

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09039

研究課題名(和文)ASIC1aのロコモティブシンドロームの治療における分子生物学的アプローチ

研究課題名(英文)Molecular biological approaches in the treatment of ASIC1a locomotive syndrome.

研究代表者

佐久間 英輔 (Sakuma, Eisuke)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：90295585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Wistarラット：雄：胎生15日、出生後0～14日齢、28日齢、2歳齢を用いてASIC1a 2a (original probe; 13ZZ probe named Rn-Asic2-01 1899-2506 of NM_001034014.1)を用いてmRNAの局在を確かめた。小脳形成期における顆粒細胞の小脳皮質外層から内層への移動に一致した状態でその発現が移動していくのが確認できた。その事から、ASIC2aは出生後の小脳神経回路の構築の際に細胞移動が生じる場合にシナプスでの神経伝達の増強に関与しており、ASIC1aは常にシナプスでの神経伝達の基本になって維持されている事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASIC2aに関しては、胎生15日から出生後5日までは小脳全体が染まりその濃度が徐々に濃くなっていった。出生後6日から7日にかけてはプルキンエ細胞に集中して局在が認められるが、出生後8日にはプルキンエ細胞は全く染色されなくなった。出生後10日からはバスケット細胞と深部の顆粒細胞のみに集中して染色が認められようになり、これは2歳齢の場合も同じであった。本研究は、発育期における運動の記憶や学習を担う小脳神経回路の構築の際のASICの重要性を確認し、運動学習のメカニズムの分子生物学的解明に貢献するものであると同時に老化のメカニズムを解明するのに寄与する研究だと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to test the hypothesis that ASIC2a mRNA expression might correlate to the morphological development of the cerebellum. To that end, we examined the development of cerebellar cortex in the rats from embryonal day 15 to 14 day-old after birth compared with 28-day and 2-years old rats' cerebellums focusing on the ASIC2a mRNA expression by using in situ detection of ASIC2a mRNA transcription using the RNA scope detection kit. We observed that ASIC2a expression migrates in a manner consistent with the migration of granule cells from the outer to the inner layers of the cerebellar cortex during cerebellogenesis. This suggests that ASIC2a is involved in enhancing synaptic neurotransmission when cell migration occurs during postnatal cerebellar circuit construction, and that ASIC1a is always maintained as the basis of synaptic neurotransmission.

研究分野：整形外科

キーワード：小脳 生後発達 酸感受性イオンチャンネル 細胞移動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的に社会の高齢化は大きな問題となっており、高齢者が機能障害から要介護に至るのを予防するためには、ロコモティブシンドロームの進行を抑制する管理が重要である。ロコモティブシンドロームは、2007年に日本整形外科学会が提案した概念で、運動器の障害によって移動機能の低下をきたした状態と定義されている。現在その予備軍も含め 4,700 万人以上が相当すると推定されている。ロコモティブシンドロームは、運動器を構成する骨、軟骨、筋肉等の各組織が、加齢とともに量的、質的に減少するうちに、軟骨であれば変形性関節症等筋であれば筋肉の減少（サルコペニア）という基礎疾患が潜在するようになり、それらが何らかのきっかけで膝痛や腰痛骨折などの症状を出して発症して進行するという経過を辿る。

ロコモティブシンドロームは認知症が同時に発症すると、それぞれが負の連鎖により、自立した生活を送れる「健康寿命」を短くすることが知られている。つまり、動けない期間が長くなると、考えることをしなくなり、認知症になってしまい、さらには認知症になると、転倒率は健常者の5倍というデータがあり、認知症は「健康寿命」の悪化因子と言える。

