

令和元年6月5日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221304

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Calcium-dependent regulation and pathophysiology of central nervous system network

研究代表者

飯野 正光 (IINO, Masamitsu)

日本大学・医学部・特任教授

研究者番号：50133939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 183,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内Ca²⁺濃度上昇(Ca²⁺シグナル)の脳における病態生理機構を、イメージング法を効果的に用い、分子から個体レベルまで統合的に解析し、以下の成果を得た。(1)一酸化窒素による神経細胞内Ca²⁺動員が、てんかん重積に伴う神経細胞死に関与し、このCa²⁺動員の分子基盤であるリアノジン受容体が、神経保護のための治療標的となることを明らかにした。(2)神経細胞傷害に伴い、アストロサイト細胞内でCa²⁺動員が起こり神経保護作用を惹起することを明らかにした。(3)小胞体とミトコンドリア内腔のCa²⁺動態を観測するインジケータを作製し、病態生理的Ca²⁺シグナル形成の基盤を解析する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内の神経細胞およびグリア細胞では、細胞内カルシウム濃度上昇が機能制御のスイッチとして働いており、正常な脳機能に必須である。一方、様々な病態において細胞内カルシウム濃度が異常な変化を示すことを、生体内イメージング法などを駆使して解明した。異常なカルシウム濃度変化が神経細胞内で起こると神経細胞傷害を引き起こすことを見出し、このカルシウム濃度変化の原因となる分子機構の一つを特定した。また、病的なカルシウム濃度変化がアストロサイト(グリア細胞の一種)で生じると、細胞の性質が変化し、周囲の神経細胞の保護に働くことも見出した。これらの成果は、神経細胞を病態から保護する治療法の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：We studied the pathophysiological mechanisms of increases in the intracellular Ca²⁺ concentration (Ca²⁺ signals) in the brain at levels between cell and whole body using new imaging methods, and obtained the following results. (1) Nitric oxide induces neuronal Ca²⁺ signals, which are involved in neuronal cell death following status epilepticus. We showed that the ryanodine receptor, which is the molecular basis of the nitric oxide-induced Ca²⁺ signals, can be a therapeutic target to protect neurons from cell death. (2) Upon neuronal injury, astrocytes generate Ca²⁺ signals releasing Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and promote neuroprotection. (3) We generated new indicators to visualize Ca²⁺ concentrations within the endoplasmic reticulum and mitochondria, and established the method to analyze the basis of generation of pathophysiological Ca²⁺ signals.

研究分野：薬理学

キーワード：シグナル分子 生体分子 脳・神経 神経細胞 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

先行する基盤研究(S)では、中枢神経細胞およびグリア細胞内 Ca^{2+} シグナル機構が、脳傷害に伴う細胞応答に密接に関与することを示唆する結果を得ていた。同時に、生体内での Ca^{2+} イメージング法、および細胞内小器官内腔の Ca^{2+} イメージング法の開発を進めていた。このような研究準備状況を基盤とし、脳傷害に関連した Ca^{2+} シグナルの病態生理機構研究においてイメージング法を駆使するなどして、世界をリードする研究を推進することを目指した。

2. 研究の目的

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、細胞内 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。本研究では先行する研究成果を発展させ、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た。具体的には、以下の3テーマについて研究を推進した。(1)一酸化窒素 (NO) による Ca^{2+} 放出機構の病態生理、(2)グリア細胞 Ca^{2+} シグナル機構の病態生理、(3)細胞内小器官 Ca^{2+} 動態の病態生理。

3. 研究の方法

Ca^{2+} シグナルが関与する中枢神経系の病態生理機構について、新たに準備した遺伝子改変マウス、および新開発の細胞内小器官内腔の Ca^{2+} 濃度を測定できるインジケータ群を用い、先端的な蛍光分子イメージング法を活用して、細胞および分子レベルでのメカニズムを明確にするとともに、個体レベルでの解析を行った。研究に用いた遺伝子改変マウス、生体内 Ca^{2+} イメージング法、新規細胞内小器官用 Ca^{2+} インジケータについては、以下の「4. 研究成果」において詳述する。

