

機関番号：13802
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20500335
 研究課題名 (和文) グリオーマの移動・浸潤時に起こる細胞内イオン変化の可視化とその応用性の検討
 研究課題名 (英文) Visualization of changes in intracellular ions during glioma cell migration
 研究代表者
 熊田 竜郎 (KUMADA TATSURO)
 浜松医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00402339

研究成果の概要 (和文)：

細胞内イオンイメージング法を用いて、グリオーマ細胞の移動時における自発的な細胞内 Ca^{2+} と Cl^- 濃度の変化を可視化してその役割を検討した。グリオーマ細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度の頻度の変化は著しい加速を示す移動細胞の指標と成ったが、移動速度との関連性は無かった。細胞内 Cl^- イオン濃度を FRET 型インディケーターで測定し、細胞内における Cl^- の局在性について検討した。また、細胞内 Cl^- イオン濃度を変化させるとグリオーマ細胞の移動速度を変化させることが分かった。

研究成果の概要 (英文)：

We monitored spontaneous changes in intracellular Ca^{2+} level and Cl^- during glioma cell migration using intracellular ion imaging and examined its roles. Although some cells which show marked acceleration of cell motility especially exhibited high frequency of spontaneous Ca^{2+} oscillation, the frequency of changes in intracellular Ca^{2+} levels was not correlated with the rate of cell movement. We also monitored the spatio-temporal dynamics of $[\text{Cl}^-]_i$ by FRET imaging. Also, changes in intracellular Cl^- levels can modify the cell motility of glioma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目：

キーワード：イメージング、グリオーマ、細胞生理、細胞移動

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマは、脳内を広範に浸潤する性質を持ち、平均余命1年という重篤な疾患である。現在、治療は概ね外科的な切除によるが、その浸潤性から非常に困難である。従って、グリオーマ細胞の移動・浸潤性を抑え、

グリオーマを局所に留めさせることは、新たな治療法開発に向けて、非常に重要な問題である。

これまでに様々な腫瘍細胞の移動や浸潤過程に関わる細胞接着、細胞骨格などの多くの分子が同定され分子メカニズムが明らか

になってきた。しかし、多様な分子がどのように組織立てられて、細胞全体としての多様な動きを作り出すのかについてはよく分かっていなかった。

細胞内のカルシウムシグナリングは二次メッセンジャーとして細胞移動に関与するばかりでなく、細胞の動きを組織立てるシグナルとして注目されてきた (Rakic & Komuro, *J. Neurobiol.*, 1998 など)。研究代表者は、小脳発達時期における未熟な小脳顆粒細胞の動態を長時間タイムラプス観察を行いながら、同時に Ca^{2+} イメージングを行うことで、

(1) 移動している場や個々の細胞の形態変化に伴って変わっていく細胞の移動速度が、その細胞の示す細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動頻度と正に相関すること、(2) 移動神経細胞の基本的な自発的な Ca^{2+} 振動は細胞内在性のプログラムで作られること、(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動に変化を引き起こす薬剤の添加は、細胞の移動速度の変化に影響を及ぼすことができることを見いだした。これらの知見は、細胞内変化 (特に細胞内情報伝達系) の可視化を通して異なる細胞の移動様式の状態の違いを表現できる可能性を提示した。

移動性のグリオーマ細胞において Ca^{2+} 透過性の AMPA 受容体のブロックにより移動が抑えられること (Ishiuchi ら *Nature Med.*, 2002) など Ca^{2+} シグナリングの重要性は示唆されていたが、個々の移動細胞における自発的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動についてはなされていなかった。

一方、細胞の移動時には、細胞容積の変化を伴う形態変化が認められる。一般に細胞容積の変化は細胞内 Cl^- 濃度の変化に伴う浸透圧の調節が重要である。このような細胞容積変化は、1) イオン濃度変化を惹起したり、あるいは、2) 膜にある受容体の分布を変化させたりする、ことも知られている。そこで研究代表者は、細胞容積と関連する細胞内 Cl^- 濃度の変化は、形態変化を示すばかりでなく、移動過程を仲介するシグナルの変化を表す指標となり得る可能性を考えた。興味深いことに Cl^- チャネルの阻害剤がグリオーマ細胞の浸潤に臨床的に効果があることが報告されている (Phase II-III, Sonthener ら) が、細胞内 Cl^- 濃度の変化が実際に細胞の動態に影響を与えるかどうか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内イオンイメージング法を用いてグリオーマ細胞の移動における自発的な細胞内 Ca^{2+} 濃度や細胞内 Cl^- 濃度の変動の役割を検討することを目的とした。

グリオーマ細胞の移動の制御に対して、より特異的な細胞内応答が得られた場合、細胞

内イオンの変化を指標にする新たな治療薬を評価する系への将来的な発展を目指した。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ細胞株にカルシウム感受性蛍光色素を負荷した後、生細胞タイムラプスイメージング装置やレーザー共焦点顕微鏡を用いて、グリオーマ細胞の細胞移動時における動態観察とカルシウムイメージングを行った。

