

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860145

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ネルASIC1aの役割

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

研究代表者

熊本 奈都子 (Kumamoto, Natsuko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30467584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳における神経新生は、脳虚血時に活性化するが、その分子機序は明らかになっていない。

ASIC1aは、水素イオンによって活性化される陽イオンチャネルである。我々は、形態学的解析と生理学的解析により、海馬の新生ニューロンに発現するASIC1aが樹状突起とスパインの形成、さらに既存の神経回路との間のシナプス形成に重要であることを見出した。この結果は、ASIC1aが脳虚血に伴う水素イオン濃度の上昇を感知し、神経新生の制御に深く関わっている可能性を示唆している。海馬神経新生におけるASIC1aの役割が明らかになれば、内在性幹細胞の賦活化による非侵襲的神経再生法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：It is well known that adult neurogenesis is enhanced after ischemic brain injury accompanied with local tissue acidosis. However, the molecular mechanisms mediating such phenomena remain to be elucidated. ASIC1a (acid-sensing ion channel-1a) is an ion channel activated by extracellular protons. Using a combination of morphological and electrophysiological approaches, we found that ASIC1a was required for proper dendritic development and synaptic organization of mouse hippocampal newborn neurons. These results raise the possibility that ASIC1a might regulate adult hippocampal neurogenesis via sensing extracellular acidification during cerebral ischemia. Definitive understandings of roles of ASIC1a in adult neurogenesis will contribute to development of non-invasive nerve repair treatments through activation of endogenous neural stem cells in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：成体脳神経新生 ASIC1a

1. 研究開始当初の背景

成体脳における神経新生は、脳卒中などによる脳損傷時に活性化することが知られており、機能回復に寄与していると考えられているが、その制御機序は不明である。

脳血管障害により嫌気性解糖が亢進し、病変局所に酸が蓄積することはよく知られている(局所的アシドーシス)が、申請者らは、このような水素イオンホメオスターシスの変化が障害脳の神経新生による機能回復に影響を及ぼしている可能性を考えた。そして、水素イオンによって活性化され、中枢神経系の神経細胞に広く発現する酸感受性イオンチャンネル(acid-sensing ion channel; ASIC)に着目した。ASIC1aは中枢神経系で水素イオンセンサーとして働く陽イオンチャンネル分子である。そこで、申請者らはいくつかの実験を試み、ASIC1aがマウス海馬の新生ニューロンに発現し、樹状突起の形成に関与するというデータを得た。この結果は、ASIC1aがアシドーシスに伴う損傷部位での水素イオン濃度の上昇を感知し、神経新生の制御に深く関わっている可能性を示唆している。本研究は、内在性幹細胞の賦活化による非侵襲的神経再生法開発への貢献を目指して、海馬神経新生におけるASIC1aの役割を解明するものである。

2. 研究の目的

本申請において、上記の背景および研究結果をもとに、「ASIC1aが(アシドーシスやシナプス小胞内の水素イオン放出による)細胞外水素イオン濃度の変化を感知し、新生ニューロンの既存神経回路への組み込みを調整する」という仮説を実験的に証明する。そして、局所神経回路再生機構の一端を明らかにし、新たな神経再生治療法確立への基盤を構築する。具体的には、レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いてASIC1aを強制発現あるいはノックダウンした海馬新生ニューロンを対象に、以下のin vivo解析を行った。

(1)ASIC1aが新生ニューロンの樹状突起発達に与える影響をレーザー共焦点画像3D再構築を用いて形態学的に解析した。

(2)ASIC1aが新生ニューロンのスパイン形成に与える影響をレーザー共焦点画像3D再構築を用いて形態学的に解析した。

(3)ASIC1aが新生ニューロンと嗅内皮質からの投射線維とのシナプス形成に与える影響をパッチクランプ法を用いた誘発性興奮性シナプス後電流測定にて解析した。

3. 研究の方法

(1)ASIC1aノックダウンが海馬新生ニューロンの樹状突起発達に及ぼす影響の形態学的解析

ASIC1a-shRNAとEGFPを共発現させるレトロウイルスベクターを用いて、生体内(in vivo)において、マウス海馬新生ニューロンにおけるASIC1aの発現を抑制した。このマウス脳を還流固定後、切片を作製し、レーザー共焦点画像3D再構築法を用いて樹状突起数、総樹状突起長を測定した。

