

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06932

研究課題名（和文）代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ1の幼弱海馬特異的新機能の解明

研究課題名（英文）Investigation of novel mGluR1 function in the neonatal hippocampus

研究代表者

武藤 恵（TAKETO, Megumi）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50298189

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）：海馬のカハールレチウス（CR）細胞は、神経細胞の放射状移動を調節し、脳の発達に重要な役割を果たす。CR細胞は生後、代謝型グルタミン酸受容体サブタイプの一つmGluR1を発現するが、その生理的意義は明らかでない。Ca²⁺イメージングとパッチクランプ法により、CR細胞のmGluR1活性化にはチャンネルを開いて細胞を興奮させる作用よりは、細胞内Ca²⁺ストアからの動員により細胞内Ca²⁺濃度上昇を惹起して、細胞内情報伝達を修飾する作用が主体であることを示した。CR細胞ではmGluR1はアデノシン受容体とクロストークしてCa²⁺動員を行うことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であったCR細胞におけるmGluR1の機能が、細胞興奮性の調節よりも、主としてストアからのCa²⁺動員による細胞内Ca²⁺濃度上昇を担うことを明らかにした。また、再構成系ではなく本来mGluR1を発現している細胞であるため他受容体との、生理的に意味のあるクロストークを示すことができた。mGluR1はメラノーマ、運動失調症、統合失調症などの関与が示唆されており、特異的作動薬・阻害薬は治療効果が期待されているため、mGluR1特異的機能の情報は、これらの方面への寄与も期待される。

研究成果の概要（英文）：Hippocampal Cajal-Retzius (CR) cells play an important role in development of central nervous system through controlling radial migration of neurons. Postnatally, CR cells express a subtype of metabotropic glutamate receptor, mGluR1, of which physiological meanings are unknown. Ca²⁺ imaging and patch clamp experiments revealed that mGluR1 mobilizes Ca²⁺ from intracellular Ca²⁺ stores and modifies intracellular signal transduction, rather than to open ion channels and excite neurons. A crosstalk between mGluR1 and adenosine receptors was demonstrated in CR cells.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬 代謝型グルタミン酸受容体 カハールレチウス細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代謝型グルタミン酸受容体には I, II, III の型があり、 $G_{q/11}$ 蛋白と共役するのは I 型でこれには mGluR1 と mGluR5 のサブタイプが属する。これらは脳における遅い細胞興奮を担い、シナプス可塑性などへの関与が指摘されている。I 型の普遍的な性質として細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出があるが、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体電流の増強・電位依存性 Ca^{2+} チャンネル等の開口・ K^+ チャンネルの抑制等の性質については報告間で一貫性がなく、発現する組織に依存するとも考えられる。従来の研究では、多くの組織で複数のタイプが混在することもあり、各サブタイプの機能を分けて解析した例は少ない。代謝型グルタミン酸受容体はイオンチャンネル型受容体よりも多様なサブタイプを含み組織局在がそれぞれ異なるため、受容体特異的作動薬は神経細胞の活動の精細な調節を可能にするものとして開発が進められている。サブタイプ特異的な機能の情報は、これらの作動薬の作用を検討する上で必須である。

大脳皮質・海馬辺縁帯のカハールレチウス (CR) 細胞は、糖蛋白リーリンの分泌を通じて神経細胞の移動を調節し皮質層構造の形成に重要な働きをする。CR 細胞はまた興奮性の入力を海馬の他の細胞に送っており、海馬ネットワークの一部としても働いていることが推測されている。神経細胞の放射状移動を制御し皮質の層構造形成に関わる CR 細胞の機能についての知見は、脳の構造異常を示す滑脳症・裂脳症等の原因解明や治療に寄与すると考えられる。

海馬 CR 細胞では生後発達の一時期に、I 型のうち mGluR1 蛋白のみが強く発現するが、その役割は不明である。mGluR1 には他のサブタイプにはない未知の機能があり、この特異的な機能が海馬の正常発達に必要であると推定される。