今回、我々は ASIC1a のノックアウトマウスの雌に上下肢の筋力の低下と易疲労性（サルコペニア）、脳内の側坐核（Nucleus accumbens）と海馬（hippocampus）を中心にしたミクログリアの増加（認知症）を見出した。過去に発表された論文では、ASIC1a のノックアウトマウスには、サルコペニアについては、上肢の筋力低下について報告が見られるが（Am J Physiol Cell Physiol 306: C396-C406, 2014）、下肢についての発表はない。脳内では、学習能力の低下（Neuron. 2002 34:463-77.）と側坐核のシナプスの形態変化の報告（Nat Neurosci. 2014 17:1083-91.）があるが、ミクログリアに関する報告はない。

ASIC1a がサルコペニア・認知症の原因として証明されれば、近年社会問題となっているロコモティブシンドロームの発生機構と、健康寿命を阻害する不の連鎖の原因となる認知症の解明に、大きな発展が期待されると考え研究に着手し始めた。

2. 研究の目的

酸感受性イオンチャンネル; Acid-sensing ion channel (ASIC) は次世代型鎮痛剤の作用の受容体等として世界的に注目を集めている。脳や脊髄には、ASIC1a と ASIC2a のサブタイプが発現し、シナプス小胞から放出された水素イオンを受容し神経伝達を増強すると考えられている。我々は、ロコモティブシンドローム・サルコペニアとともに所謂フレイルの状態に強く関与していると考えられる小脳機能についての研究も並行して行ってきた。そこで、平衡感覚に強く関与している場所として、ASIC のラット小脳内における生後発現について実験した。本研究の目的は、発育期における運動の記憶や学習を担う小脳神経回路の構築の際の ASIC の重要性を確認し、運動学習のメカニズムの分子生物学的解明に貢献するものである。

3. 研究の方法

Wistar ラット：雄：胎生 15 日、出生後 0~14 日齢、28 日齢、2 歳齢の各々 10 匹づつの全脳を麻酔下に摘出、リン酸緩衝 4% フォルムアルデヒド水溶液に入れて振とう浸漬固定、パラフィン包埋、6 ミクロン厚に切片作成。RNA scope (Advanced Cell Diagnostics) を用いて ASIC1a (commercial probe), 2a (original probe; 13ZZ probe named Rn-Asic2-O1 targeting 1899-2506 of NM_001034014.1, which detects NM_001034014.1 only) の各々を用いて Dab Stain In Situ Hybridization 法を用いて mRNA の局在を確かめた。

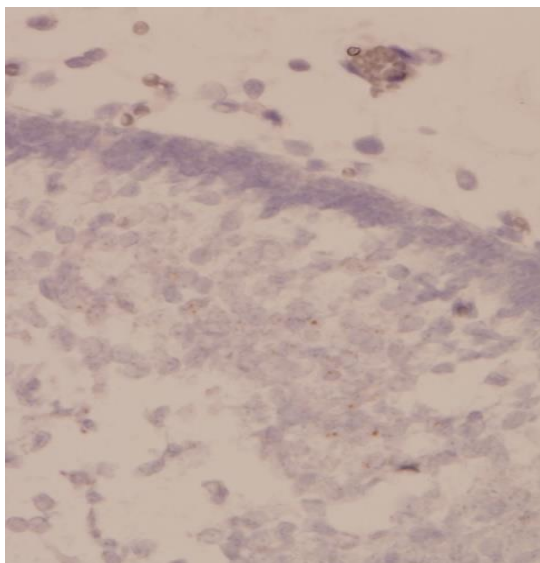
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

4. 研究成果

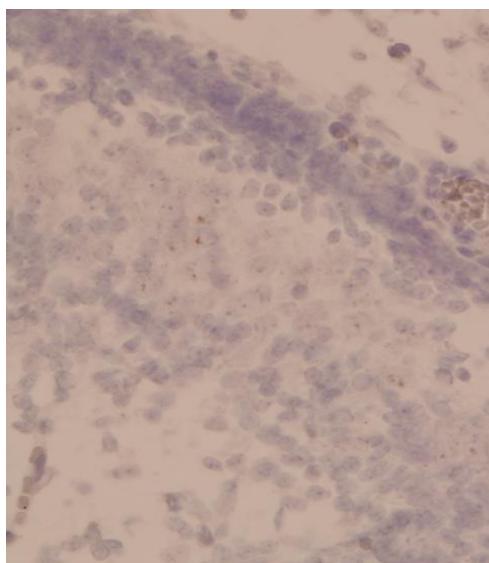
ASIC1a に関しては、全部の日齢を通して小脳全体に局在が認められた。一方、ASIC2a に関しては、胎生 15 日から出生後 5 日までは小脳全体が染まりその濃度が徐々に濃くなっていた。出生後 6 日から 7 日にかけてはプルキンエ細胞に集中して局在が認められるが、出生後 8 日にはプルキンエ細胞は全く染色されなくなった。出生後 10 日からはバスケット細胞と深部の顆粒細胞のみに集中して染色が認められるようになり、これは 2 歳齢の場合も同じであった。考察および結論としては、ASIC2a の発現は、小脳形成期における顆粒細胞の小脳皮質外層から内層への移動に一致した状態でその発現が移動していくのが確認できた。ASIC1a は全日齢を通して小脳全体に発現していた。その事から、ASIC2a は出生後の小脳神経回路の構築の際に細胞移動が生じる場合にシナプスでの神経伝達の増強に関与しており、ASIC1a は常にシナプスでの神経伝達の基本になって維持されている事が示唆された。



ラット：出生後 0 日
ホルマウント標本

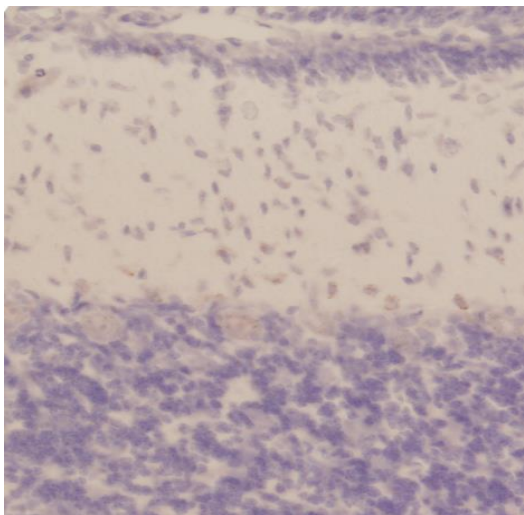


ASIC1a:ラット：出生後 0 日

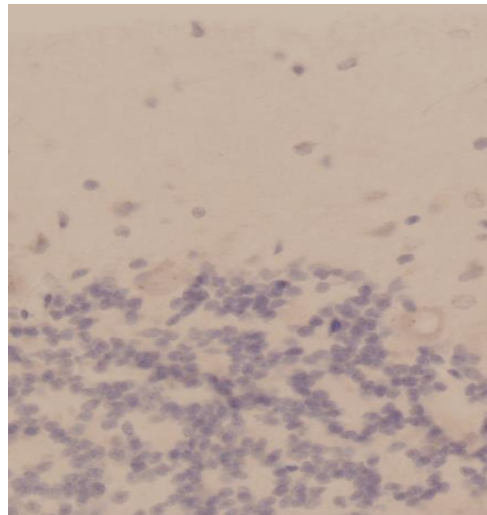


ASIC1a:ラット：出生後 3 日

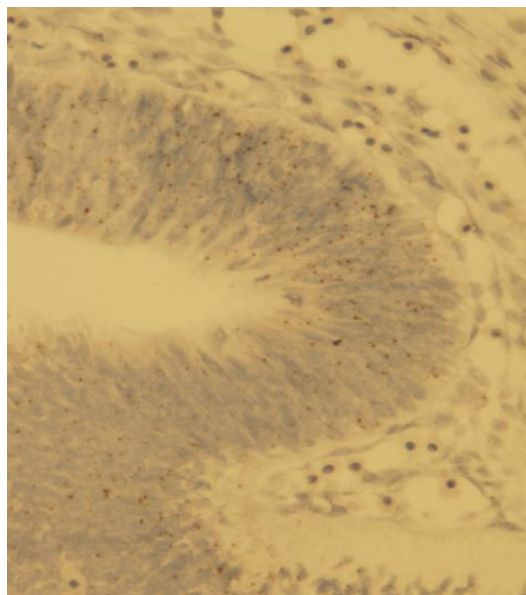
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)



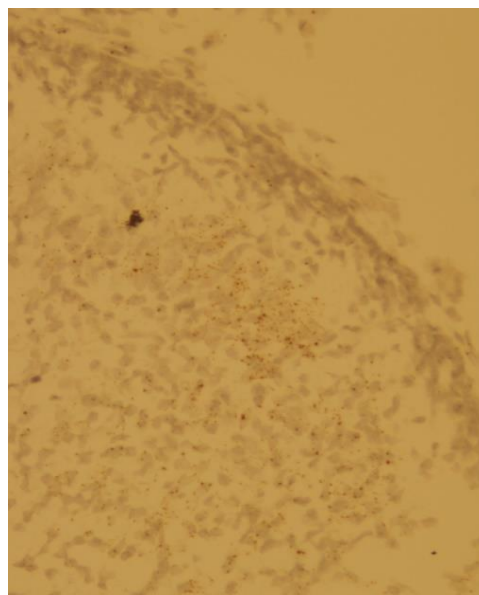
ASIC1a:ラット：出生後14日



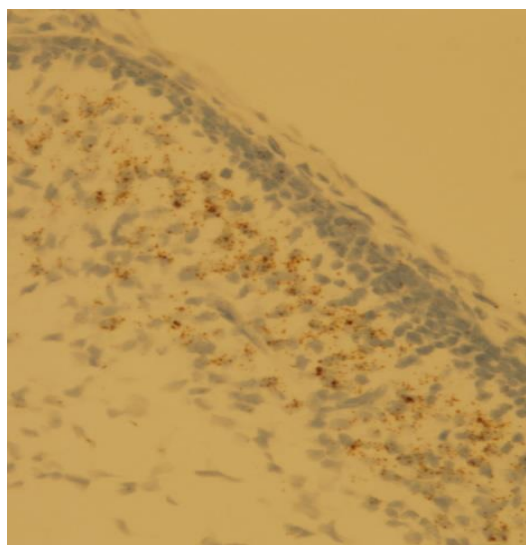
ASIC1a:ラット：出生後2年



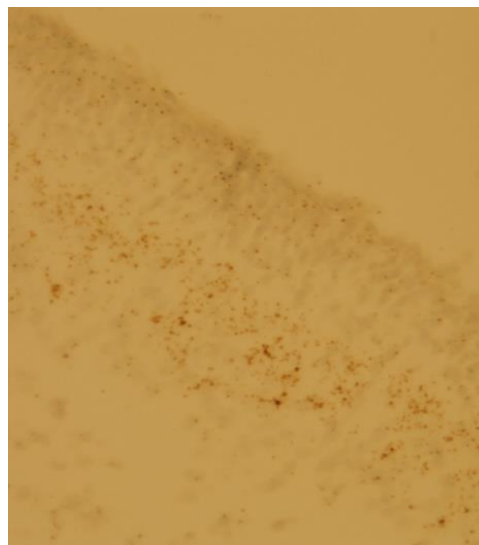
ASIC2a:ラット：胎生15日



ASIC2a:ラット：出生後0日

