

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月19日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700366

研究課題名（和文）メカノセンサーによる軸索伸長の制御

研究課題名（英文）Regulation of axonal outgrowth by mechano-sensor

研究代表者

柴崎 貢志（SHIBASAKI KOJI）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20399554

研究成果の概要（和文）：TRPV2は1999年に52℃以上の侵害熱刺激を感知する熱センサーとしてクローニングされた。ところが、脊髄及びDRGにおけるこのチャンネルの発現時期を調べると、未成熟な神経細胞の出現にあわせて胎生期において既に発現を開始していた。子宮内の胎子が52℃以上の侵害熱刺激に遭遇する機会はないため、熱刺激以外のTRPV2リガンドが存在し、発達期には熱センサーとは全く異なる役割を持つと考えた。そして、解析を進めていくと、胎仔期のTRPV2は脊髄運動神経・DRG感覚神経が、末梢（皮膚・筋肉など）に向けて非常に長い軸索を伸長している時に細胞膜にかかる膜伸展刺激で活性化し、軸索伸長を促進させていることを突き止めた（Shibasaki et al., J. Neurosci. 2010）。さらに、TRPV2がどの程度微弱な機械刺激を受容可能であるのかを検証したところ、TRPV2は現在実験室でアプライし得る最も小さな機械刺激でも活性化することが判明した。また、腸管神経節の抑制性運動神経にもTRPV2が発現し、TRPV2をメカノセンサーとして用いることで蠕動運動を制御していた。我々の体には成長に応じてあらゆる細胞に対して伸展張力が働き、これを軸索が感じ取り、自分の体のサイズに合わせて神経回路の長さをチューニングしている。これらの結果より、TRPV2は受動的軸索伸長に関わる有力なメカノセンサーであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is specific characteristics that neurons can grow to the length of more than 1 m in humans. This mechanism of elongation has been called “passive stretching”. From embryonic stages, the passive stretching-dependent axonal outgrowth begins. As our body grows, the distances between neuronal cell bodies and growth cones gradually increase, thereby exerting tensile forces on the axons. It has never been identified for a long time which molecules are the mechanosensors for it. We previously reported that TRPV2 was a mechanosensor channel which contributed axonal outgrowth in membrane stretch dependent manner. These results indicate that TRPV2 might be an important component for passive stretching, if TRPV2 can detect very weak mechanical stimulus. In this study, we examined whether TRPV2 can detect such very weak mechanical stimulus by a Ca²⁺-imaging method and a whole-cell patch clamp recording. We also examined whether the activation of TRPV2 by weak mechanical stimulus lead to the enhancement of axon outgrowth by a time-lapse imaging method. Finally, we identified that TRPV2 had a potential to detect very weak mechanical stimulus, and the activation of TRPV2 promoted axon outgrowth. Taken together, TRPV2 is a strong candidate molecule for passive stretch-dependent axonal outgrowth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子神経生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：TRPV2、メカノセンサー、機械刺激、神経回路

1. 研究開始当初の背景

温度感受性 **Transient Receptor Potential (TRP)** チャンネルは、成体の後根神経節 (**DRG**) の神経細胞に高発現し、温度受容に関わる温度センサーチャンネルである。このチャンネルは世界で初めて明らかとなった痛みの分子実体であり、その発見により痛み研究が飛躍的に発展し、有効な鎮痛薬の開発につながった。しかしながら、発達期のどの段階でこのセンサーチャンネルの発現が開始するのかに関しては全く研究されていなかった。そこで、申請者は、発達期マウス脊髄領域の温度感受性 **TRP** チャンネル発現様式を解析した。その結果、神経発生のごく初期過程 (マウスの胎生 10.5 日齢) において、感覚神経・運動神経の双方に侵害熱センサー・**TRPV2** (52°C以上の熱で活性化) が発現開始することを見いだした。子宮内の胎仔が 52°C以上の熱刺激に暴露されることは生理条件下では考えられないことから、他に内在性のリガンドが存在し、この分子を活性化することで発達期の神経分化の調節に役立っていることが示唆された。

2. 研究の目的

発達期の神経細胞からは軸索が伸長してゆき、ターゲット領域に神経回路網が形成される。申請者は脊髄領域から末梢組織へ長い軸索を伸ばすことが必要な **DRG** 感覚神経と脊髄運動神経に限局して **TRPV2** イオンチャンネルが高発現しており、発達期の軸索伸長時間には、このセンサーがメカノセンサーとして機能することで、軸索伸長を促進することを見いだしている (柴崎ら, *J. Neurosci.* 2010)。本研究においては、**TRPV2** が軸索伸長を促進する分子機構、生体内で **TRPV2** が軸索伸長に果たす役割を明らかにし、神経回路網形成の分子基盤に迫った。

3. 研究の方法

神経回路網形成の分子基盤を明らかにするために、以下の3つのパートを遂行した。

1) **TRPV2** 過剰発現マウス、**TRPV2** 欠損マウスを用い、生体内におけるメカノセンサー・**TRPV2** の軸索伸長促進因子としての重要性解明 (野生型と比較しながら、組織・解剖学的解析、マウス個体を用いた行動・筋電解析)

2) 体の成長にあわせた神経回路伸長であ

る「受動的軸索伸長」の分子基盤の解明 (培養ニワトリ胚と上記マウスから調製した培養神経細胞を用いた機械刺激実験)

