

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06772

研究課題名（和文）電気的軸索誘導の分子機構解明：細胞膜近傍カルシウムによるインテグリン活性の制御

研究課題名（英文）Mechanisms of electric axon guidance: regulation of integrin activities by cell surface calcium

研究代表者

山下 勝幸（YAMASHITA, Masayuki）

東北大学・医学系研究科・学術研究員

研究者番号：20183121

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）：本研究代表者は、発生期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(Yamashita, 2013)。2018年度基盤研究(C)において、インテグリンと細胞外Ca<sup>2+</sup>が電気的軸索誘導のキー分子であることを明らかにした。本研究では、電場が起こすCa<sup>2+</sup>流により軸索細胞膜近傍のCa<sup>2+</sup>分布が非対称になり、Ca<sup>2+</sup>によるインテグリン活性の抑制が陰極側で減少し微小管が陰極側で安定化されることにより、軸索は陰極側へ向かって伸長す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

網膜を含む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。その誘導には『長距離化学誘引分子』が想定されたが、現在は否定された。網膜では神経節細胞が最初に分化し、その軸索は視神経乳頭へ誘導されるが、そのメカニズムは不明であった。本研究の学術的意義は、発生期の網膜内に存在し視神経乳頭へ収束する電場に神経節細胞の軸索が誘導され、その分子メカニズムを解明したことにある。電気的軸索誘導の最初の報告は1920年であるが、その分子メカニズムは不明であった。電気的軸索誘導の応用により、iPS細胞から分化させたニューロンの軸索を正しい方向へ誘導することが可能になる。

研究成果の概要（英文）：In the embryonic retina, an electric field (EF) exists and this EF converges on the future optic disc. Retinal ganglion cell axons are directed by the EF toward the optic disc (Yamashita, 2013). My previous study (18K06857) showed that integrin and the extracellular Ca<sup>2+</sup> are crucial for electric axon guidance. The present study demonstrated that the extracellular Ca<sup>2+</sup> is asymmetrically distributed on the surface of an axon in an EF. Since integrin activities are less inhibited by the extracellular Ca<sup>2+</sup> on the cathodal side, the less inhibition of integrin leads to more stabilization of microtubules on the cathodal side. The asymmetric microtubule stabilization steers the axon toward the cathode as an axon turns to the direction of stabilized microtubules. The present study proposes an integrin-mediated electric axon steering model, which involves directional Ca<sup>2+</sup> movements and asymmetric microtubule stabilization.

研究分野：神経生理学

キーワード：電気的軸索誘導 インテグリン カルシウムイオン 微小管 網膜神経節細胞 視神経 鶏胚 電場

## 1. 研究開始当初の背景

網膜を含む中枢神経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する。軸索の伸長方向を決定する因子は、目標地点から分泌される誘引タンパクの濃度勾配と考えられてきたが、このような『長距離化学誘引分子』は否定された(Dominici *et al.*, 2017)。網膜では神経節細胞が最初のニューロンとして分化し、その軸索は視神経乳頭へ向かって収束する。この軸索誘導メカニズムは不明であった。本研究代表者は、発生期の網膜内に将来の視神経乳頭へ収束する細胞外電位勾配が存在し、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(Yamashita, 2013)。2018年度基盤研究(C)において、電氣的軸索誘導のキー分子はインテグリンと細胞外Ca<sup>2+</sup>である証拠を得た。インテグリンはリガンド結合ドメインにCa<sup>2+</sup>が配位するとリガンドとの結合が抑制されることから、細胞外Ca<sup>2+</sup>がインテグリンの活性を制御すると考えられた。また、インテグリンが活性化されると微小管が安定化されるので、インテグリンの活性制御は軸索の形態変化を引き起こす要因であると予想された。

## 2. 研究の目的

本研究は以下の2点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 電場により軸索細胞膜近傍でCa<sup>2+</sup>が非対称に分布するか、
- (2) インテグリンが非対称に活性化されると、微小管が非対称に安定化されるか。

## 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。細胞外基質(extracellular matrix, ECM)となるMatrigel®で網膜切片を包埋した。トラフ状のチェンバーに通電することにより一定の電場(15 mV/mm)を設定し24時間培養した。収束する電場では48時間培養した。単一軸索における細胞膜近傍Ca<sup>2+</sup>分布の解析には、細胞を分散させMatrigel®の薄層で培養した。生細胞をラベルする蛍光色素(calcein-AM)を用いて軸索を染色した。軸索の伸長を定量的に解析するために、蛍光強度の分布を、ImageJを用いて解析した。

## 4. 研究成果

2021年度から2023年度までの研究期間に以下の研究成果を得た。

### (1) 超高倍率共焦点蛍光撮像システムの構築

軸索細胞膜近傍のCa<sup>2+</sup>分布と軸索内の微小管の分布を解析するために、超高倍率共焦点蛍光撮像システムを構築した。光路の2箇所中間変倍レンズを挿入し、sCMOSカメラの1ピクセルあたりの倍率として、14.4 nm x 14.4 nm/pixelの拡大倍率を実現した。蛍光強度の減衰を補うために、sCMOSカメラの直前にイメージインテンシファイアを接続した。励起光も減衰するため、高出力のレーザー光源を導入した。