4. 研究成果

Ca^{2+} シグナル機構と病態の関連を追求し以下の結果を得た。

(1) NO による Ca^{2+} 放出機構 (NICR 機構) の病態生理 先行研究において、NO が小胞体からの Ca^{2+} 放出チャンネルであるリアノジン受容体1型 (RyR1) の特定のシステイン残基 (マウスでは3636位のシステイン, Cys3636) をS-ニトロシル化して活性化し、 Ca^{2+} 放出を起こすことを中枢神経細胞で明らかにしている。このNICR機構の病態生理的意義を明らかにするため、RyR1のCys3636をアラニンで置換したノックインマウス (C3636Aマウス) を作製して解析を行い、以下を明らかにした。① C3636Aマウスの神経細胞ではNICRが欠失していることを確認した。② NICR以外のRyR1機能 (骨格筋興奮収縮連関、 Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出 (CICR) 機構、リアノジン結合) が野生型とC3636Aマウスで差がないことを確認した。③ NOドナーによる神経細胞の形態変化およびミトコンドリアの脱分極と断片化が、C3636Aマウス由来の細胞で著明に低下することを明らかにした。④ カイニン酸てんかんモデル (側頭葉てんかんの代表的動物モデル) を用い、野生型とC3636Aマウスにおいて解析を進め、てんかん発作の強さ

については差が認められないが、発作後の海馬神経細胞死が C3636A マウスで著明に低下することを明らかにした (図1)。⑤ NICR 抑制薬のダントロレンにもてんかん重積に伴う神経細胞死を抑制する作用があることを明らかにした。以上の成果に基づき、NICR 機構を担う RyR1 がてんかんに伴う神経細胞死の治療標的となることを示して論文発表を行なった (発表論文②)。

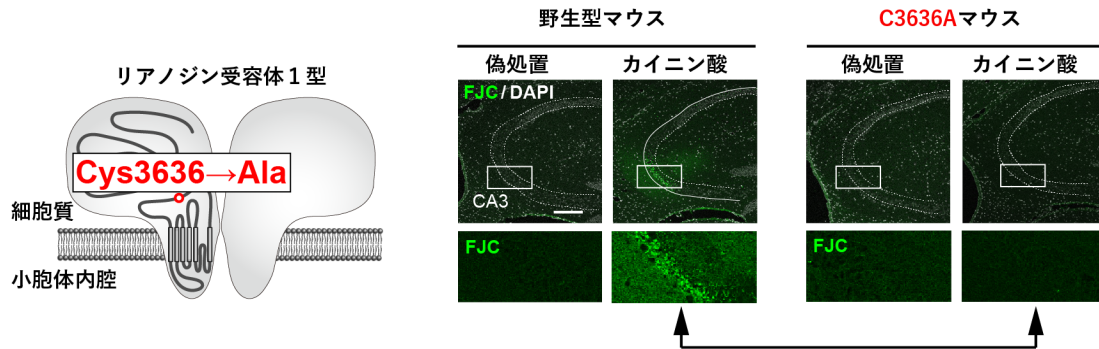


図1 リアノジン受容体の S-ニトロシル化が起きない C3636A ノックインマウスでは NICR が欠失し、カイニン酸てんかんモデルにおける海馬 CA3 領域の神経細胞死が著明に抑制された。

(2) グリア細胞 Ca^{2+} シグナル機構の病態生理 アストロサイトの Ca^{2+} シグナルがアストログリオシスを惹起して神経保護作用を発揮することを明らかにした (発表論文⑦)。さらに、テトラサイクリン発現制御系を用い、アストロサイト特異的にタンパク質型 Ca^{2+} 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、二光子励起顕微鏡法を用いた生体内イメージング法を確立した。これにより、微細突起部分に局在する Ca^{2+} シグナル (Ca^{2+} twinkle) を発見した (図2、発表論文⑤)。

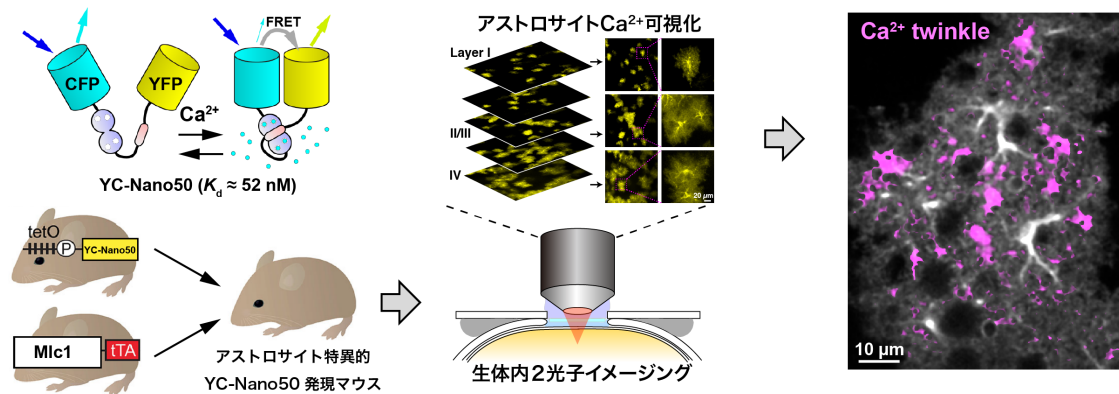


図2 アストロサイト特異的にタンパク質型 Ca^{2+} インジケーターYC-Nano50 を発現する遺伝子改変マウスを作製し、生体内におけるアストロサイトの Ca^{2+} シグナルを高精度で観測する方法を確立した。

