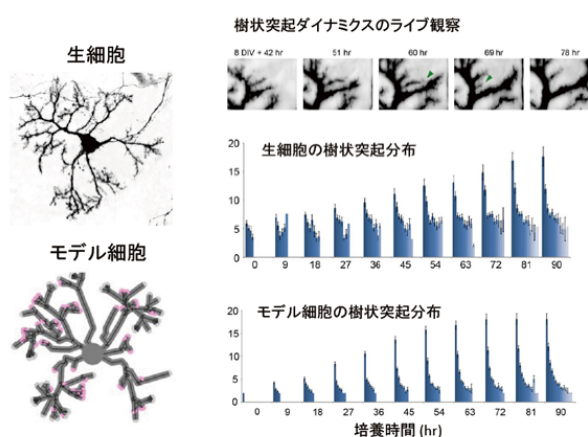


図 樹状突起ダイナミクスのライブ観察とシミュレーション

一方、神経活動依存的な樹状突起リモデリングについて、プルキンエ細胞に入力する平行線維活動が生後発達期から徐々に消失する vGluT1 欠損動物を用いて解析を行った。平行線維活動が消失してから数日後の樹状突起パターンには、大きな変化が認められなかったが、これ以降の効果は、遺伝子欠損の致死効果で見ることができなかった。

樹状突起の分岐形態は、ニューロンの情報処理特性と神経回路配線の決定因子である。しかし、脳内の各種ニューロンが機能に応じて多様な分岐パターンを発達させるメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、分化中のニューロンを1週間以上連続観察するために独自に開発した長期タイムラプス観察系を用い、ダイナミクスを制御する分子シグナルの時空間的加算がパターンに変換される機構の一端を明らかにした。さらにダイナミクスの定量的性質を抽出し、シミュレーションにより樹状突起形態の特徴を再現したモデル細胞を用いてプルキンエ細胞樹状突起分

岐パターンの特徴に寄与するパラメータを明らかにした。本研究は、革新的ライブイメージング技術と定量生物学的解析を融合し、現象の効果をアッセイする新たな系を確立した点で、独創的かつ先進的である。本研究成果と新規技術は、樹状突起リモデリングの機構の理解のみならず、脳神経科学基礎研究の関連分野および細胞・組織の形態制御機構の研究に広く波及効果を見込めるものである。

