

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月22日現在

中枢神経系ネットワークのカルシウム制御と病態生理機構

Pathophysiological calcium signaling
in the central nervous system network



課題番号：25221304

飯野 正光 (IINO MASAMITSU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究の概要

細胞種特異的に Ca^{2+} インジケーターを発現するマウスや小胞体内腔 Ca^{2+} 濃度測定用インジケーターを開発し、生体内 Ca^{2+} 可視化法および細胞内 Ca^{2+} 動態を選択的に操作する方法とともに用いる新たな方法で研究を進めた。これにより、脳傷害に伴うアストロサイトの Ca^{2+} シグナルと神経保護作用の連関など、細胞内 Ca^{2+} シグナルの病態生理機構を明らかにした。

研究分野：医歯薬学

キーワード：シグナル分子、生体分子、脳・神経、薬理学、生理学

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は、多数の神経およびグリア細胞間の複雑なネットワーク機構により、正常から病態に至る様々な機能を果たしている。その中で、 Ca^{2+} シグナルは重要でかつ広範な機能制御に関与するとともに、病態にも深く関与する。先行研究では、脳傷害に伴う細胞応答に Ca^{2+} シグナル機構が密接に関与することを具体的に示す結果を得ている。

2. 研究の目的

本研究ではこの成果を発展させ、シグナル分子イメージング法を効果的に用いながら、病態生理機構を分子レベルから個体レベルまで統合的に明らかにする成果をあげ、治療標的の同定への基盤形成を目的としている。

3. 研究の方法

以下の3テーマについて研究を推進する。

1) NOによる Ca^{2+} 放出機構の病態生理 先行研究で NO シグナルが神経細胞内で Ca^{2+} 放出を惹起する機構 (NO-induced Ca^{2+} release, NICR 機構) を発見した。NICR 機構を選択的に抑制できるノックインマウスを作製し、てんかん発作の過剰な神経活動に伴う NICR と神経細胞死の関係を細胞レベルおよび個体レベルで明らかにする。

2) グリア細胞 Ca^{2+} シグナル機構の病態生理 活性化アストログリオシスの細胞応答の詳細を生体内で明らかにして、脳傷害に対する治療標的を探る。

3) 細胞内小器官 Ca^{2+} 動態の病態生理 小胞体は、 Ca^{2+} ストアとして重要な機能制御に関

与する。小器官用 Ca^{2+} インジケーターを開発し、これを用いて小器官の Ca^{2+} 動態を詳細に解析し、 Ca^{2+} シグナルと神経細胞死との関係を明らかにする。

4. これまでの成果

1) NICR 機構の病態生理 NICR に関与するリアノジン受容体のシステイン残基をアラニンで置換したノックインマウス (C3636A マウス) を用いて以下の解析を実施した。

まず、C3636A マウスでは NICR が選択的に欠失していることを確認した。続いて、カイニン酸てんかんモデルを用い、NICR と神経細胞死の解析を行った。野生型と C3636A マウスにおいて、てんかん発作の強さには差が認められなかったが、発作後の海馬 CA3 領域の神経細胞死が C3636A マウスで著明に低下することが明らかになった。

次に、NICR が神経細胞死を起こすメカニズムを解析した。NO ドナー投与により、野生型細胞では神経細胞形態の変化、ミトコンドリア膜電位の消失、ミトコンドリア断片化など明確な細胞死が観察されたが、C3636A 細胞では観察されなかった。

さらに、てんかん重積後にダントロレンを投与すると、神経細胞死が軽減されることが明らかになった。以上の結果は、てんかん重積に伴う神経細胞死が NICR を介して起こることを支持するとともに、NICR がてんかん発作に伴う神経細胞死の治療標的となることを示している。

2) グリア細胞 Ca²⁺シグナル機構の病態生理
脳傷害時に生じるアストロサイトの Ca²⁺シグナルが、翻訳抑制因子プミリオと細胞間接着因子カドヘリンを介して活性化アストログリオシスと神経細胞保護作用を促進することを明らかにした (PVAS 2013)。

この研究成果を受けて、アストロサイト特異的に Ca²⁺インジケーター (YC-Nano50) を発現する遺伝子改変マウスを作製し、大脳皮質アストロサイトの細胞内局所で生じる Ca²⁺シグナルを高精細に可視化することに成功して、新規 Ca²⁺シグナルを発見した (Cell Rep 2014)。また、活性化アストログリオシスとアストロサイト Ca²⁺シグナルの関係を解析するため、このマウスに脳梗塞モデルを適用し、Ca²⁺シグナルとアストロサイト形態の同時測定にも成功した。