(2) FRET インディケータを用いて細胞内カルシウム濃度や塩素イオン濃度を測定するため、グリオーマ細胞株に Yellow Cameleon や Clomeleon をコードする遺伝子を導入し、タイムラプス FRET イメージングを行った。

(3) タイムラプス観察時に細胞内イオン濃度を変化させる薬剤を投与して、細胞の動態を変化させる薬のスクリーニングを行った。

(4) 細胞移動における Cl^- 輸送の役割を検討するため、NKCC1 の発現を抑制する siRNA をグリオーマ細胞に導入した。

4. 研究成果

(1)、複数種のヒト由来のグリオーマ細胞において長時間タイムラプス観察・ Ca^{2+} イメージングの同時観察を行ったところ、Monopolar あるいは Bipolar な形態を示すグリオーマ細胞が静止状態から移動速度を著しく促進する過程において高頻度に細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動が見られることが分かった。グリオーマ細胞の転移の開始時に特異的なカルシウムシグナリングが関与する可能性が示唆された。一方、移動細胞に限らず分裂細胞などで多様な細胞内カルシウムを示す細胞も観察された。クローン化した細胞を用いてもカルシウム変動の頻度は、細胞ごとに多様性があり、細胞移動速度との明らかな関連性は見いだせなかった。G0 細胞の分化レベルが揃う (分裂のため新たな細胞周期に入らない) 未熟な神経細胞との相違が示唆された。

(2) グリオーマ培養細胞に FRET 型インディケータである Clomeleon 遺伝子を導入後、スペクトラムコンフォーカル顕微鏡を用いて移動グリオーマ細胞を観察した。その結果、細胞内において細胞内塩素イオンレベルに局在性があることを見いだした。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度や細胞内 Cl^- 濃度に変化を起こしうる薬剤を用いてグリオーマ細胞の移動に与える影響を調査した。 Cl^- トラ

ンスポーターNKCC1の阻害剤であるBumetanideを添加すると、有意にグリオーマ細胞の移動速度を促進させることを見出した。Cl⁻の内部変化を乱すこともグリオーマ細胞の移動状態を変化させる要因となりうることが示唆された。

(4) グリオーマ細胞の移動におけるNKCC1の効果の特異性を検討するため、グリオーマ細胞におけるNKCC1の発現抑制実験を行った。ヒトNKCC1遺伝子の転写抑制をするsiRNAを作成し、グリオーマ細胞株に導入後、NKCC1を特異的に認識する新規の抗体で発現レベルを調べたところ、NKCC1の発現レベルの明らかな減少が認められた。siRNA導入株で細胞増殖・細胞死に対する影響は認められなかった。今後、移動動態の変化とNKCC1の局在性の相関性について解明していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Kumada, T., Komuro, Y., Li, Y., Hu, T., Wang, Z., Littner, Y., and Komuro, H. Inhibition of cerebellar granule cell turning by alcohol. *Neuroscience* 170, 1328-1344, 2010, 査読有り

② Saito, H., Tohyama, J., Kumada, T., Egawa, K., Hamada, K., Okada, I., Mizuguchi, T., Osaka, H., Miyata, R., Furukawa, T., Haginoya, K., Hoshino, H., Goto, T., Hachiya, Y., Yamagata, T., Saitoh, S., Nagai, T., Nishiyama, K., Nishimura, A., Miyake, N., Komada, M., Hayashi, K., Hirai, S., Ogata, K., Kato, M., Fukuda, A. and Matsumoto, N. Dominant negative mutations in α -II spectrin cause early onset West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am. J. Human Genet.* 86, 1-11, 2010, 査読有り

③ Hayashi, C., Iino, K., Oki, Y., Matsushita, F., Yamashita, M., Yogo, K., Sasaki, S., Kumada, T. and Nakamura, H. Possible contribution of 2-aminoethoxydiphenyl-borate-sensitive Ca(2+) mobilization to adrenocorticotropin-induced glucocorticoid synthesis in rat adrenocortical cells. *Endocr. J.* 57, 109-117, 2010, 査読有り

④ Kumada, T., Jiang, Y., Kawanami, A., Cameron, D. B. and Komuro, H. Autonomous turning of cerebellar granule cells in vitro by intrinsic programs. *Dev Biol.* 326:237-49, 2009, 査読有り

⑤ Tamada, A*, Kumada, T*, Zhu, Y*, Matsumoto, T., Hatanaka, Y., Muguruma, K., Chen, Z., Tanabe, Y., Torigoe, M., Yamauchi, K., Oyama, H., Nishida, K., and Murakami, F. Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing. *Neural Dev.* 3:29. 2008. (*: equally contributed), 査読有り

