

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K06997

研究課題名（和文）成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャンネルASIC1aの役割

研究課題名（英文）Involvements of acid-sensing ion channel-1a in adult hippocampal neurogenesis

研究代表者

熊本 奈都子（Kumamoto, Natsuko）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：30467584

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：酸感受性イオンチャンネル1a（acid-sensing ion channel 1a: ASIC1a）は、水素イオンで開く陽イオンチャンネルである。我々は、TagRFP-V5-ASIC1aノックインマウスを免疫組織染色することで、ASIC1a蛋白質が成体脳海馬神経新生初期から発現していることを見いだした。また、ASIC1a発現抑制やASIC1a阻害剤が海馬新生ニューロンの発達を抑制することが明らかになった。これらのことより、正常成体脳において、ASIC1aが海馬神経新生の制御に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞などの虚血性脳血管障害で起こる脳機能障害の治療は、リハビリテーションが主流であり、有効な薬物治療法は確立していない。ASIC1aは、シナプス小胞から開口放出される水素イオンをシナプス後膜において受容することで神経可塑性に関与している。我々は、正常脳において、ASIC1aが海馬の新生ニューロンに発現し、神経新生に関与していることを見出した。虚血脳では局所的な水素イオン濃度の上昇が伴うため、ASIC1aが活性化すると考えられる。本研究で得られた知見により、ASIC1aが神経の再生を促進するための創薬ターゲットになり得る可能性が示唆された。今後、虚血脳におけるASIC1aの作用を調べる必要がある。

研究成果の概要（英文）：ASIC1a (acid-sensing ion channel-1a) is an ion channel activated by extracellular protons. Immunohistochemical analysis of TagRFP-V5-ASIC1a knock-in mice, in which TagRFP-V5 tagged ASIC1a is expressed under the control of the endogenous ASIC1a gene promoter, showed that ASIC1a is expressed in new-born neurons from early stage of adult hippocampal neurogenesis onwards. In addition, ASIC1a knockdown induced defects in dendritic refinement and spine formation. Similar results were found following intracerebroventricular injection of ASIC1a antagonist. The data indicate that ASIC1a could regulate adult hippocampal neurogenesis under normal condition.

研究分野：神経科学

キーワード：成体脳神経新生 ASIC1a

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞などの虚血性脳血管障害に対する治療戦略は、急性期の脳保護療法が主流であるが、近年、成体脳における内在性幹細胞の研究が進み、これを賦活化することで機能回復を目指す、いわゆる「神経再生医療」が注目を集めている。

脳虚血が神経幹細胞の分裂と増殖を促進することは、齧歯類・霊長類などのモデル動物を用いた研究から明らかにされている。ただし、神経幹細胞から新たに誕生した神経細胞 (= 新生ニューロン) が実際に機能するためには、障害を受けた神経回路への正しい組み込みが必要であるが、脳虚血がこのような神経回路の再構築にどのように影響するかは不明である。虚血時には嫌気性解糖が亢進し、病変局所に酸が蓄積することで細胞外 pH の低下を招く。申請者は、このようなアシドーシスが神経新生に何らかの影響を及ぼしていることを想定した。そして、中枢神経系の神経細胞に広く発現し、水素イオンによって活性化される酸感受性イオンチャンネル ASIC1a に着目した。

ASIC1a チャンネルは、虚血の有無にかかわらず、シナプス小胞から神経伝達物質とともに開口放出された水素イオンをシナプス後膜にて受容することで、シナプスの可塑性に関与している。また、虚血により局所の pH がさらに低下すると、ASIC1a の活性も増強される。これらの知見から、新生ニューロンが既存の神経回路へ、あるいは虚血後に残存した神経回路へ組み込まれる際に、ASIC1a が何らかの重要な役割を果たすことは容易に想像できる。そこで、我々は、マウス海馬歯状回の新生ニューロンを対象に幾つかの実験を試み、以下のデータを得た。

1) ASIC1a は、成獣マウス海馬の新生ニューロンに発現する。

2) レトロウイルスによる ASIC1a の発現抑制、ASIC1a ノックアウト (KO) マウスのいずれにおいても、新生ニューロンの樹状突起形成が抑制される。

3) 同様に、発現抑制、KO マウスのいずれにおいても成熟スパインの大きさが縮小する。

これらのデータは、ASIC1a を介したシナプス入力新生ニューロンの成熟に重要であることを示唆している。ASIC1a は中枢神経系に広く分布しているため、ASIC1a を介した海馬神経回路の構築メカニズムを明らかにすることは、他の部位にも存在する神経幹細胞の医療への応用を考える上でも、貴重な知見となるであろう。

2. 研究の目的

新生ニューロンに発現する ASIC1a が、同ニューロンの成熟および既存神経回路への組み込みに必須の分子であることを証明する。さらに、ASIC1a が神経の再生を促進するための創薬ターゲット (神経再生賦活剤開発のための標的分子) になり得るかどうかについて、正常脳を対象に薬理的に明らかにする。治療を念頭においた場合、同ニューロンに発現する ASIC1a の虚血脳における役割も調べるべきであるが、本申請課題では、まず正常脳で解析を行う。具体的には、以下のことを明らかにする。

1) 新生ニューロンと既存の神経回路との間で生じる機能的シナプス結合に、ASIC1a が必須であることを、電気生理学的手法を用いて明らかにする。

2) ASIC1a の選択的阻害剤・活性化剤を正常マウスの脳室内に持続投与し、海馬新生ニューロンの形態学的発達 (樹状突起とスパイン) や、既存の神経回路とのシナプス形成への影響を調べる。

3) 赤色蛍光蛋白質 TagRFP+V5 タグタンパク質と融合した ASIC1a を発現し、さらに、Cre/loxP システムにより ASIC1a のノックアウトもできる、TagRFP-V5-ASIC1a Knock-in/Knock-out (KI/KO) マウスを作出する。このマウスを使い、以下のことを明らかにする。

新生ニューロンでの TagRFP-V5-ASIC1a 蛋白質の発現時期、細胞内局在を調べ、シナプス形成期に、ASIC1a が樹状突起スパイン (シナプス後膜) に存在しているかどうかを明らかにする。

ASIC1a が海馬新生ニューロンの既存神経回路への組み込みに関与するならば、ASIC1a の活性を変化させることで、海馬神経新生が関わる記憶や空間学習能力に影響が出るはずである。そこで、新生ニューロンの ASIC1a をコンディショナルノックアウトし、記憶や空間学習能力を調べることで、組み込みへの関与の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 海馬新生ニューロンのシナプス形成に果たす ASIC1a の役割 (電気生理学的解析)

ASIC1a を発現抑制するとスパインが小さくなることより、既存の神経回路との間で生じる機能的シナプス結合にも変化が生じると考えられる。これを電気生理学的に確認した。

嗅内皮質由来の貫通線維と海馬新生ニューロンとのシナプス結合は誕生 14 日目から 21 日目にかけて急激に増加する。そこで、EGFP と ASIC1a-sh(short hairpin)RNA を Tet-On システムで共発現させるレトロウイルスをマウス海馬に注入した。7 日目よりドキシサイクリンを飲ませて発現誘導し、14、21、28 日目に急性スライス標本を作製した。ASIC1a を発現抑制した EGFP 陽性新生ニューロンにパッチ電極を当て、嗅内野からの貫通線維を刺激し、グルタミン酸作動性の誘発性興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を測定した。興奮する新生ニューロンの割合と惹起される電流の振幅をコントロールと比較し、シナプス形成開始時期とシナプスの成熟度

とを評価した。

2) ASIC1a 阻害剤、活性化剤が海馬神経新生に与える影響(形態学的解析、電気生理学的解析)
ASIC1a が虚血性脳血管障害治療薬開発の標的分子になり得るかどうかを調べるためには、まず、野生型マウスにおいて検討する必要がある。本研究では、新生ニューロンに発現する ASIC1a の活性を薬理的に調節し、新生ニューロンの発達がどう変化するかを調べた。

EGFP 発現用レトロウイルスを海馬歯状回に注入して7日後に、ミニ浸透圧ポンプのカニューレを一側側脳室内に留置し、人工脳脊髄液に溶かした Psalmotoxin (ASIC1a 選択的阻害剤) 1 μM あるいは FMRFamide (活性化剤) 0.5 μM を 0.25 $\mu\text{l/hr}$ で 21 日間持続投与した。新生ニューロン誕生 28 日目(既存の神経回路との間で、ほとんどのシナプスが結合する時期)に、脳切片を作製し、EGFP 陽性新生ニューロンの樹状突起とスパインの形態を共焦点顕微鏡で観察した。これにより、ASIC1a の発現抑制と同様に、ASIC1a 阻害剤が新生ニューロンの発達を抑制するかどうかを調べた。さらに、ASIC1a の活性を増強することで、新生ニューロンの発達が促進されるかどうかを調べた。

3) 蛍光蛋白質融合 ASIC1a ノックイン(KI)マウスを使った ASIC1a 蛋白質発現の時空間的解析

ASIC1a 蛋白質発現の時空間的解析を行うには、抗 ASIC1a 抗体が必要である。我々は抗体の作製を試みたが、良質な抗体は得られていない。そこで、ASIC1a の内在性プロモーターにより、ASIC1a と TagRFP (蛍光蛋白質) V5 タグタンパク質との融合タンパク質を発現する KI マウスを作出した。TagRFP + V5 融合 ASIC1a の培養細胞における局在および電気生理学的特性が野生型 ASIC1a のものと変わらないことは、確認済みである。このマウスに、EGFP を発現するレトロウイルスを注入し、緑色 (EGFP) でラベルされた新生ニューロンにおける TagRFP シグナルあるいは V5 シグナルの局在を、抗 TagRFP 抗体又は抗 V5 抗体をそれぞれ使って免疫組織染色にて観察し、ASIC1a が「いつ」「どこ」で発現しているかを調べた。先行研究によると、成熟ニューロンではスパインに局在することが報告されており、シナプス形成が起こる神経新生後期には、同じ局在を示すと思われる。