本研究は臨床医学的にも重要な問題を含む。樹状突起パターンの異常は、ダウン症、自閉症候群、脆弱 X 症候群などの発達障害の症状のひとつであり、樹状パターン形成過程を明らかにすることは、脳神経回路の精密化過程の理解や発達障害の原因の理解を進める上で重要である。また、臨界期機構の異常は適応不全が深く関与する精神疾患（うつ病・統合失調症・自閉症・注意欠陥性多動性障害など）との関連が示唆されている。これらの疾患に伴う樹状突起形態の異常の詳細が明らかになれば、本研究成果を応用して発達中のダイナミクスの異常が予測され、病態理解と病因の解明に貢献できる可能性がある。本研究成果が直接治療法に結びつくものではないが、樹状突起パターン形成機構を理解し、その操作が可能になれば、器質的・機能的に障害された神経回路の再生治療への応用の可能性も広がる。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計5件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計5件</p> <p>Kumeta, M., Gilmore, J.L., Umeshima, H., Ishikawa, M., Kitajiri, S., Horigome, T., Kengaku, M. and Takeyasu, K. (2014) Caprice/MISP is a novel F-actin bundling protein critical for actin-based cytoskeletal reorganizations. <i>Genes Cells</i>.19(4):338-349. doi: 10.1111/gtc.12131. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gtc.12131/full</p> <p>Shimono, K., Fujishima, K., Nomura, T., Ohashi, M., Usui, T., <u>Kengaku, M.</u>, Toyoda, A., and Uemura, T. (2014) An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size. <i>Sci Rep</i>. 2014 Mar 19;4:4415. doi: 10.1038/srep04415 http://www.nature.com/srep/2014/140319/srep04415/full/srep04415.html</p> <p>Hiroki Umeshima and <u>Mineko Kengaku</u> Differential roles of cyclin-dependent kinase 5 in tangential and radial migration of cerebellar granule cells. <i>Molecular and Cellular Neuroscience</i>, 52, 62-72, ISSN:1044-7431, doi: 10.1016/j.mcn.2012.08.005. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044743112001327</p> <p>Kazuto Fujishima, Ryota Horie, Atsushi Mochizuki and <u>Mineko Kengaku</u> Principle of branch dynamics governing shape characteristics of cerebellar Purkinje cell dendrites. <i>Development</i>, 2012, 139, 3442-3455, ISSN: 1011-6370, doi:10.1242/dev.081315, http://dev.biologists.org/content/139/18/3442.long</p> <p>Megumi Kaneko, Kazuhiko Yamaguchi, Mototsugu Eiraku, Motohiko Sato, Norio Takata, Yoshimoto Kiyohara, Masayoshi Mishina, Hajime Hirase, Tsutomu Hashikawa, Mineko <u>Kengaku</u> Remodeling of monoplanar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. <i>PLoS ONE</i>, 2011, 6(5), e20108 doi:10.1371/journal.pone.0020108, ISSN:1932-6203, http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0020108</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計25件</p>	<p>専門家向け 計23件</p> <p><u>Mineko Kengaku</u> Dynamics and Mechanisms of Branch Pattern Formation in Neuronal Dendrites. Kyoto, Japan 2014/3/29 Symposium: Three Domains of Life “from molecule to organism”</p> <p><u>Mineo Kengaku</u> Principles and mechanisms of branch pattern formation governing dendrite growth dynamics. Taipei, Taiwan 2013/12/19-20 KU-NTU Joint Symposium</p> <p><u>Mineko Kengaku</u> Live-imaging analysis of neurons in vitro toward mechanistic understanding of cell motility in developing brains. Göttingen, Germany 2013/9/12-13 The 3rd Japanese-German University Presidents’ Conference 2013 “Challenges and Perspectives in Promoting Young Researchers” Work Group Meetings</p> <p>Kazuto Fujishima, Kansai Fukumitsu, Ryota Horie, Atsushi Mochizuki and <u>Mineko Kengaku</u> MECHANISMS REGULATING SPATIAL DISTRIBUTION OF CEREBELLAR PURKINJE CELL DENDRITES 最先端研究開発支援プログラム FIRST シンポジウム「科学技術が拓く 2030 年」へのシナリオ 2014/2/28-3/1 東京 <ポスター></p> <p><u>見学美根子</u> In vitro ライブイメージングによるプルキンエ細胞樹状突起分岐形成のダイナミクス解析. 東京 2013/10/05 日本顕微鏡学会 分子・細胞動態イメージング研究部会平成 25 年度研究会「複雑なシステムをイメージングにより解明する」</p>