⑥ Saito, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Urano, K., Kumada, S., Nishiyama, K., Nishimura, A., Okada, I., Yoshimura, Y., Hirai, S., Kumada, T., Hayasaka, K., Fukuda, A., Ogata, K. and Matsumoto, N. *De novo* mutations in the gene encoding STXB1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 40:782-8. 2008, 査読有り

⑦ Koyama, Y., Matsuzaki, S., Yamada, K., Katayama, T., Sato, K., Kumada, T., Fukuda, A., Matsuda, S., Gomi, F., Tano, Y. and Tohyama, M. Involvement of ER stress via calcium homeostasis disturbance in A-beta accumulation in ARPE19 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49:2376-83. 2008, 査読有り

⑧ Jiang, Y., Kumada, T., Cameron, D. B., Komuro, H. Cerebellar granule cell migration and the effects of alcohol. *Dev. Neurosci.* 30:7-23. 2008, 査読有り

[学会発表] (計13件)

① Fukuda, A., Wang, T., Kumada, T., Morishima, T. and Yanagawa, Y. Roles of paracrine GABA and KCC2 downregulation in a model of focal cortical malformation. 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会. 横浜, 3/28-3/30, 2010.

② Inoue, K., Furukawa, T., Yamada, J., Kumada, T., Wang, T. and Fukuda, A. Potential developmental regulation of neuronal KCC2 activity by taurine. 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖

学会総会・全国学術集会. 横浜, 3/28-3/30, 2010.

③Inoue, K., Furukawa, T., Kumada, T., Yamada, J., Wang, T. and Fukuda, A. Intracellular taurine inhibits KCC2 transporter activity. 第33回日本神経科学大会, 神戸, 9/2-4, 2010.

④Fukuda, A., Morishima, T., Kumada, T., Takayama, C. and Yoshida, S. Proliferation of cerebellar granule cell precursors is promoted by GABA released from Bergmann glial cells. 第33回日本神経科学大会, 神戸, 9/2-4, 2010.

⑤熊田竜郎, 福田敦夫: グリオブラストーマ細胞の移動時で見られる特徴的な様式におけるクロライド輸送の役割. 第32回日本神経科学大会, 名古屋, 9/16-18, 2009.

⑥内田 琢, 森島寿貴, 古川智範, 沖 隆, 熊田竜郎, 柳川右千夫, 福田敦夫: 胎仔大脳皮質抑制性神経細胞の細胞新生が母体ストレスによって抑制される. 第32回日本神経科学大会, 名古屋, 9/16-18, 2009.

⑦森島寿貴, 熊田竜郎, 高山千利, 吉田祥子, 福田敦夫: GABAが小脳皮質形成期の外顆粒細胞層で一時的にバークマンングリアから放出され顆粒細胞前駆体の増殖に関与している. 第32回日本神経科学大会, 名古屋, 9/16-18, 2009.

⑧内田 琢, 森島寿貴, 古川智範, 沖 隆, 江川 潔, 熊田竜郎, 柳川右千夫, 福田敦夫: 母体ストレスが及ぼすマウス胎仔大脳皮質形成の異常. 第36回日本脳科学大会, 金沢, 6/12-13, 2009.

⑨王 天英, 熊田竜郎, 森島寿貴, 福田敦夫: 皮質凍結損傷で誘発したマウス微小脳回の形成期におけるGABA作動性ニューロンの集積. 第55回中部日本生理学会, 長久手, 10/17-18, 2008.

⑩王 天英, 熊田竜郎, 岡部明仁, 森島寿貴, 福田敦夫: マウスの多小脳回モデルである凍結損傷で誘発した微小脳回における異常な皮質形成. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7/9-11, 2008.

⑪森島寿貴, 熊田竜郎, 古川智範, 高山千利, 吉田祥子, 福田敦夫: 小脳皮質形成期の外顆粒細胞層で一時的にGABAが放出される. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7/9-11, 2008.

⑫熊田竜郎, 福田敦夫. グリオーマ細胞の移動時における時空間的な $[Cl^-]_i$ の変化. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7/9-11, 2008.

⑬福田敦夫, 魏 兵, 古川智範, 熊田竜郎, 佐藤康二: 三叉神経痛モデルの三叉神経脊髄路核と神経節におけるKCC2とNKCC1の発現変化. 第31回日本神経科学大会, 東京, 7/9-11, 2008.

[その他]

ホームページ

<http://www2.hama-med.ac.jp/wla/phys1/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊田 竜郎 (KUMADA TATSURO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00402339

(2) 連携研究者

福田 敦夫 (FUKUDA ATSURO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50254272

古川 智範 (FURUKAWA TOMONORI)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60402369

森島 寿貴 (MORISHIMA TOSHITAKA)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60456548

(3) 研究協力者

井上 浩一 (INOUE KOICHI)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 80345818