

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04660

研究課題名(和文) 痛覚神経回路の構築を制御するシグナル伝達系の解明

研究課題名(英文) Molecular signaling pathways regulating the formation of nociceptive neuronal network

研究代表者

上口 裕之 (Kamiguchi, Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：10233933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：痛覚神経軸索が表皮の神経成長因子(NGF)に誘引される過程で、軸索はより高濃度のNGFに応答し続けるため、軸索は応答可能なNGF濃度域を調節する機構を備えているはずである。軸索の誘引応答を担う細胞内分子IP3を受容するタンパク質(IP3受容体タイプ3)が、軸索のNGFへの感受性を制御し、痛覚神経軸索の皮膚投射に重要な役割を担うことを明らかにした。また、神経成長因子が痛覚神経軸索を誘引する過程で、細胞内脂質ホスファチジン酸が膜動態を制御して軸索の方向転換を駆動することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛覚を担う神経細胞の突起(軸索)が皮膚の表面(表皮)へ投射する仕組みを、表皮由来の誘引性分子への感受性制御および軸索細胞内の膜ダイナミクス制御の両面から明らかにした。これらの成果は、神経軸索が細胞外環境の誘引性分子を認識して正しい標的へ到達する仕組みの理解に貢献するとともに、皮膚への神経投射が関与する病態(例えば、痒み)のメカニズム解明および治療法開発に寄与しうる成果である。

研究成果の概要(英文)：During developmental targeting of nociceptive axons toward the skin epidermis, the axon continues to be exposed to increasing concentrations of nerve growth factor (NGF), an attractive cue released from the epidermis. Therefore, the axon should be able to regulate its sensitivity to wide ranges of NGF concentrations. This project has identified the IP3 receptor type 3, an intracellular protein that responds to the axon-attractive molecule IP3, as a critical regulator of axonal sensitivity to NGF and of axonal targeting to the skin epidermis. Furthermore, this project has identified phosphatidic acid, an intracellular lipid molecule that mediates attractive axon guidance in the skin through regulating cellular membrane dynamics in the axon.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索 ガイダンス 表皮 神経成長因子 イノシトール3リン酸 ホスファチジン酸

1. 研究開始当初の背景

脳脊髄の発生過程では、神経細胞から伸長した軸索が正しい標的へ到達して神経回路が構築される。軸索の伸長方向を決定する細胞外因子（軸索ガイダンス分子）とその受容体が同定され、神経回路構築を制御する細胞間シグナル伝達の解明が飛躍的に進んだ。例えば本研究代表者らのグループは、脊髄後索原基のグリア細胞が産生する脂質ホスファチジルグルコシド（PtdGlc）と加水分解後に細胞外へ放出する脂質リゾホスファチジルグルコシド（LysoPtdGlc）を同定し、LysoPtdGlc がグリアから神経細胞へ位置情報を伝える軸索ガイダンス分子として働くことを発見した（*Science* 349: 974-977, 2015）。LysoPtdGlc は痛覚神経細胞の G タンパク質共役受容体 GPR55 を介して軸索先端部（成長円錐）を反発し、脊髄内で痛覚神経軸索を他種の感覚神経軸索から分別して個別の回路を形成することに役立っている。他の研究グループの報告では、神経損傷後に脊髄後角で再構築された異常な痛覚神経回路は神経因性疼痛の原因となることが示唆されていた（*Nat Rev Neurosci* 11: 823-836, 2010）。また痛覚神経の末梢側では、表皮に発現する神経成長因子（NGF）とセマフォリン 3A がそれぞれ痛覚神経軸索を誘引・反発して、表皮への痛覚神経軸索の投射を拮抗的に制御することが知られていた（*Neuron* 19: 519-530, 1997; *Neuron* 25: 345-357, 2000）。この拮抗的なバランスが崩れて痛覚神経軸索の表皮への進入が異常に亢進するとアトピー性皮膚炎を引き起こすことも示唆されていた（*J Invest Dermatol* 128: 2842-2849, 2008）。このように、痛覚神経軸索は皮膚と脊髄を連結する長い細胞突起であるが、その走行経路と投射パターンは緻密に制御される必要があり、末梢側と中枢側で軸索を正しい道筋に沿って誘導する軸索ガイダンス分子が特定されていた。