さらに、Ca²⁺シグナルの意義を検証するため、イノシトール三リン酸 (IP₃)-Ca²⁺シグナルを効果的に抑制できる IP₃分解酵素をアストロサイト特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製した。これら遺伝子改変マウスを用いた解析は、多くの時空間情報を得ることが可能であり、脳傷害の新規治療戦略につながる新しい知見を得ることが期待できる。

3) 細胞内小器官 Ca²⁺動態の病態生理

神経変性疾患などの病態の理解には、小胞体を含む細胞内 Ca²⁺動態恒常性の破綻を明らかにすることが重要であるが、技術的問題により不明な点が多く残されている。そこで、新規小胞体内腔型 Ca²⁺インジケーターの開発を行い、G-CEPIA1erを含む高性能インジケーターの開発に成功した (Nat Commun 2014)。これを用い、細胞質、小胞体内腔、およびミトコンドリア内腔の Ca²⁺濃度を同時に色違いで測定することが可能となった。有用なツールとして高く評価され、世界中の多数の研究室からの請求に応じて、これまでに 300 件を超えるプラズミドを配布している。

これを用いて、次に神経細胞の小胞体内腔 Ca²⁺動態の制御機構の解明に取り組んだ。小脳プルキンエ細胞にウイルスベクターを用いて G-CEPIA1er を発現させ、回路構造が保たれている脳スライス標本内において二光子顕微鏡による *in situ* 解析を行った。シナプス入力による Ca²⁺放出後の再充填機構について可視化解析と数理解析を組み合わせる解析したところ、神経細胞においては小胞体が Ca²⁺の細胞内輸送パイプラインとして機能することを明らかにした (J Neurosci 2015)。

現在、G-CEPIA1er を細胞種特異的に発現するトランスジェニックマウスを準備中であり、今後、神経変性疾患と小胞体 Ca²⁺動態との関係解明に注力することで、神経変性疾患研究に格段の発展をもたらすことが期待できる。

4) 関連する研究成果

末梢神経の髄鞘化にシュワン細胞の Ca²⁺シグナルが必須の働きをすることを明らかにした (Cell Rep 2015)。また、大脳皮質におけるシナプス維持機構に神経細胞の Ca²⁺シグナルが関与することを明らかにしており、学会発表を行うとともに論文を準備している。

5. 今後の計画

これまでの研究計画は順調に推移して予想を上回る展開もあることから、研究目的を十分に達成する事ができると考えている。具体的には以下の項目の達成を目指している。

1) NICRとてんかん重積による神経細胞死の関連

2) アストロサイトの生体内Ca²⁺イメージング法を用いた活性化機構解析

3) CEPIAトランスジェニックマウスを用いたグリア細胞機能解析

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Okubo, Y., Suzuki, J., Kanemaru, K., Nakamura, N., Shibata, T. *Iino, M. Visualization of Ca²⁺ filling mechanisms upon synaptic inputs in the endoplasmic reticulum of cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 35, 15837–15846, 2015.
2. Ino, D., Sagara, H., Suzuki, J., Kanemaru, K., Okubo, Y., *Iino, M. Neuronal regulation of Schwann cell mitochondrial Ca²⁺ Signaling during myelination. **Cell Rep.** 12, 1951–1959, 2015
3. Kanemaru, K., Sekiya, H., Xu, M., Satoh, K., Kitajima, N., Yoshida, K., Okubo, Y., Sasaki, T., Moritoh, S., Hasuwa, H., Mimura, M., Horikawa, K., Matsui, K., Nagai, T., *Iino, M., and *Tanaka, K.F. In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca²⁺ indicator. **Cell Rep.** 10, 311–318, 2014.
4. Suzuki, J., Kanemaru, K., Ishii, K., Ohkura, M., Okubo, Y., and *Iino, M. Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. **Nat. Commun.** 5:4153, 2014.
5. Kanemaru, K., Kubota, J., Sekiya, H., Hirose, K., Okubo, Y. and *Iino, M. Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astroglialosis and neuroprotection after brain injury. **Proc Natl Acad Sci USA** 110, 11612–11617, 2013.

ホームページ等

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/>