

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15914

研究課題名（和文）イオンチャネルによる神経回路形成制御機構：漏洩Na<sup>+</sup>チャネルに着目して

研究課題名（英文）Regulation of neocortical development with leak sodium channels.

研究代表者

阪東 勇輝（Bando, Yuki）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70826809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：神経活動は神経回路形成に重要な役割を果たす。発生期の神経細胞は多様なイオンチャネルを発現し、それらの協調が発生期における神経活動の時空間的パターンを形成し、神経回路形成に寄与すると考えられるが、その詳細は未だ謎である。本研究の目的は、漏洩Na<sup>+</sup>チャネル、NALCNに着目し、NALCNによる活動依存的神経回路形成機構を分子、形態、生理の視点から統合的に解明することである。NALCN shRNAの発現ベクターを作製し、子宮内電気穿孔法を用いて大脳皮質形成におけるNALCNの機能を調べたところ、NALCNのノックダウンにより、細胞移動が障害されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は静止膜電位制御による興奮性制御という視点からこの機構の一端を解明することで、神経回路形成の生理機構研究を進展させるものである。内在性チャネルに着目した神経発生学研究は、重要であるにも拘らず未だ少なく、本研究は神経発生学分野に大きく貢献することが出来る。さらに、一部の精神、神経疾患においてイオンチャネルの突然変異が報告されており、チャネル病と呼ばれている。本研究により、チャネル病発症機構を、神経細胞の情報処理という、これまで活発に研究されてきた視点のみならず、神経発生学的機構という新たな視点からも解明でき、チャネル病治療戦略の発見につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Development of the cerebral cortex depends partly on neural activity, but the identity of the ion channels that might contribute to the activity-dependent cortical development is unknown. NALCN channels are critical determinants of neuronal excitability in the mature cerebral cortex, and it is responsible for a developmental disorder. Here, we have investigated the roles of NALCN in cortical development. Knockdown of NALCN by RNAi using in utero electroporation impaired the migration of late-born cortical excitatory neurons destined to become Layer II/III neurons. Our results suggest that dysfunction of NALCN causes a migration defect in the cortex via an activity-dependent mechanism.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 イオンチャネル NALCN 活動依存性 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

神経活動は神経回路形成に重要な役割を果たすことが知られている (Katz and Shatz, Science, 1996)。発生期の神経細胞は多様なイオンチャネルを発現しており (Pickens Bahrey and Moody, J. Neurophysiol., 2003; Liu et al., J. Neurosci., 2010; Bando et al., Cereb. Cortex, 2014; 2016; Kamijo et al., J. Neurosci., 2018)、それらのチャネル機能の協調が、発生期における神経活動の時空間的パターンを形成し、神経回路形成に寄与すると考えられるが、その詳細は未だ謎である。申請者はこれまでに、電位非依存性で、静止膜電位付近でカリウムイオンを透過して細胞膜を過分極させ、興奮性を下げる漏洩 K<sup>+</sup>チャネル (KCNK2, 9, 10) の機能阻害が神経細胞移動に異常を及ぼす事を発見し、活動依存的な神経回路形成のイオンチャネル機構の一端を報告した (Bando et al., Cereb. Cortex, 2014)。静止膜電位付近で機能する漏洩チャネルは、KCNK ファミリーだけでなく、ナトリウムイオンを透過し、細胞膜を脱分極させ、興奮性を上げる NALCN も存在し、大脳皮質、海馬、小脳、脊髄など、中枢神経系で広く発現している (Lu et al., Cell, 2007)。申請者は、NALCN を介した漏洩ナトリウム電流も、活動依存的神経回路形成に重要であると仮説を立てた。

本研究で着目した NALCN はヒトの精神・神経疾患との関連が知られている。最近 6 年間で、重度の精神遅滞および筋緊張低下を伴う常染色体劣性遺伝病 (CLIFAHDD 症候群、乳児神経軸索性ジストロフィー) の患者において、20 個以上の NALCN の突然変異が報告されている (Al-Sayed et al., Am. J. Hum. Genet., 2013, 他 6 報)。また、患者のゲノム解析により、NALCN 変異は統合失調症や双極性障害と関連することも指摘されており、NALCN の重要性が急速に認識されつつある (Cochet-Bissuel et al., Front. Cell. Neurosci., 2014)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、内在性の漏洩ナトリウムチャネル・NALCN に着目し、静止膜電位の制御機構から活動依存的神経回路形成を理解することである。活動依存的神経回路形成機構は、活動電位の頻度に注目して研究されてきたが、内在性チャネルによる神経活動制御機構に着目した研究は少ない。この点に着目し、活動依存的な神経回路形成機構を分子生物物理学、形態学、生理学といった複合的な視点から解明する。NALCN の機能または発現低下は神経回路形成のどの段階に影響を及ぼすか、NALCN の機能または発現低下は、静止膜電位、膜抵抗といった細胞膜の電気特性をどのように変化させるか、NALCN の機能または発現低下は、神経活動の頻度及び、細胞内カルシウムシグナルのパターンをどのように変化させるかという問題に分けられる。

### 3. 研究の方法

胎生 15 日齢の ICR マウス側脳室に、蛍光膜電位プローブ (ArcLight-MT, ArcLight-ST)、蛍光カルシウムプローブ (jRGECO1a) をコードするプラスミド、TurboRFP をコードするプラスミド及びコントロール shRNA または NALCN shRNA をコードするプラスミドを注入した。次に、マウス胎仔脳に電気パルスを与え、大脳皮質 2/3 層錐体細胞に遺伝子導入を行った。その後、形態学研究のために胎生 17 日齢、生後 3 日齢及び生後 15 日齢に脳を取り出し、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝溶液中で 4 時間、一晩固定した。次に、脳を 30% スクロース・PBS 溶液中で 4 時間、一晩振盪し、クライオスタットを用いて 50 マイクロメートル厚の脳切片を作製した。胎生 17 日齢の脳切片を抗 Sox2 及び抗 Tbr1 抗体を用いて免疫染色を行い、封入した。生後 3 日齢及び 15 日齢の脳切片は染色せず封入した。これらの組織標本を、共焦点顕微鏡を用いて撮影し、細胞体の位