一方、軸索ガイダンスを制御し駆動する細胞内メカニズムには解明されていない重要な問題点が多い。例えば、LysoPtdGlc は GPR55 を介して痛覚神経軸索の細胞内で G タンパク質 G₁₃ を活性化するとともにカルシウムイオン濃度を上昇させるが、G タンパク質と Ca²⁺シグナルが協調的に成長円錐の反発を誘起するのかわ別個の役割を担うのかわ不明であった。LysoPtdGlc による軸索ガイダンスの細胞内シグナル伝達系が明らかになれば、脊髄内での痛覚神経回路構築の仕組みをより詳細に理解することができる。当該研究者および他グループの研究によりセマフォリン 3A による反発性ガイダンスの仕組みはほぼ解明されたが（*Neuron* 66: 370-377, 2010; *Neuron* 58: 694-707, 2008）、末梢組織で NGF が痛覚神経軸索を誘引する細胞内メカニズムに関しては研究途上であった。また、痛覚神経軸索が表皮の NGF に誘引される過程でより高濃度の NGF に遭遇するようになるが、成長円錐は NGF に対する感受性をどのように制御して異なる濃度域の NGF に応答することができるのか全くの謎であった。さらに、痛覚神経軸索が表皮に発現する NGF とセマフォリン 3A に拮抗的にガイドされる過程で、成長円錐がこれら誘引性と反発性のシグナルをどのように統合して最終的な伸長方向を決定するのかを解明する必要があった。以上、神経回路が構築される過程で軸索の投射を空間的に制御するための細胞内シグナルの研究が立ち後れていた。

2. 研究の目的

本研究代表者らが発見した細胞外生理活性脂質（*Science* 2015）や神経成長因子などは、痛覚神経軸索を正しい方向へ誘導して痛覚神経回路を形成するためのガイダンス分子である。本課題では、脊髄や皮膚における軸索ガイダンスの細胞内メカニズムの解明を目的とし、さらには痛覚神経回路の構築異常に関連する病態のメカニズム解明に貢献することを目指す。軸索先端部（成長円錐）で引き起こされる化学的シグナルおよび物理的な駆動機構を研究し、成長円錐が軸索ガイダンス分子への感受性を調節して正しい方向へ旋回・伸長するための仕組みを明らかにする。さらに、これら軸索ガイダンスシグナルを操作したマウスでの痛覚神経回路を解析し、回路構築のメカニズムを動物個体レベルで解明する。

3. 研究の方法

(1) 神経成長因子による軸索ガイダンスの細胞内分子機構

神経成長因子（NGF）が軸索突起を誘引する過程での新規シグナル伝達機構の解明を目指した研究を行なった。まず初めに、NGF が成長円錐でホスファチジン酸の産生を促進することを、ホスファチジン酸結合蛍光プローブを用いた顕微鏡イメージング実験で確認した。蛍光プローブを発現する成長円錐を全反射蛍光顕微鏡で観察し、微小ガラス管で NGF を成長円錐近傍に投与する前後の蛍光強度の変化を定量した。

次に、NGF 下流でホスファチジン酸の産生を媒介する酵素を特定した。一般的には、ホスホリパーゼ D（PLD）が細胞膜グリセロリン脂質を加水分解してホスファチジン酸を産生するので、各種 PLD アイソフォームのうちリパーゼ活性の強い PLD1 と PLD2 を標的とした薬理的阻害実験あるいは RNA 干渉実験を行い、NGF 下流でホスファチジン酸の産生を媒介する酵素を特定した。該当 PLD を阻害した痛覚神経細胞を培養して、NGF による非対称的エキソサイトーシスおよび誘引性ガイダンスを定量的に評価した。具体的には、pH 感受性蛍光タンパク質を膜小胞内腔側に付加した vesicle-associated membrane protein 2（VAMP2）を発現した成長円錐の片側に NGF を投与し、pH 変化を指標として VAMP2 のエキソサイトーシスの非

