様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：１０１０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１５１７７

研究課題名（和文）軸索のサブセルラー機能解析システムと最適化モデルの構築

研究課題名（英文）Reconstitution of experimental system for subcellular analysis of axon and optimal mathematical model

研究代表者
神谷　温之（Kamiya, Haruyuki）

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：１０１９４９７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、例外的にパッチクランプ法による直接記録が可能な大型の軸索終末を有する海馬苔状線維に着目して、軸索のサブセルラー機能解析システムを構築し、軸索膜のイオンチャンネルの特性や分布について定量的な実験データを集積することと、これらの実験データに基づいた精緻な中枢軸索の興奮性に関する最適化モデルを構築することを目的とした。軸索終末からの活動電位の測定を可能とし、活動電位に引き続く後脱分極についてナトリウムチャンネルの関与を明らかにした。また、既存の苔状線維の活動電位モデルを改良し、後脱分極を再現する軸索モデルを構築した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish comprehensive subcellular analysis of hippocampal mossy fiber axons, which allow direct recording of action potentials from exceptionally large axon terminals, to examine the properties and distribution of ionic channels on the axonal membrane. It has been shown that some sodium channels contributed to generation of afterdepolarization lasting for tens of milliseconds. It was also attempted to revise the mathematical model to reconstitute axonal action potentials as well as the following afterdepolarization. We successfully revised the mossy fiber models to display robust afterdepolarization similar to those observed experimentally.

研究分野：生理学

キーワード：軸索　海馬　サブセルラー記録

１．研究開始当初の背景

神経細胞は軸索起始部（軸索初節）で活動電位を発生し、これを軸索終末に興奮伝播することで、神経系における高速で確実な長距離の情報伝達を行う。中枢軸索の興奮伝播とその制御については、その微小性に由来する実験的困難さにより詳細な解析は不可能であり、これまでイカ巨大軸索の細胞膜におけるイオンチャンネルの挙動に基づいた古典的なシミュレーションを用いたモデル研究により軸索での膜電位の振る舞いが推定されてきた。これに対し近年、意欲的な直接記録の試みにより軸索興奮性を分子レベルで記述する研究が急速に進展し、中枢軸索の神経生物学に関する古典的理解が急速に塗り替えられつつある状況であった。

２．研究の目的

軸索は神経細胞の出力を担い、軸索起始部で発生した活動電位を終末部に伝播することで、脳内の神経ネットワークにおける高速な情報伝達を行う。しかしながら、中枢神経系における軸索は極めて細く、電気生理学的な直接記録が困難であり、中枢軸索の興奮性制御機構については未だ不明な点が多い。本研究では、典型的な通過型シナプスを構成する海馬苔状線維の大型の軸索終末から直接的に活動電位やイオン電流を記録し、軸索膜のイオンチャンネルの特性や分布について定量的な実験データを集積し、これらの知見に基づいたより精緻な中枢軸索の興奮性に関する最適化モデルを構築することを目的とした。

３．研究の方法

マウス海馬スライス標本において、海馬苔状線維の大型の軸索終末を近赤外微分干渉顕微鏡により観察しながらその局在と形態から同定することが可能である。苔状線維の細胞体が存在する歯状回顆粒細胞層を電気刺激し、ルースパッチクランプ法を用いたサブセルラー記録により軸索での活動電位（軸索スパイク）を記録した。また、苔状線維終末からのホールセルクランプ記録により、直接的に軸索終末での活動電位を記録した。

また、生体での苔状線維の形態的特徴を模したマルチコンパートメントモデルによる苔状線維軸索の興奮伝播モデルがこれまでにいくつか提唱されている。これらの研究において、活動電位発生に関わる電位依存性ナトリウムチャンネルやカリウムチャンネルを記録し、そのチャンネル密度や開閉のキネティクスなどが記述され、これらの実験データに基づくパラメータが興奮伝播モデルにとり入れられている。本研究では、上記の直接記録で得られた軸索膜のイオンチャンネルに関する実験データを加味した、より正確に生体を反映した苔状線維興奮伝播モデルを構築した。また、これまでのモデルでは、実験で観察されるような活動電位に引き続く後脱分極の機構について検討されていない。本研究では、最新の改良型興奮伝搬モデルに、後脱分極の発生に関わるいくつかのイオン電流を組み込むことで、後脱分極の発生に関わる詳細なメカニズムについて探索を行った。

４．研究成果

本研究では、例外的にパッチクランプ法による直接記録が可能な大型の軸索終末を有する海馬苔状線維に着目して、軸索のサブセルラー機能解析システムを構築し、軸索膜のイオンチャンネルの特性や分布について定量的な実験データを集積することと、これらの実験データに基づいた精緻な中枢軸索の興奮性に関する最適化モデルを構築することを目指した。

まず、マウス海馬スライス標本における苔状線維終末からの直接記録法の妥当性について、苔状線維軸索がGFP蛍光標識されたトランスジェニックマウスを用いて検証した。これまでは、大きさや形状と局在などの形態的な特徴と、起始細胞である顆粒細胞の刺激で活動電位を発生する応答性を指標に、近赤外線微分干渉顕微鏡下で未染色の苔状線維終末を同定してきたが、トランスジェニックマウスで蛍光を指標に同定した苔状終末からも同様に顆粒細胞刺激により全か無かの法則に従う活動電位が記録できることから、苔状線維終末からのサブセルラー記録法の妥当性を確認した。

