

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06857

研究課題名(和文)電気的軸索誘導におけるインテグリン受容体の役割の解明

研究課題名(英文)The role for integrin in electric axon guidance

研究代表者

山下 勝幸 (Yamashita, Masayuki)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：20183121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：発生過程で最初に分化したニューロンの軸索を誘導する分子メカニズムは不明である。本研究代表者は、発生初期胚の網膜内に細胞外電位勾配が存在し、網膜神経節細胞の軸索はこの電場に誘導されて伸長することを発見した。さらに、インテグリンが電気的軸索誘導に関与する証拠を得た。本研究では、インテグリンのリガンド結合ドメインへの細胞外Ca<sup>2+</sup>の配位、及び、インテグリンの活性化による微小管の安定化が電気的軸索誘導に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は新規な軸索ガイダンスメカニズムの提起である。これまで軸索は標的から分泌される誘引分子の濃度勾配に誘導されて伸長すると考えられてきた。中枢神経で最初に分化するニューロンは長距離にわたって伸長する軸索を出す。これらの軸索を誘導するメカニズムとして「長距離化学誘引分子」が想定されたが、現在では否定され、発生過程で最初の軸索ガイダンスメカニズムは不明のままであった。本研究はこの疑問を解明するとともに、神経再生への応用を開拓する。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism for the guidance of firstborn neurons' axons during development remains unknown. It has been elucidated that the extracellular voltage gradient exists in the embryonic retina and that the axons of retinal ganglion cells are directed by this electric field. Previous studies also revealed that integrin is involved in the electric axon guidance. The present study has elucidated that the binding of the extracellular Ca<sup>2+</sup> to the ligand-binding domain of integrin and the stabilization of microtubules are essential for the electric axon guidance.

研究分野：神経生理学

キーワード：電気的軸索誘導 galvanotropism インテグリン 網膜 培養 網膜神経節細胞 カルシウム 鶏胚

## 1. 研究開始当初の背景

軸索の伸長方向を決定する因子は誘引タンパクの濃度勾配と考えられてきた。しかし、発生過程で最初に分化したニューロンの軸索は長距離にわたって伸長し、「長距離化学誘引分子」の存在は現在では否定されている(Dominici *et al.*, 2017)。即ち、発生過程で最初の軸索ガイダンスメカニズムは不明である。研究代表者は発生初期の網膜内に正の直流電位が存在し、その振幅は網膜周辺部、特に背側部で大きく、視神経の出口となる腹側部ではゼロであり、網膜神経節細胞の軸索伸長方向と一致する細胞外電位勾配が形成されることを発見した(Yamashita, 2013)。この直流電位の起源は上皮型 Na<sup>+</sup>チャンネルであり、これを阻害すると電位勾配が消失し、軸索走行がランダムになることを明らかにした(Yamashita, 2013:2016)。これらから、細胞外電位勾配が軸索伸長のガイダンスキューであるという着想を得た。そこで定電場培養系を開発し、電氣的軸索誘導を起こす電場強度について報告した(Yamashita, 2015)。さらに、この定電場培養系を用いて電氣的軸索誘導にインテグリンが関与する証拠を得た。

## 2. 研究の目的

本研究は、電場によるインテグリンの活性制御機構と細胞骨格形成機序の解明を目的とし、新規な軸索ガイダンスメカニズムを提起することを目標とした。

## 3. 研究の方法

孵卵 6 日目の鶏胚網膜から、視神経乳頭より背側の部分を切り出し、網膜切片を作製した。この網膜切片を、細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)となる Matrigel®で包埋した。Matrigel®はインテグリンのリガンドであるラミニン・コラーゲンを含む。平成 27 年度に開発した定電場培養システムを用いて 24 時間培養した。生細胞をラベルする蛍光色素(calcein-AM)を用いて、網膜切片から腹側へ伸長する軸索を蛍光染色した。共焦点蛍光顕微鏡を用い、軸索の伸長を蛍光強度から定量的に解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 抗インテグリン抗体の濃度と電氣的軸索誘導との関係：

鶏インテグリンβ1 サブユニットに対するモノクローナル抗体である TASC と W1B10 の効果を、10 μg/mL から 200 μg/mL の濃度範囲で解析した。TASC と W1B10 は、電氣的軸索誘導を有意に促進した。両者とも 100 μg/mL の濃度で最大の効果が認められた。W1B10 は TASC よりも低い濃度(50 μg/mL 以下)から電氣的軸索誘導に対する促進効果がみられた。TASC の結合するエピトープは膜貫通ドメインに近い部位であり、TASC はリガンドが結合したオープンコンフォメーション時に結合してインテグリンのクラスター形成を促進すると思われた。一方、W1B10 のエピトープはリガンド結合ドメインと想定され、リガンドとの親和性を一様に低下させることにより微小管のダイナミックな成分を増加させ、軸索先端部の成長を促進すると推察された。

### 2) 細胞外 Ca<sup>2+</sup>の役割の解明：

インテグリンのリガンド結合ドメインには、「ADMIDAS」と呼ばれる Ca<sup>2+</sup>配位部位が存在し、Ca<sup>2+</sup>が配位するとリガンドとの親和性が低下し、インテグリンとリガンドとの結合が抑制される。Mn<sup>2+</sup>が存在すると「ADMIDAS」に Mn<sup>2+</sup>が配位し、インテグリンは高親和性の構造に固定される。Mn<sup>2+</sup> (500 μM)を培養液に添加すると電氣的軸索誘導が消失した。この結果から、電氣的軸索誘