対称性を定量した。さらに、NGF 投与後の成長円錐の旋回角度を定量することで、誘引性ガイドランスを評価した。

(2) 成長円錐が応答可能な NGF 濃度域を調節する仕組み

痛覚神経軸索が表皮の NGF に誘引される過程で、成長円錐はより高濃度の NGF に応答し続ける必要があるため、成長円錐は応答可能な NGF 濃度域を調節する機構を備えているはずである。本研究代表者らが行った予備実験では、イノシトール3リン酸 (IP3) 受容体タイプ3が軸索の NGF への感受性を抑制する役割を担うことが示唆されていた。そこで、野生型と IP3 受容体タイプ3ノックアウトマウスを用いて、痛覚神経細胞の成長円錐の片側に各種濃度の NGF を投与し、その結果引き起こされる下流シグナル伝達 (IP3 濃度上昇 小胞体からのカルシウムイオン放出) の非対称性および成長円錐旋回角度を定量した。

次に、野生型と IP3 受容体タイプ3ノックアウトマウスを用いて、NGF を高発現する表皮へ進入する痛覚神経軸索の形態と長さを比較定量した。表皮は抗 NGF 抗体を用い、痛覚神経軸索は抗 TrkA 抗体を用いた間接免疫蛍光染色により標識した。さらに、RNA 干渉法により表皮での NGF 発現レベルを抑制し、これによる痛覚神経軸索投射の変化を定量的に解析することにより、IP3 受容体タイプ3を介した NGF への感受性制御が痛覚神経の表皮への投射を最適化しているか否かを検証した。

4. 研究成果

(1) 神経成長因子による軸索ガイダンスの細胞内分子機構

神経成長因子 (NGF) が痛覚神経軸索を誘引する過程で、成長円錐でのホスファチジン酸の役割を明らかにした。ホスファチジン酸結合蛍光プローブを遺伝子導入した神経細胞を培養し、成長円錐の片側から NGF の濃度勾配を作成し、成長円錐形質膜で生成されるホスファチジン酸を全反射蛍光顕微鏡で定量したところ、NGF 投与側でホスファチジン酸の増加が検出された。次に、NGF 下流でホスファチジン酸産生を触媒する酵素を同定した。ホスホリパーゼ D (PLD) アイソフォーム特異的阻害剤の存在下で NGF への応答性 (成長円錐の旋回角度) を定量したところ、PLD2 ではなく PLD1 がホスファチジン酸産生を担うことが示された。さらに、PLD1 発現を RNA 干渉法で抑制した成長円錐は NGF に旋回応答性を示さなかった。PLD1 の薬理的および遺伝学的阻害は、いずれも NGF によるホスファチジン酸産生を抑制した。以上の結果から、NGF は PLD1 を介して非対称ホスファチジン酸シグナルを生成し成長円錐を誘引することが示された。

NGF は、成長円錐での VAMP2 依存的エキソサイトーシスを非対称化することで軸索突起を誘引することが知られている。このエキソサイトーシス非対称化に PLD1 が関与するか否かを検証するため、PLD1 阻害剤存在下で NGF によるエキソサイトーシス制御を解析した。成長円錐に発現させた pH 感受性蛍光タンパク質付加 VAMP2 の蛍光強度を定量することでエキソサイトーシスを可視化したところ、PLD1 阻害剤は NGF によるエキソサイトーシスの非対称化を阻害した。よって、NGF PLD1 ホスファチジン酸 VAMP2 依存的エキソサイトーシス 誘引生ガイドランスというカスケードが証明された。

(2) 成長円錐が応答可能な NGF 濃度域を調節する仕組み

表皮が産生する NGF は痛覚神経軸索を誘引して、皮膚での痛覚受容のための神経ネットワークの構築に関与する。この誘引の過程で、成長円錐はより高濃度の NGF に応答し続ける必要があるため、成長円錐は応答可能な NGF 濃度域を調節しなければならないが、IP3 受容体タイプ3が軸索の NGF への感受性を抑制する役割を担うことが示唆されていた。そこでこの仕組みを分子レベルで解き明かすため、野生型あるいは IP3 受容体タイプ3ノックアウトマウスから培養した痛覚神経軸索の片側に NGF を投与し、成長円錐内に導入した蛍光 IP3 プローブあるいは Ca²⁺センサーによりこれらシグナル分子の挙動を定量的に解析した。NGF に遭遇した成長円錐では、IP3 受容体タイプ3の発現の有無に関わらず、NGF 遭遇側に限局して細胞質 IP3 濃度が上昇した。野生型の成長円錐ではこの IP3 濃度上昇域に一致して細胞質 Ca²⁺濃度も上昇したが、IP3 受容体タイプ3を欠損した成長円錐では IP3 濃度が上昇しない反対側においても細胞質 Ca²⁺濃度が上昇した。すなわち、IP3 受容体タイプ3を欠損した成長円錐では、空間的に非対称な細胞外 NGF シグナルに対して、細胞質 IP3 の非対称性は保持されるが、その下流の Ca²⁺シグナルでは非対称性が失われていた。このことは、IP3 受容体タイプ3が IP3 誘発性 Ca²⁺放出の感受性を制御している可能性を示唆しており、この受容体が NGF による軸索ガイダンスに必要である理由の説明が可能となった。

さらに動物個体での表皮への痛覚神経軸索の投射を解析したところ、IP3 受容体タイプ3を欠損した痛覚神経軸索は皮膚組織内を直進せず蛇行したが、この投射異常は表皮での NGF 発現量を RNA 干渉法により低減させることで改善した。すなわち、NGF に対して過剰応答性を示す IP3 受容体タイプ3欠損軸索は、標的組織(表皮)の NGF を実験的に低濃度側へシフトすることで、野生型軸索と同様の投射機能を獲得することができた。以上の研究により、痛覚神経軸索の皮膚投射をモデルとして IP3 受容体タイプ3の新規機能を明らかにし、神経軸索が細胞外ガイドランス因子の濃度変化に順応するための細胞内分子メカニズムの一端を解明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Ding F, Guy AT, Greimel G, Hirabayashi Y, Kamiguchi H, Ito Y : Squaryl group modified phosphoglycolipid analogs as potential modulators of GPR55, Chemical Communications, 査読無, 54 巻, 2018 年, pp8470-8473 DOI: 10.1039/c8cc04467h
2. Wada F, Nakata A, Tatsu Y, Ooashi N, Fukuda T, Nabetani T, Kamiguchi H: Myosin Va and Endoplasmic Reticulum Calcium Channel Complex Regulates Membrane Export during Axon Guidance, Cell Reports, 査読有, 15 巻, 2016 年, pp1329-1344 DOI:dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.021
3. Akiyama H, Fukuda T, Tojim T, Nikolaev VO, Kamiguchi H: Cyclic Nucleotide Control of Microtubule Dynamics for Axon Guidance, The Journal of Neuroscience, 査読有, 36 巻, 2016 年, pp5636-5649 DOI:doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3596-15.2016

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Kamiguchi H: Molecular signaling and steering machinery for neuronal growth cone guidance, ISN-JNC Flagship School, 招待講演, 国際学会, 2018
2. 上口裕之: 神経回路形成における軸索ガイダンス機構, 東京都医学総合研究所セミナー, 招待講演, 2017 年
3. Carmen Chan, 秋山博紀, 大芦典子, 松浦徹, 下郡智美, 御子柴克彦, 上口裕之: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3) is important for growth cone turning because it controls the asymmetry in Ca²⁺ elevation in response to guidance cues, 第 39 回日本神経科学大会, 国際学会, 2016
4. 和田文孝, 上口裕之: Myosin Va-dependent membrane export for axon guidance, 第 39 回日本神経科学大会, 国際学会, 2016

〔図書〕(計 1 件)

1. 上口裕之, シングルセル解析プロトコール, 羊土社, 2017 年 352 ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：井上真理子

ローマ字氏名：Mariko Inoue

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。