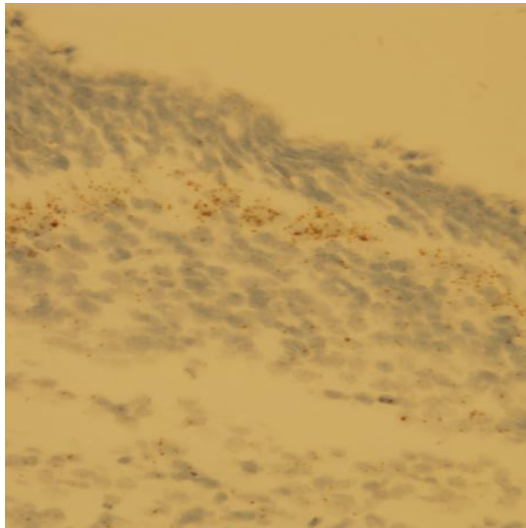


ASIC2a:ラット：出生後2日

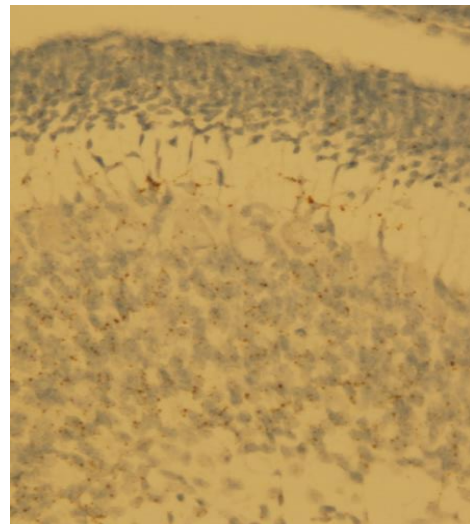


ASIC2a:ラット：出生後4日

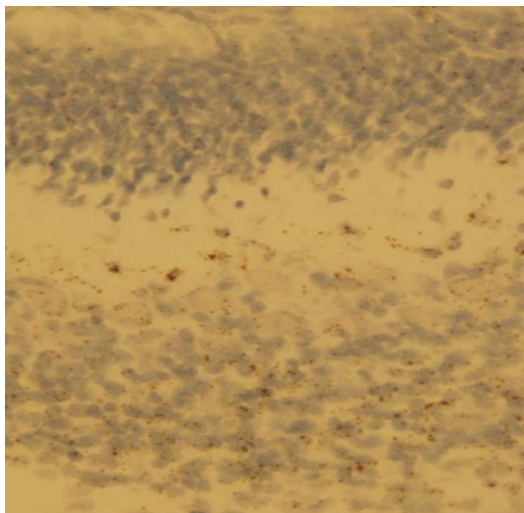
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)