<p><u>Mineko Kengaku</u> Mechanisms and dynamics sculpting cerebellar Purkinje cell dendrites. Kobe, Japan 2012.11.28-29 The 28th International Prize for Biology Commemorative Symposium 'Neurogenesis throughout Life'</p> <p><u>Mineko Kengaku</u> Principles and mechanisms governing dendrite growth dynamics in the cerebellar Purkinje cell. New Orleans, USA 2012.10.10-12 U.S.-Japan Brain Research Cooperative Program-Growth Cones and Axon Regeneration: Entering The Age of Informatics</p> <p><u>見学美根子、藤島和人、福光甘齋、堀江亮太、望月敦史</u> プルキンエ細胞樹状突起にみられるパターン形成のダイナミクスと原理. 名古屋 2012/09/18-21 日本・中国神経科学学会合同シンポジウム: アジア神経科学の最前線 第35回日本神経科学大会</p> <p><u>梅嶋宏樹、吉川修平、佐久間臣耶、金子真、見学美根子</u> 力学的視点から見た神経細胞の移動メカニズム Cell Mechanics of Neucleokinesis in Migrating Neurons. 大阪 2014.3.13-14 第7回神経発生討論会 <ポスター></p> <p><u>福光甘齋、藤島和人、呉攸、吉村安寿弥、John Heuser、見学美根子</u> 小脳プルキンエ細胞樹状突起発生過程におけるミトコンドリアのダイナミクスと機能 大阪 2014.3.13-14 第7回神経発生討論会 <ポスター></p> <p><u>Kansai Fukumitsu, Kazuto Fujishima, Kure Yu, Azumi Yoshimura, John Heuser, Mineko Kengaku</u> Dynamics and function of mitochondria during dendrite morphogenesis of cerebellar Purkinje cells. Kyoto 2014.2.17-20 The 12th International Student Seminar <ポスター></p> <p><u>Yuu Kure, Kazuto Fujishima, Mineko Kengaku</u> Comparative analyses of the dendrite differentiation in hippocampal pyramidal neurons and dentate granule neurons. Kyoto 2014.2.17-20 The 12th International Student Seminar <ポスター></p> <p><u>Kelly Kawabata, Kazuto Fujishima, Mineko Kengaku</u> The role of Mtss1 in Dendritic Arborization. 台北 台湾 2013.12.19-21 第12回京都大学・国立台湾大学ミニシンポジウム "The 12th Mini Symposium of Kyoto University (KU) and National Taiwan University (NTU) <ポスター></p> <p><u>中島輝恵、梅嶋宏樹、見学美根子</u> 小脳顆粒細胞前駆細胞の分裂様と運命決定の生細胞イメージング解析 神戸 2013.12.3-6 第36回日本分子生物学会年会 <ポスター></p> <p><u>You Wu, Kazuto Fujishima, Mineko Kengaku</u> The dendrite formation of pyramidal neurons and granule neurons in hippocampus. 京都 2013.5.3 第11回京都大学・国立台湾大学合同「分子細胞生物学シンポジウム」"The 11th Symposium on Molecular and Cell Biology" Kyoto University (KU) and National Taiwan University (NTU) International Exchange Activity on Long-Distance Course <ポスター></p> <p><u>Kansai Fukumitsu, Kazuto Fujishima, Mineko Kengaku</u> Dynamics and function of mitochondria during dendrite morphogenesis of cerebellar Purkinje cells. Kyoto, Japan 2013.3.18-19 iCeMS International Symposium "Cell-Material Integration and Biomaterials Science" <Poster></p> <p><u>福光甘齋、藤島和人、見学美根子</u> Dynamics and function of mitochondria during dendrite morphogenesis of cerebellar Purkinje cells. 和光 2013.3.14-15 第6回神経発生討論会 <口頭></p> <p><u>Kansai Fukumitsu, Kazuto Fujishima, Mineko Kengaku</u> Dynamics and function of mitochondria during dendrite morphogenesis of cerebellar Purkinje cells. Kyoto, Japan 2013.3.4-9 The 11th International Student Seminar <Poster></p> <p><u>福光甘齋、藤島和人、見学美根子</u> プルキンエ細胞樹状突起発生過程におけるミトコンドリアのダイ</p>