このマウスを用いた脳傷害モデルで、 Ca^{2+} シグナルとアストロサイト形態の同時測定に成功した。さらに、 Ca^{2+} シグナルの意義を検証するため、イノシトール三リン酸 (IP_3)- Ca^{2+} シグナルを抑制できる IP_3 分解酵素と Ca^{2+} インジケーターを同時にアストロサイトに発現するマウスを作製し、実際に IP_3 による Ca^{2+} 動員が IP_3 分解酵素発現により抑制されることを確認した。脳傷害前後の生体内アストロサイト Ca^{2+} イメージング解析により、受傷後分単位の経過でアストロサイト機能変動が起こることが示唆された。その分子実態を解明するため、受傷した脳組織からアストロサイトを含む細胞分画を精製してプロテオミクス解析を行った結果、細胞骨格タンパク質やトランスポーターなど数種類のタンパク質が

短時間で量的もしくは質的に変動することを突き止めており、Ca²⁺依存性と機能について詳細解析を進めている。

(3) 細胞内小器官 Ca²⁺動態の病態生理 小胞体およびミトコンドリアなど細胞内小器官内腔の Ca²⁺濃度は、細胞質の Ca²⁺濃度と比較して異なる濃度領域で変化する。そこで細胞内小器官に局在して、局所の濃度変化に適切な Ca²⁺親和性を持ち、小器官内腔の Ca²⁺濃度変化に応答するインジケータ一群 CEPIA シリーズの開発に成功した。これにより、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になった。この方法を用い、小胞体とミトコンドリア内腔の Ca²⁺濃度の連携関係を、細胞内での不均一性を明らかにし、論文発表を行った（発表論文⑥）。CEPIA は、小胞体内腔およびミトコンドリア内腔の Ca²⁺インジケータの *de facto* スタンダードとして世界中の研究室で現在使用されており、これまで950件以上のプラズミド請求に応じている。

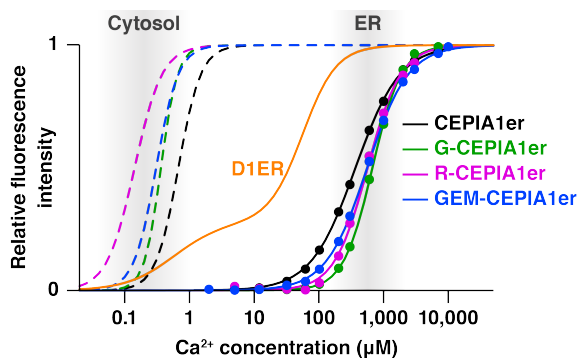


図3 細胞質 Ca²⁺濃度測定用タンパク質型 Ca²⁺インジケータの Ca²⁺感受性を1,000倍以上改変して、小胞体内腔の Ca²⁺濃度変化を測定できる CEPIA を開発した。従来のインジケータとは桁違いの性能であり、色違いの CEPIA も作成したことにより、小胞体内腔 Ca²⁺インジケータとして *de facto* スタンダードとなっている。図には示さないが、ミトコンドリア用の CEPIA も開発した。

CEPIA を用い、小脳プルキンエ細胞の小胞体内腔 Ca²⁺動態を、スライス標本を用いて解析した。平行線維入力に伴い、IP₃ シグナル依存的に、樹状突起およびスパイン内で小胞体内腔 Ca²⁺濃度が減少する様子を可視化し、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て論文発表を行った（発表論文③）。

CEPIA をアストロサイト小胞体に特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。特に小脳バグマンガリアにおいて強い発現がみられ、スライス標本を用いて小胞体からの Ca²⁺放出を高感度に検出できた。光ファイバーを用いた自由行動下生体内測定の前準備を進めている。

シュワン細胞において、神経活動に伴い細胞内 Ca²⁺シグナルが形成されるとともに、ミトコンドリア内腔の Ca²⁺濃度が上昇することを見出し、この一連の Ca²⁺シグナル機構がミエリン形成に関与することを明らかにした（発表論文④）。

アデノ随伴ウイルスを用い CEPIA をアストロサイト小胞体に特異的に発現させ、脳スライス標本を用いてノルアドレナリン刺激に伴う Ca²⁺放出を観察する実験系を確立した。これまでの多数の研究では、2型 IP₃ 受容体欠損マウスでは細胞質 Ca²⁺シグナルが見られないことから、Ca²⁺シグナルの生理的あるいは病態生理的意義を解析するモデルとして多用されてきた。ところが、CEPIA を用いて小胞体内腔とミトコンドリア内腔の Ca²⁺濃度変化を測定したところ、2型 IP₃ 受容体欠損アストロサイトにおいて小胞体からの Ca²⁺放出およびミトコンドリアへの Ca²⁺流入は、野生型マウスのものと比較すると小さいものの、有意に観察されることを突き止めた。このことから、2型 IP₃ 受容体欠損マウスでも小胞体