2. 研究の目的

本研究の目的は CR 細胞における mGluR1 の機能を調べ、その役割を解明することであり、そのために他チャンネル・受容体との関係、神経ネットワークへの影響について検討する。

再構成系やスライスカルチャー等を用いた機能解析の結果は必ずしも生体内と同一ではなく、内因的に受容体を発現する組織では mGluR1 と mGluR5 が共に発現し両者の機能を分離することが困難な場合が多い。本研究は本来 mGluR1 のみを強く発現する細胞を対象とし、細胞レベルで、mGluR1 自体の活性化による反応の性質および他チャンネル・受容体とのクロストークについて解明する。また解剖・組織学的に存在が示されている神経線維投射経路が、受容体刺激で活性化されるか否かを確かめ、生理的な働きを明らかにする。

3. 研究の方法

幼若海馬のスライス標品を作成し、蛍光カルシウムイメージングにより CR 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。選択的作動薬・阻害薬を組み合わせることで mGluR1 を特異的に活性化した。

CR 細胞における mGluR1 活性化時の細胞内からの Ca^{2+} 放出と細胞外からの流入について検討するため、灌流液中に Ca^{2+} が存在する通常の条件下と灌流液中の Ca^{2+} を除去した条件下での観測値を比較した。また細胞内 Ca^{2+} プールを枯渇させた条件下で実験を行った。さらに Ca^{2+} チャンネルの特異的阻害薬存在下に mGluR1 活性化時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を計測した。CR 細胞上の他受容体とのクロストークの有無については、mGluR1 受容体と他受容体を同時に刺激した場合の Ca^{2+} 濃度変化を測定し、mGluR1 単独刺激時の変化と比較・解析した。

mGluR1 による CR 細胞の興奮性とネットワークに対する影響を検討するため、同様に幼若海馬のスライス標品を作成し、パッチクランプ法により CR 細胞から電位固定法で膜電流変化を記録し、mGluR1 を活性化して内向き電流の観測を試みた。同様に電流固定法で mGluR1 刺激時の膜電位変化を記録した。

4. 研究成果

mGluR1 受容体は他細胞で TRP チャンネルを作動させることが知られており、CR 細胞は TRPV1 チャンネルを発現しているという報告がある。海馬スライスの Ca^{2+} イメージングの結果、mGluR1 刺激後の CR 細胞における Ca^{2+} 濃度上昇は TRPV1 チャンネルのブロックによっては抑制されなかった。mGluR1 を介した Ca^{2+} 濃度上昇は、非特異的な TRP チャンネルのブロックерによっても同様に抑制されなかった。灌流液中の Ca^{2+} を除去した条件下でも Ca^{2+} 反応は惹き起こされ、逆に Ca^{2+} -ATPase 阻害剤を予め投与して細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させると反応が抑えられた。以上より細胞外からの流入による成分はほとんど無く、CR 細胞において mGluR1 が Ca^{2+} チャンネルを作動させている可能性は低いと考えられた。

引き続き Ca^{2+} イメージング法で他受容体との相互作用について調べたところ、 $GABA_B$ 受容体特異的アゴニストの投与によっては mGluR1 を介する Ca^{2+} 反応は変化せず、小脳プルキンエ細胞等で報告されている増強作用は認められなかった。その他の受容体について、アデノシン受容体刺激が小脳や再構成系では mGluR1 の作用を抑制あるいは増強することが報告されているため、アデノシン投与による mGluR1 反応の変化を観測した。この実験により、CR 細胞においては、アデノシン受容体刺激により、mGluR1 受容体を介する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が増強されることを見出した。アデノシン受容体とのクロストークに関しては、更に関与するアデノシン受容体のサブタイプおよび増強のメカニズムについて検討を加えた。