導には、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の "ADMIDAS" への配位によるインテグリンの抑制的制御がキーであることを明らかにした。

3) 超高倍率共焦点蛍光撮像システムの構築：

ECM に含まれるラミニン・コラーゲンにインテグリンの頭部が結合する。その位置は細胞膜から約 30 nm の領域である。この領域における  $\text{Ca}^{2+}$  動態を可視化するために、超高倍率共焦点蛍光撮像システムを構築した。光路に中間変倍レンズを 2 カ所で挿入し、撮像カメラの画素の受光領域が 14.4 nm x 14.4 nm の倍率を得た。

4) 視神経形成におけるインテグリンと電場の役割の検証：

網膜神経節細胞の軸索は網膜に内在する電場に誘導されて視神経乳頭へ集合する(Yamashita, 2013)。鶏胚網膜器官培養でこの過程を再現した。この電気的軸索誘導にインテグリンが関与するかを検証するために、培養液に  $\text{Mn}^{2+}$  (500  $\mu\text{M}$ ) を添加した。 $\text{Mn}^{2+}$  の添加により網膜神経節細胞の軸索はランダムな走行を示した。この結果から、視神経形成にはインテグリンを介した電気的軸索誘導が必須であることが明らかになった。また、培養網膜切片に電場をかけると網膜神経節細胞の軸索は陰極側へ向かう。そこで、網膜に内在する電場の収束様式を再現し、電場を陰極側へ向かって漏斗状に収束した。その結果、網膜神経節細胞の軸索は収束し神経束を形成した。

5) インテグリンの活性化と微小管形成に關与する細胞内シグナル伝達系の薬理的解析：

微小管結合タンパク(MAP1B)をリン酸化する酵素(GSK3 $\beta$ )の抑制剤(LY2090314)の効果を解析した。MAP1B が GSK3 $\beta$  によりリン酸化されると微小管は安定化型から非安定化型へ変化する。電場をかけない場合、低濃度(2.5 nM, 10 nM)の LY2090314 は網膜神経節細胞の軸索伸長を促進し、高濃度(50 nM)では抑制した。LY2090314 の存在下では電場の作用が消失した。これらの結果は GSK3 $\beta$  による MAP1B のリン酸化が電気的軸索誘導に必須であることを示唆する。低濃度の LY2090314 は安定化型微小管を増加させ、軸索の本幹部分の伸長を促進すると考えられた。高濃度の LY2090314 はダイナミックな非安定化型微小管を過度に減少させ、ダイナミックな微小管の役割である軸索先端部におけるアクチン線維との結合が抑制され、軸索先端部の成長が抑制されると考えられた。次に、Akt の活性化剤(SC79)の効果を解析した。Akt はインテグリンにより活性化され、GSK3 $\beta$  をリン酸化することにより GSK3 $\beta$  を抑制する。SC79(25  $\mu\text{M}$ ) は軸索伸長を促進し、電場の作用を消失させた。この結果から、インテグリンは Akt の活性化を介して GSK3 $\beta$  を抑制すると考えられた。さらに、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)の阻害剤である Omipalisib の効果を解析した。PI3K はインテグリンにより活性化され Akt を活性化する。低濃度(2.5 nM)の Omipalisib は軸索伸長を促進し、電場の作用を消失させた。さらに濃度を上げると(10 nM, 100nM)、軸索は過度に伸長した。PI3K の活性化は微小管の安定化に必要であり、非安定化型微小管が過多になると軸索先端部が過度に成長すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita, M.	4. 巻 2346
2. 論文標題 Calcium fluorescence recordings from neuroepithelial stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology, Springer Nature	6. 最初と最後の頁 73-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/7651_2020_290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita, M.	4. 巻 2(3)
2. 論文標題 Electrical circuits that supply constant electric fields in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioelectricity	6. 最初と最後の頁 293-297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/bioe.2019.0036	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 Yamashita, M.	4. 巻 2092
2. 論文標題 Retinal strip culture for studying ganglion cell axon growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology, Springer Nature	6. 最初と最後の頁 55-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0175-4_5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita, M.	4. 巻 2(1)
2. 論文標題 Neural stem cells of retinal neuroepithelium direct retinal ganglion cell axons electrically: Galvanotropism in embryonic retina	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell & Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33425/2639-9512.1029	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 Yamashita, M.	4. 巻 8(5)
2. 論文標題 Neural stem cells of the neuroepithelium direct newborn neurons' axons electrically: Galvanotropism precedes chemotropism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 428-428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2157-7633.1000428	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yamashita, M.
2. 発表標題 Electric axon guidance in embryonic chick retina for optic nerve formation
3. 学会等名 12th FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita, M.
2. 発表標題 Anti-integrin antibodies enhance axon extension and electric guidance
3. 学会等名 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita, M.
2. 発表標題 Electric axon guidance is mediated by integrin: a study using constant electric field culture and embryonic chick retina
3. 学会等名 FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Regional Meeting, Belgrade, Serbia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita, M.
2. 発表標題 Electric axon guidance is mediated by Ca2+ binding to integrin
3. 学会等名 10th World Congress of Neuroscience International Brain Research Organization IBRO2019, Daegu, Korea (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita, M.
2. 発表標題 Electric axon guidance in embryonic retina: Regulation of integrin activities by extracellular Ca2+
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (Kobe) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita, M.
2. 発表標題 Electric axon guidance is mediated by integrin
3. 学会等名 11th FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Forum of Neuroscience (Berlin) (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------