4. 研究成果

1) 海馬新生ニューロンのシナプス形成に果たす ASIC1a の役割 (電気生理学的解析)

レトロウイルス注入 14 日目 (= 誕生 14 日目) の新生ニューロンで eEPSC が検出される割合は ASIC1a ノックダウン群のほうがコントロール群 (スクランブル shRNA 発現群) より低く、21 日目、28 日目でも同様の傾向であった。また、惹起される電流の大きさもコントロール群より小さかった。このことより、新生ニューロンに発現する ASIC1a が、既存の神経回路とのシナプス形成とシナプスの成熟に関与することが示唆された。

2) ASIC1a 阻害剤、活性化剤が海馬神経新生に与える影響(形態学的解析、電気生理学的解析)

Psalmotoxin 投与群はコントロール群 (人工脳脊髄液投与群) と比較して、EGFP 陽性新生ニューロンの総樹状突起長が短く、sholl analysis による樹状突起の複雑性の解析でも複雑性が低下していることより、樹状突起の発達が抑制されていることが明らかになった。Psalmotoxin 投与群とコントロール群でスパインの密度には有為な差は認められなかったが、成熟スパイン (mushroom spine) の割合が低下していることより、Psalmotoxin 投与によりスパインの発達も抑制されたと考えられる。これらの結果は、ASIC1a 発現抑制や ASIC1a ノックアウトでの表現形と類似しており、新生ニューロンにおける樹状突起やスパインの発達に ASIC1a の活性が関与する可能性を裏付けるデータである。FMRFamide 投与群については 0.5 μM を 0.25 $\mu\text{l/hr}$ 21 日間投与では樹状突起の形態、スパインの形態ともにコントロール群と有為な差は認められなかったため、薬剤濃度を 1 μl に増やし検討したが、データにばらつきがあり有意差は認められなかった。

3) 蛍光蛋白質融合 ASIC1a ノックイン(KI)マウスを使った ASIC1a 蛋白質発現の時空間的解析

KI ホモマウスの新鮮脳のスライスを蛍光観察したところ、TagRFP による赤色蛍光シグナルは検出できなかった。そこで、抗 TagRFP 抗体と抗 V5 抗体で KI ホモマウスと野生型マウスの脳を免疫組織染色した。抗 TagRFP 抗体ではシグナルに違いは認められなかったが、抗 V5 抗体では KI ホモマウスの海馬で成熟顆粒細胞の細胞質にシグナルが検出された。In vitro の強制発現系では ASIC1a はシナプス後膜に局在することが過去に報告されているため、顆粒細胞のスパインが多く存在する分子層でのシグナルを観察したが、野生型と明らかな違いは認められなかった。チラミドシグナル増感も行ったが、違いは認められなかった。

新生ニューロンの分化過程において、いつから発現しているかを調べるため、各ステージのマーカーと抗 V5 抗体で二重染色、または三重染色を行った。Type 1 細胞 (GFAP + , SOX2 + 細胞) では V5 陽性細胞は認めなかった。Type 2 細胞 (Tbr2+, DCX-細胞) では 5% の割合で V5 シグナルが細胞質に認められた。Type 3 細胞 (Tbr2-, DCX+細胞) では 30% の割合で V5 シグナルが細胞質に認められた。Type 3 細胞に関しては、proximal dendrite の一部にも V5 シグナルが認められた。成熟顆粒細胞 (NeuN+) ではすべての細胞で V5 シグナルが細胞質に認められたが、

proximal dendrite での発現は認められなかった。免疫染色の検出感度では、新生ニューロンの初期 (Type1 細胞) には一部の細胞にのみ V5 シグナル、すなわち ASIC1a 蛋白質の発現が認められたが、イオンチャネルは少量の発現でも作用するため、実際にはより多くの Type1 細胞に ASIC1a が発現することが予想される。そのため、今後、より検出感度の高い Ca イメージング法による酸刺激応答性シグナルやパッチクランプ法を用いた酸刺激応答電流にて、ASIC1a 蛋白質の機能的発現を調べる必要があると考えられる。

ASIC1a は正常脳において新生ニューロンの発達、新規回路形成に関与することが明らかになった。ASIC1a が虚血性脳血管障害治療薬開発の標的分子になり得るかどうかを調べるためには、今後、虚血脳において ASIC1a の活性抑制、または活性化が神経新生に与える影響を調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 日本解剖学会 中部支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本 奈都子、星川 真理子、渡辺 正哉、柴田 泰宏、植田 高史、鶴川 眞也
2. 発表標題 Involvements of acid-sensing ion channel-1a in hippocampal adult neurogenesis
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊本 奈都子
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第26回海馬と高次脳機能学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊本 奈都子、星川 真理子、柴田 泰宏、植田 高史、鶴川 眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生への酸感受性イオンチャネルASIC1aの関与
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本奈都子、星川真理子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第76回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2016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	鶴川 眞也 (Ugawa Shinya) (20326135)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	