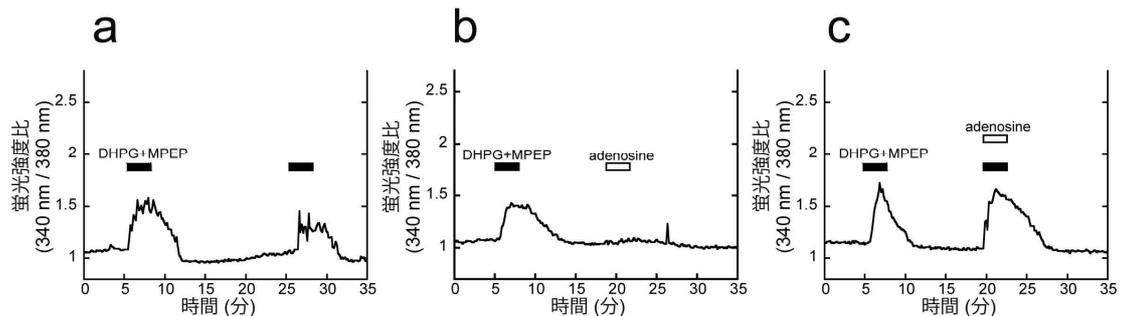


図 1 : mGluR1 を刺激 (DHPG+MPEP) すると Ca^{2+} 濃度上昇を反映して蛍光強度比が上昇する (a)。アデノシン受容体の単独刺激 (adenosine) ではほとんど蛍光強度比は変化しない (b)。mGluR1 刺激による反応はアデノシン受容体の同時刺激で増強する (c)。

Ca^{2+} イメージングの結果からは mGluR1 刺激による Ca^{2+} 流入はほとんど否定されるため、CR 細胞上の mGluR1 が Ca^{2+} チャネルを開いて細胞興奮性を上げるとは考えにくい。しかし、 K^+ チャネルの抑制等により細胞の膜電位を上げる可能性は残る。パッチクランプ法による実験を行い、電気生理学的に同定した CR 細胞から電圧固定法により膜電流を測定したところ、コントロールの $GABA_A$ 受容体のアゴニストによる電流変化は記録されたが、mGluR1 受容体アゴニスト投与によっては、海馬錐体細胞で報告されている内向き電流は認められなかった。電流固定法によっても、mGluR1 刺激による電圧変化は観測されなかった。

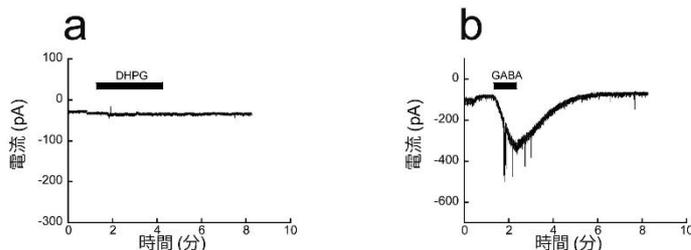


図 2 : CR 細胞からの電流計測。mGluR1 のアゴニスト投与により変化は認められない (a)。コントロールの $GABA$ 受容体刺激によっても、電流変化が観測される (b)。

また CR 細胞上の mGluR1 の活性化が海馬神経ネットワークへ及ぼす影響を検討するため、CR 細胞からの興奮性入力を受けているとされる錐体細胞において、興奮性自発電流の記録を行った。実験条件下での錐体細胞の興奮性電流の頻度は低く、mGluR1 刺激による頻度上昇は認められなかった。

これらの結果から、CR 細胞上の mGluR1 の活性化は、細胞膜の興奮性を高めてネットワークへの出力を増加させるよりは、主として細胞内 Ca^{2+} ストアからの動員によって細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、細胞内情報伝達系を修飾すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武藤 恵
2. 発表標題 幼若海馬におけるI型代謝型グルタミン酸受容体の機能
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤 恵
2. 発表標題 幼若海馬におけるI型代謝型グルタミン酸受容体を介したカルシウム動員
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤 恵
2. 発表標題 海馬辺縁体のI型代謝型グルタミン酸受容体によるCa ²⁺ 動員
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------