### (2) 軸索細胞膜近傍でのCa<sup>2+</sup>分布の解析

単一軸索の陽極側表面と陰極側表面におけるCa<sup>2+</sup>動態を、Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素(Calbryte™-520L)を用いて記録した。電場によりCa<sup>2+</sup>は陽極側から陰極側へ流動するため、陽極側表面により多くのCa<sup>2+</sup>が集積し、軸索細胞膜近傍でCa<sup>2+</sup>が非対称に分布することが明らかになった。

### (3) 網膜神経節細胞の軸索内における微小管の分布の解析

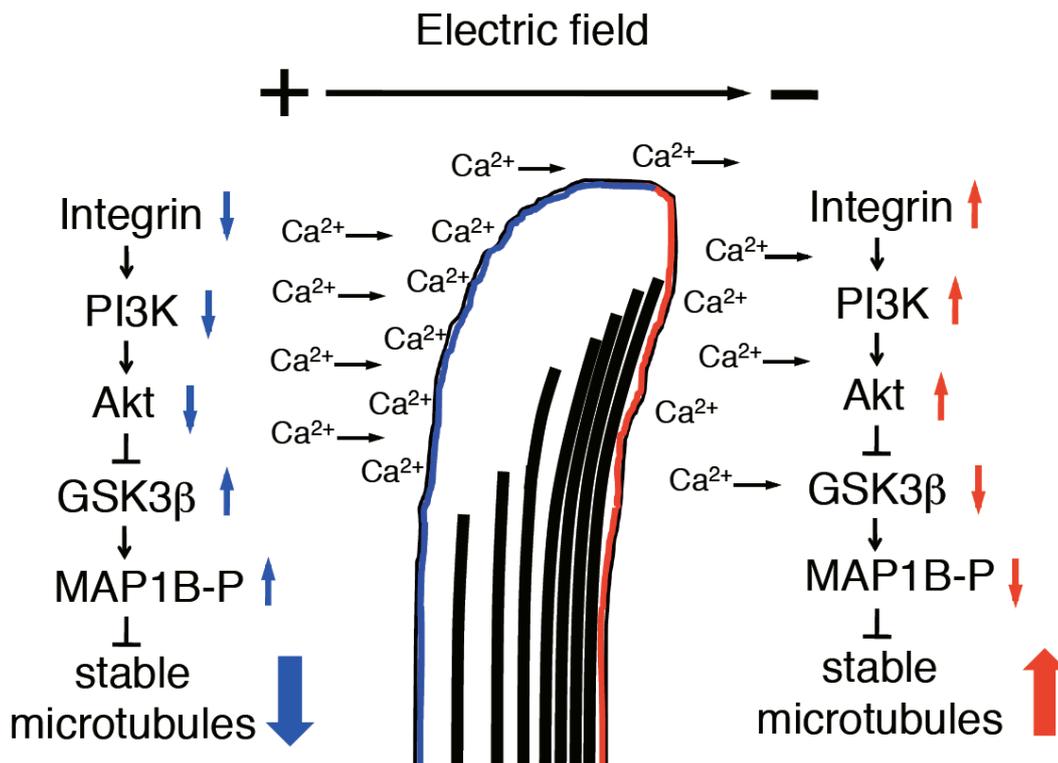
伸長する軸索内における微小管の分布を、微小管をラベルする蛍光色素(TubulinTracker™ Green)を用いて撮影した。軸索が陰極側へターンする部位において、微小管はインコースに偏って分布することを明らかにした。Nocodazole処理後も同様な結果を得た。これらの結果から、電場内で微小管は陰極側で安定化され、軸索は陰極側へ向かって屈曲することが明らかになった。

### (4) 収束する電場による軸索の収束

網膜切片を置いたトラフ状の流路(幅3.2 mm)から、microchannel (幅0.2 mmの電流路)に向かって電場を収束させた。網膜神経節細胞の軸索はmicrochannelの開口部に向かって収束した。軸索の収束角度と収束密度の解析により、抗インテグリン抗体(W1B10)が軸索の収束を促進し、Mn<sup>2+</sup> (100 μM)が抑制することを明らかにした。

(5) 総合的考察

鶏胚網膜神経節細胞の軸索に発現するインテグリンは $\alpha 6 \beta 1$ であり、そのリガンドはECMを構成するラミニンである。リガンドとの結合は細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ により抑制される。電場が起こす $\text{Ca}^{2+}$ 流により軸索表面の $\text{Ca}^{2+}$ は陽極側で増加し陰極側で減少するので、インテグリンの活性は非対称になると考えられる。インテグリンの活性化により微小管が安定化されるので、微小管は非対称に安定化される。即ち、電場の陰極側ではインテグリンの活性が上昇し微小管がより多く安定化される。軸索は微小管が安定化された方向へ屈曲するので、陰極側へ向かって伸長する。本研究により、電氣的軸索誘導は電場が起こす $\text{Ca}^{2+}$ 流によるインテグリンの非対称的活性化と微小管の非対称的安定化により生じることが明らかになった(下図、*Communications Biology*, 2023より)。



Supplementary Figure 12 in *Communications Biology* (2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masayuki Yamashita	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 Masayuki Yamashita	4. 巻 6
2. 論文標題 Integrin-mediated electric axon guidance underlying optic nerve formation in the embryonic chick retina	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-05056-x	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masayuki Yamashita
2. 発表標題 Electric axon guidance in embryonic chick retina: molecular mechanism and in vitro optic nerve formation
3. 学会等名 FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Forum 2022, Paris, July (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------