	<p>ナミクスと機能の解析 仙台 2012.7.24-27 2012 年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ <Poster></p> <p><u>見学美根子</u> 『小脳・皮質における細胞形態分化の分・機構とダイナミクス』 第2回神経科学と構造・生物学の融合 愛知県岡崎市 平成23年11月21日-22日 大阪大学蛋白質研究所セミナー. 包括脳ネットワーク研究会</p> <p><u>福光甘齋、藤島和人、見学美根子</u> 『小脳プルキンエ細胞樹状突起発生過程におけるミトコンドリアのダイナミクスと機能』 第34回日本神経科学大会 神奈川県横浜市 平成23年9月14日-17日 日本神経科学学会</p> <p><u>藤島和人、堀江亮太、福光甘齋、望月敦史、見学美根子</u> 『プルキンエ細胞樹状突起空間パターンの決定機構の解析』 第44回日本発生生物学会年会 沖縄県宜野湾市 平成23年5月18日-21日 日本発生生物学会</p> <p><u>見学美根子</u> イメージングによるプルキンエ細胞樹状突起空間パターンの決定機構の解析 第88回日本生理学会大会 (誌上開催) 2011年3月28日-30日 日本生理学会主催</p> <p>一般向け 計2件 <u>見学美根子</u> 「哺乳類ニューロン樹状突起の成長を支えるオルガネラ輸送」 京都 2012/07/11-12 第14回生命科学研究所シンポジウム</p> <p><u>見学美根子</u> 「ニューロン突起パターン形成のダイナミクスと原理に迫る」 京都 2011/07/07-08 第13回生命科学研究所シンポジウム(新規報告)</p>
<p>図書 計2件</p>	<p><u>藤島和人、見学美根子</u> 樹状突起極性形成に関する最近の知見 2012 生体の科学 特集 細胞極性の制御 Vol.63 No.3,163-170 医学書院</p> <p><u>見学美根子</u>、ブレインサイエンス・レビュー2012、(財)ブレインサイエンス振興財団 2012 『数理解析による樹状突起分岐ダイナミクスとパターン形成原理の解明』 P25-40、ISBN: 978-4878051210</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>京都大学見学研究室 http://www.kengaku.icems.kyoto-u.ac.jp/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>金欄千里高等学校課外授業「生物を研究するって? : 大学にいる研究者のしごと」にて講義 2013年10月16日 京都大学総合研究1号館 119号、物質-細胞統合システム拠点研究棟、生徒20名、教員2名</p> <p>第28回国際生物学賞プレスリリース資料作成および天皇皇后両陛下への御進講 2012年11月22日 授賞決定の報道発表資料の執筆および皇居にて天皇皇后両陛下へ授賞者の研究内容のご説明と質疑応答を行った。(新規報告)</p> <p>第14回生命科学研究所シンポジウム 2012年7月11日-12日 京都大学芝蘭会館稲盛ホール 生命科学分野における最先端科学に興味のある方対象、参加者のべ 475名、京都大学大学院生命科学研究所に所属する28分野から合計34名の教職員、研究員が最新の研究成果及び新しいアプローチを伴う斬新な研究発表を行い、その中で最先端・次世代研究開発支援プログラム「臨界期</p>

様式21

	<p>可塑性によるニューロン樹状突起形態変化と神経回路再編成の機構」の研究内容の発表を行った。</p> <p>京都大学女性研究者支援センター「女子高生・車座フォーラム 2011」京都大学を知ろう・研究者と語ろう 2011年11月6日 京都大学百周年時計台記念館・国際交流ホール他 京都大学受験を目指す女子高校生対象、参加者80名</p> <p>第13回生命科学研究所シンポジウム 2011年7月7日-8日 京都大学芝蘭会館稲盛ホール 生命科学分野における最先端科学に興味のある方対象、参加者のべ491名、京都大学大学院生命科学研究所に所属する31分野から合計39名の教職員、研究員が最新の研究成果について発表を行い、その中で最先端・次世代研究開発支援プログラム「臨界期可塑性によるニューロン樹状突起形態変化と神経回路再編成の機構」の研究内容の発表を行った。(新規報告)</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計1件</p>	<p>公益財団法人テルモ科学技術振興財団 中高生と“いのちの不思議”を考える 生命科学 DOKIDOKI 研究室 この人に聞く「生命に関わる仕事っておもしろいですか？」 第27回生物の形の美しさに魅了されて、ニューロンの研究に夢中 http://www.terumozaidan.or.jp/labo/interview/27/index.html</p>
<p>その他</p>	

7. その他特記事項