置及び軸索の伸長、投射を解析した。生理学実験のために、生後1か月～2か月齢のマウスにクラニアルウィンドウを作る手術を行い、2光子イメージング法を用いて大脳皮質2/3層錐体細胞から膜電位イメージングまたは膜電位/カルシウム同時イメージングを行った。データは、まずImageJを用いて画像の前処理を行い、その後、ImageJまたはMATLABを用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

膜電位イメージング法の長所の一つは、閾値化のシナプス入力を検出できることである。そこで、ArcLight-MTに点変異を導入し、シナプス入力の検出に特化した蛍光膜電位プローブの開発を行った(新たに開発した変異体をArcLight-STと呼ぶ)。まず、ArcLight-MTと新規蛍光膜電位プローブ、ArcLight-STの膜電位依存性を解析した。結果、ArcLight-STはArcLight-MTと比べ、膜電位依存性がより左にシフトすることが明らかになった。次に、ArcLight-STが閾値下シナプス入力に対してより高い感受性を持つか否か調べるため、-70 mVから、20 mVの大きさの脱分極パルスを与え、蛍光強度の変化を調べた。結果、ArcLight-STは、ArcLight-MTと比べ、閾値下の小さな脱分極に高い感受性を持つことを明らかにした。次に、ArcLight-STを用い、*in vivo*においてシナプス入力を検出できるか否かを検証した。子宮内電気穿孔法を用い、ArcLight-MT及びArcLight-STを大脳皮質2/3層錐体細胞に遺伝子導入を行った。その後、生後35～60日齢において2光子イメージングを行った。イメージングの際、フラッシュライトを用い、10 msの視覚刺激を10秒に1回行った。結果、ArcLight-STは、高感度に視覚入力および自発性シナプス入力を高感度に検出できることが明らかになった。*In vivo* 2光子イメージング法を用いると、単一の細胞体のみならず、樹状突起の微小領域からもシナプス入力を検出できることを明らかにした。1光子ワイドフィールド膜電位イメージング法を用いることで、麻酔下のマウス大脳皮質において、フラッシュライトを用いた視覚刺激に対し、第1次視覚野における局所的な脱分極、第1次及び第2次視覚野全体が同期して脱分極するケース、また第1次視覚野において、局所からシナプス入力広がるトラベリングウェーブが観察された。このように、麻酔下大脳皮質において、同じ感覚刺激に対して多様な視覚応答を示すことを明らかにした。さらに、大脳皮質局所神経回路において、数100  $\mu\text{m}$ 以内の範囲に存在する神経細胞は、シナプス入力を受けるタイミングが同期することを示した。

さらに、膜電位イメージング法とカルシウムイメージング法を組み合わせることで、シナプス入力と活動電位を多数の神経細胞から同時に記録することに成功した(Bando et al., Nat. Commun., 2021)。膜電位/カルシウム同時イメージング法を用い、薬理的てんかんモデルマウスにおいて、てんかん焦点(電位依存性カリウムチャンネルブロッカー・4-AP 注入箇所)から長距離(> 1 mm)離れた場所にてんかん性活動が伝播する際、てんかん焦点で発生した interictal spike に対応したシナプス入力がまず広範囲に伝播し、interictal spike に対応した活動電位が離れた領域に伝播し始めて発作が起こる現象を発見した。このように、ArcLight-ST及び膜電位/カルシウム同時イメージング法の有用性を示した。この技術を神経発生学に応用するために、高速・高解像度多色イメージングシステム及び電気生理学実験システムの立ち上げを行った。

また、NALCN shRNAの発現ベクターを作製し、子宮内電気穿孔法を用いて大脳皮質形成におけるNALCNの機能を調べたところ、NALCNのノックダウンにより、細胞移動が障害されることを明らかにした。これらの成果は、イオンチャンネルによる大脳皮質形成機構の理解をさらに深めるものであり、また、ヒトのチャンネル病の病態解明につながり、基礎科学的にも医学的にも重要なものである。

## 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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Bando Yuki, Ishibashi Masaru, Yamagishi Satoru, Fukuda Atsuo, Sato Kohji	4. 巻 16
2. 論文標題 Orchestration of Ion Channels and Transporters in Neocortical Development and Neurological Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 827284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.827284	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 Bando Yuki, Wenzel Michael, Yuste Rafael	4. 巻 12
2. 論文標題 Simultaneous two-photon imaging of action potentials and subthreshold inputs in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27444-9	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 該当する

1. 著者名 Satoru Yamagishi, Yuki Bando, Kohji Sato	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of Netrins and Their Receptors in Neuronal Migration in the Cerebral Cortex.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 590009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.590009	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石橋賢, 阪東勇輝, 佐藤康二, 福田敦夫
2. 発表標題 発達期皮質錐体細胞におけるCa <sup>2+</sup> 動態とタウリンによるGABAA受容体活性化
3. 学会等名 第67回中部生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋賢, 阪東勇輝, 佐藤康二, 福田敦夫
2. 発表標題 発達期皮質錐体細胞におけるCa <sup>2+</sup> 動態とタウリンによるGABA <sub>A</sub> 受容体活性化
3. 学会等名 第7回国際タウリン研究会(国際学会)
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

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