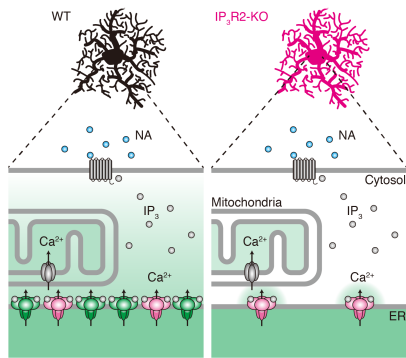


図4 アストロサイトにおいて2型IP₃受容体を欠失していても小胞体近傍にCa²⁺シグナルが残存することが、CEPIAを用いた小胞体およびミトコンドリア内腔のCa²⁺測定により明らかとなった。

近傍のCa²⁺濃度上昇が残存することを明らかにし(図4)、アストロサイトCa²⁺シグナル欠失モデルとしての結果の解釈に留意すべきことを示した(発表論文①)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計19件) (以下、全て査読あり)

- ① Okubo, Y., Kanemaru, K., Suzuki, J., Kobayashi, K., Hirose, K. and Iino, M. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2-independent Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum in astrocytes. **Glia** 67: 113–124, 2019. doi: 10.1002/glia.23531.
- ② Mikami, Y., Kanemaru, K., Okubo, Y., Nakaune, T., Suzuki, J., Shibata, K., Sugiyama, H., Koyama, R., Murayama, T., Ito, A., Yamazawa, T., Ikegaya, Y., Sakurai, T., Saito, N., Kakizawa, S. and Iino, M. Nitric oxide-induced activation of the type 1 ryanodine receptor is critical for epileptic seizure-induced neuronal cell death. **EBioMedicine**. 11, 253–261. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.08.020, 2016.
- ③ Okubo, Y., Suzuki, J., Kanemaru, K., Nakamura, N., Shibata, T. and Iino, M. Visualization of Ca²⁺ filling mechanisms upon synaptic inputs in the endoplasmic reticulum of cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** 35, 15837–15846, 2015. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3487-15.2015.
- ④ Ino, D., Sagara, H., Suzuki, J., Kanemaru, K., Okubo, Y. and Iino, M. Neuronal regulation of Schwann cell mitochondrial Ca²⁺ Signaling during myelination. **Cell Rep.** 12, 1951-1959, 2015. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.039.
- ⑤ 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. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.056. *Co-corresponding authors.
- ⑥ 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. doi: 10.1038/ncomms5153.
- ⑦ Kanemaru, K., Kubota, J., Sekiya, H., Hirose, K., Okubo, Y. and Iino, M. Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110, 11612-11617, 2013. doi: 10.1073/pnas.1300378110.

[学会発表] (計 127 件)

- ① Iino, M. Visualization of astrocytic intracellular calcium mobilization (Invited talk). FASEB Summer Research Conference, Tahoe City, California, USA, 2018.
- ② Iino, M. Calcium Release: The View from Inside the Stores (Invited talk). Gordon Research Conference on Calcium Signalling, Il Ciocco, Italy, 2017.
- ③ Sekiya, H., Takikawa, K., Sato, K., Takagi, M., Kitajima, M., Yamazawa, T., Sakamoto, H., Namiki, S., Kanemaru, K., Tanaka, K.F., Hirose, K., Iino, M. In vivo imaging analysis of astrocytic neuroprotective effects in cerebral infarction. 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎市, 2017.
- ④ Iino, M. Use of CEPIA indicators for the study of intraorganellar Ca²⁺ dynamics (Invited talk). 14th International Meeting of the European Calcium Society. Valladolid, Spain, 2016.
- ⑤ Iino, M. In vivo imaging of glial Ca²⁺ dynamics using an ultrasensitive Ca²⁺ indicator (Invited talk). XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. Bilbao, Spain, 2015.
- ⑥ Iino, M. Calcium regulation of cell functions in the brain: responses of neurons and astrocytes to brain injury (Invited talk). 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. Cape Town, South Africa, 2014.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/pharmacology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：金丸 和典

ローマ字氏名：(KANEMARU, kazunori)

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：10456105

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大久保 洋平

ローマ字氏名：(OKUBO, yohei)

研究協力者氏名：関谷 敬

ローマ字氏名：(SEKIYA, hiroshi)