(2)ASIC1aノックダウンが海馬新生ニューロンのスパイン形成に及ぼす影響の形態学的解析

(1)と同様の手法でASIC1aをノックダウンした海馬新生ニューロンのスパイン形態を、レーザー共焦点画像3D再構築法を用いて観察した。

(3)ASIC1aが海馬新生ニューロンのシナプス形成に及ぼす影響の電気生理学的解析
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(Kumamoto et al, Nat Neurosci 2012)。ASIC1aをノックダ

ウンさせた dTomato (赤色蛍光蛋白質) 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興奮させた際に惹起される、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。アデノ随伴ウイルスを使って光受容体チャネルロドプシンを対象の貫通線維に発現させ、これに光を照射することで刺激を与えた。光刺激にตอบสนองして興奮する新生ニューロン (= 貫通線維からシナプス入力を受ける新生ニューロン) の割合と惹起される電流の大きさをコントロール (dTomato + scramble shRNA) と比較し、シナプス結合とシナプスの成熟度を評価した。

4. 研究成果

(1) ASIC1a ノックダウンが海馬新生ニューロンの樹状突起発達に及ぼす影響の形態学的解析

細胞あたりの樹状突起の長さの合計を定量したところ、コントロール(scramble-shRNA)と比較して有意に短かった(図1b)。また、sholl analysis による解析を行った結果、樹状突起の複雑性も低下していることがわかった(図1c)。

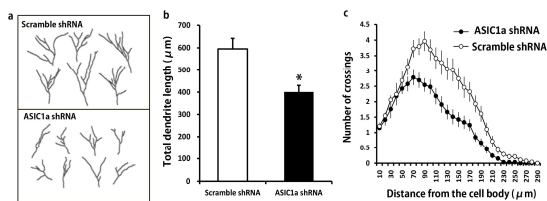


図1 ASIC1a ノックダウンは海馬新生ニューロンの樹状突起の発達を抑制する

(2) ASIC1a ノックダウンが海馬新生ニューロンのスパイン形成に及ぼす影響の形態学的解析

ASIC1a をノックダウンさせてもスパイン密度に変化はなかったが(図2b)成熟したスパイン(mushroom型スパイン)の頭部の最大径はコントロールと比較して有意に減少していた(図2c)。

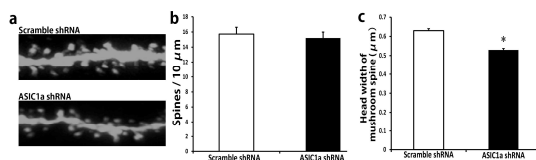


図2 ASIC1a ノックダウンは海馬新生ニューロンのスパインの成熟を抑制する

(3) ASIC1a が海馬新生ニューロンのシナプス形成に及ぼす影響の電気生理学的解析
誕生2日目の新生ニューロンでeEPSCが検出される割合はASIC1a ノックアウト群の方が低く(図3b)、惹起される電流の大きさも小さかった(図3c)。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に作用することが明らかになった。

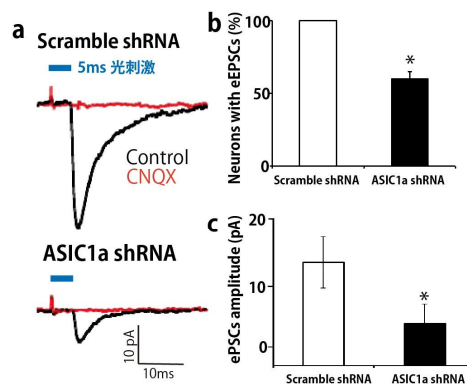


図3 ASIC1a ノックダウンは海馬新生ニューロンの神経回路形成を抑制する

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)

[学会発表](計2件)

熊本奈都子、星川真理子、渡辺正哉、柴田泰宏、植田高史、鷓川眞也
Gene expression analysis of ASIC subtypes in adult-born hippocampal neurons in mice
第120回日本解剖学会総会・全国学術総会
2015年3月21日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

熊本奈都子、星川真理子、柴田泰宏、植田高史、鷓川眞也
Roles of acid-sensing ion channel-1a in hippocampal adult neurogenesis
第58回日本神経化学学会大会
2015年9月11日大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

熊本 奈都子 (Kumamoto, Natsuko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30467584