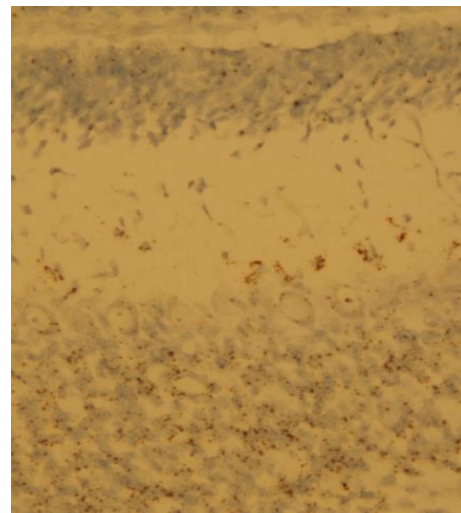
ASIC2a:ラット：出生後 6 日



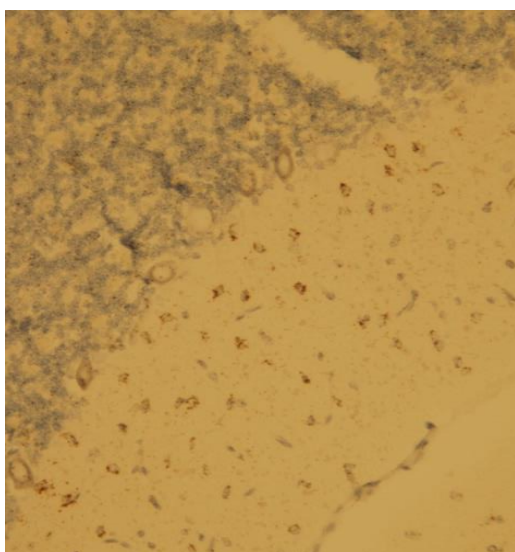
ASIC2a:ラット：出生後 8 日



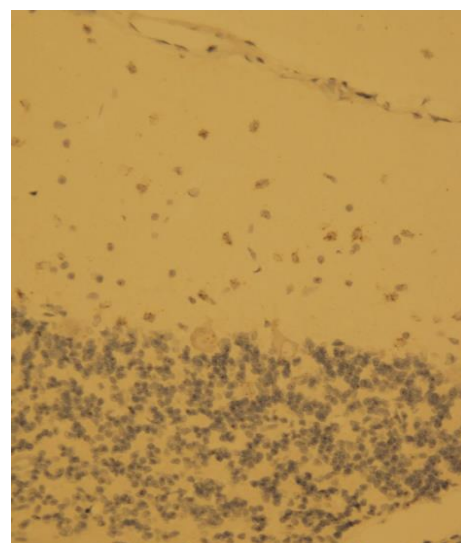
ASIC2a:ラット：出生後 10 日



ASIC2a:ラット：出生後 12 日



ASIC2a:ラット：出生後 28 日



ASIC2a:ラット：出生後 2 年

以上の結果については、第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会と第 5 回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会にて発表した。さらに、協同研究した SGK1 のミクログリアおよびシュワン細胞での発現の特徴と Asic2a の遺伝子改変ラットにおける小脳変性について Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. と Biochem Biophys Res Commun. に投稿、採択された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Asai H, Inoue K, Sakuma E, Shinohara Y, Ueki T.	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 Potential implication of SGK1-dependent activity change in BV-2 microglial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 115-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Okura A, Inoue K, Sakuma E, Takase H, Ueki T, Mase M.	4. 巻 607
2. 論文標題 SGK1 in Schwann cells is a potential molecular switch involved in axonal and glial regeneration during peripheral nerve injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 158-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.03.123.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata Y, Kumamoto N, Sakuma E, Ishida Y, Ueda T, Shimada S, Ugawa S.	4. 巻 610
2. 論文標題 A gain-of-function mutation in the acid-sensing ion channel 2a induces marked cerebellar maldevelopment in rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 77-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 扇谷昌宏, 井上浩一, 佐久間 英輔, 神庭重信, 植木孝俊, 加藤隆弘
2. 発表標題 急性ストレスによって海馬ミクログリアから産生されるTNF- α はワーキングメモリを 障害する 形態変化を伴わないミクログリアの活性化
3. 学会等名 第125回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間英輔、和田郁雄、若林健二郎、河 命守、福田俊嗣、浅井勇人、植木孝俊、村上英樹
2. 発表標題 酸感受性イオンチャンネル1a、2aのラット小脳形成期における発現様式
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上浩一、森本浩之、佐久間英輔、和田郁雄、植木隆俊
2. 発表標題 ミクログリアの活性に与えるフラクタルカインシグナルの影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子絹恵、和田郁雄、高瀬弘嗣、佐久間英輔、大曾根史織、扇谷昌宏、井上浩一、植木孝俊
2. 発表標題 2歳齡のZucker fatty (fa/fa)、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichiの下垂体前葉濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの透過電顕を用いた検討
3. 学会等名 第80回中部支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間英輔、浅井貴裕
2. 発表標題 酸感受性イオンチャンネル2aの幼弱ラット小脳における発現の推移
3. 学会等名 第5回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	植木 孝俊 (Ueki Takatoshi) (60317328)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	井上 浩一 (Inoue Kouichi) (80345818)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	和田 郁雄 (Wada Ikuo) (70182970)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・名誉教授 (23903)	
研究分担者	若林 健二郎 (Wakabayashi Kenjiro) (20418867)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	河 命守 (Ha Myonsu) (50791141)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	

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