また、苔状線維に短い時間間隔で二発刺激を与えると、ルースパッチクランプ法で記録した二発目の軸索スパイクの大きさが軽度に減弱する現象（二発刺激抑圧、paired-pulse depression: PPD）を見出した。この軸索スパイクのPPDは数百ミリ程度持続した。この時間経過は、軸索活動電位に特徴的な後脱分極応答の時間経過とほぼ一致した。Held杯状シナプスでの後脱分極応答には過分極に応じて再活性化するリサージェント型のナトリウムチャンネルが関与することが示されていることから、海馬苔状線維でも同様のイオン機序が関与する可能性を検討した。ナトリウムチャンネルの活性化剤であるベラトリジンは二発刺激の一発目に対する応答にほとんど影響を与えずに、二発目の軸索スパイクを選択的に抑制し、PPDの程度は増強した。また、ナトリウムチャンネル阻害剤のテトロドトキシンを低濃度で投与するとPPDが軽度に減弱したことから、ナトリウムチャンネルが後脱分極の持続的な脱分極を引き起こし、活動電位発生に関わるナトリウムチャンネルの部分的な不活性化を引き起こし、軸索スパイクのPPDを引き起こしていると推定した。

また、既存の苔状線維の活動電位モデルを用いたシミュレーションでは、実験でみられるような後脱分極は生じなかった。そこで、リサージェント型ナトリウムチャンネルを

導入した改良型苔状線維モデルを構築したところ、この改良型モデルでは、実験で得られた時間経過とほぼ同様な後脱分極を再現した。苔状線維軸索には、リサージェント型ナトリウムチャンネル様のチャンネルが発現し、後脱分極の発生に寄与する可能性が推定された。

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）

〔雑誌論文〕（計　５　件）
① Ohura S, Kamiya H: Short-term depression of axonal spikes at the mouse hippocampal mossy fibers and sodium channel-dependent modulation. eNeuro、査読有 Vol. 5、No. 1、2018、ENEURO.0415-17.2018
DOI: 10.1523/ENEURO.0415-17.2018.
② Hoshino K, Hasegawa K, Kamiya H, Morimoto Y. Synapse-specific effects of IL-1β on long-term potentiation in the mouse hippocampus. Biomed Res.,査読有 Vol. 38、No. 3、2017、pp.183-188、DOI: 10.2220/biomedres.38.183.
③ Yamashita N, Aoki R, Chen S, Jitsuki-Takahashi A, Ohura S, Kamiya H, Goshima Y: Voltage-gated calcium and sodium channels mediate Sema3A retrograde signaling that regulates dendritic development. Brain Res., 査読有 Vol. 1631、2016、pp.127-136、DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.034.
④ Suzuki E, Kamiya H: PSD-95 regulates synaptic kainate receptors at mouse hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. Neurosci. Res., 査読有 Vol. 107、2016、pp. 14-19、
DOI: 10.1016/j.neures.2015.12.011.
⑤ Ohura S, Kamiya H. Excitability tuning of axons in the central nervous system. J. Physiol. Sci., 査読有 Vol. 66、No. 3、2016、pp. 189-196、
DOI: 10.1007/s12576-015-0415-2.

〔学会発表〕（計　１１　件）
① 神谷温之、軸索バーストとてんかん原性、第 95 回日本生理学会大会、2018 年
② Kamiya H. Local control of axonal excitability in the hippocampus. The 6th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, 2018 年
③ Kamiya H. Prolonged hyperexcitability of hippocampal mossy fibers after repetitive high frequency stimulation. Neuroscience 2017, 2017 年
④ Ohura S, Kamiya H. Peak reduction of axonal spikes in the hippocamal mossy fibers during the high frequency stimulation. Neuroscience 2017, 2017 年
⑤ 神谷温之、海馬苔状線維での異所性バースト発火のシミュレーション解析、日本生理学会北海道地方会、2017 年
⑥ 神谷温之、遠位軸索周囲の軽度なカリウム濃度上昇による海馬苔状線維の異所性スパイク、第 94 回日本生理学会大会、2017 年
⑦ 大浦峻介、神谷温之、海馬における軸索スパイクのアナログ制御、第 94 回日本生理学会大会、2017 年
⑧ Kamiya H. Noncanonnical mode of burst firing originated from distal axon. The 5th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, 2017 年
⑨ Kamiya H, Mulle C. Ectopic spike firings of the hippocampal mossy fibers by application of kainate to the distal axons. Neuroscience 2016, 2016 年
⑩ 神谷温之、海馬苔状線維における活動電位の二発刺激抑圧に関するシミュレーション解析、日本生理学会北海道地方会、2016 年
⑪ 神谷温之、海馬苔状線維における軸索スパイクの活動依存的調節に関するモデル解析、第 39 回日本神経科学大会、2016 年

〔図書〕（計　０　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　０　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://neurobiology.html.xdomain.jp/

６．研究組織

(1)研究代表者

神谷　温之（KAMIYA，Haruyuki）
北海道大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：１０１９４９７９