3) 末梢運動神経の軸索損傷時に **TRPV2** が軸索再生に果たす役割の解明 (上記マウス個体を用いた軸索損傷実験における末梢運動神経の再生過程の評価)

4. 研究成果

本研究により、外部からの機械刺激に伴い **TRPV2** が活性化するためには、細胞内因子が必須であることを明らかにした。**TRPV2** が生体内においても軸索伸長時間にメカノセンサーとして機能し、軸索伸長を促進しているのかどうか検討するためには、遺伝子改変動物を用いた解析が必要であった。このため、脊髄運動神経と **DRG** 感覚神経特異的に **TRPV2** を欠損させた **TRPV2CKO** マウスを作製した (**Islet1-Cre** マウスと **TRPV2-flox** マウスを交配して作製)。そして、その表現型異常を見いだした。

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 9 件)

#は報告者が責任著者であることを示す

① *Naruse M, *#Shibasaki K, Yokoyama S, Kurachi M, Ishizaki Y. Dynamic Changes of CD44 Expression from Progenitors to Subpopulations of Astrocytes and Neurons in Developing Cerebellum. *PLoS ONE* 2013;8(1): e53109 (査読あり) *Co-1st author

② *Matsumoto H, *#Shibasaki K, Uchigashima K, Koizumi A, Kurachi M, Watanabe M, Kishi S, Ishizaki Y. Implication of the Communication from Photoreceptor to Retinal Pigment Epithelium. *PLoS ONE* 7: e42841, 2012 (査読あり)

③ Konno M, Shirakawa H, Iida Shota, Sakimoto S, Matsutani I, Miyake T, Kageyama K, Nakagawa T, Shibasaki K,

- Kaneko S. Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *GLIA* 60(5) : 761-70, 2012 (査読あり)
- ④ Cai N, Kurachi M, Shibasaki K, Okano-Uchida T, Ishizaki Y. CD44-positive cells are candidates for astrocyte precursor cells in developing mouse cerebellum. *The Cerebellum* 11:181-193, 2012 (査読あり)
- ⑤ Feng L, Eisenstat D.D., Chiba S, Ishizaki Y, Gan L, # Shibasaki K. Brn3b inhibits generation of amacrine cells by binding to and negatively regulating DLX1/DLX2 in developing retina. *Neuroscience* 195 : 9-20, 2011 <cover of the paper> (査読あり)
- ⑥ 柴崎貢志 「痛みセンサーTRPV1 と TRPA1 に関する研究展開」 *臨床麻酔* 36 : p 503-507, 2012. (査読なし)
- ⑦ 柴崎貢志 「神経発生・神経興奮を制御するセンサー分子から迫るニューロン研究」 *神経化学* 51 : p 1-8, 2012 (査読なし)
- ⑧ Saito T, Shibasaki K, Kurachi M, Ishizaki Y. Cerebral microvessel endothelial cells are covered by the VEGF-expressing foot processes of astrocytes. *Neurosci. Letter* 497 : 116-121, 2011 (査読あり)
- ⑨ \$ Ristoiu V, \$ Shibasaki K, Ono K, Ishizaki Y, Tominaga M. Hypoxia induced sensitization of TRPV1 involves activation of HIF1 and PKC. *PAIN* 152 : 936-45, 2011 (Cover of the paper) 中日、科学新聞に掲載 \$: equally contribution (査読あり)
- ③ Shibasaki K, Goto H, Ishizaki Y, Ono K. Mechanosensor TRPV2 channel detects very weak mechanical stimulus during axon outgrowth; a strong candidate sensor for passive stretch-dependent axonal outgrowth. 日本神経化学会・アジア環太平洋神経学会合同大会 2012年9月29日(神戸)
- ④ Shibasaki K, Tominaga M, Ishizaki Y. Brain temperature enhances hippocampal neuronal excitability through TRPV4 activation in vivo. *S Forum of European Neuroscience* 2012年7月15日 (Barcelona, Spain)
- ⑤ Shibasaki K Brain temperature enhances hippocampal neuronal excitability through TRPV4 activation in vivo. 第35回日本神経科学大会 シンポジウム講演 2012年9月21日 (名古屋)
- ⑥ 柴崎貢志、脳内温度と神経活動の機能相関、第54回日本神経化学会大会 シンポジウム講演 2011年9月28日 (石川)
- ⑦ 柴崎貢志、アストロサイト TRPV2 と TRPV4 の機能特性の違い：相補的な神経活動調節、第34回日本神経科学大会 シンポジウム講演 2011年9月16日 (横浜)
- ⑧ 柴崎貢志、ユニークなセンサー研究から見えて来た新たな神経回路形成の分子機構、世界脳週間 2011 招待講演 2011年4月29日 (前橋)

[図書] (計2件)

- ① 柴崎貢志、ブレインサイエンスレビュー 2013 (クバプロ)
- ② Shibasaki K et al. *MethPharmTox TRP book* 2012 (Humana Press)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：

[学会発表] (計8件)

- ① 柴崎貢志、細胞力覚センサー・TRPV2 が関与する受動的軸索伸長の分子機構 日本解剖学会 2013年3月30日(高松)
- ② 柴崎貢志、メカノセンサーTRPV2 は受動的軸索伸長に関与する 日本分子生物学会 2012年12月14日(福岡)

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://www.nips.ac.jp/cs/sibaHP/shibasaki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴崎 貢志 (SHIBASAKI KOJI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20399554

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし