

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460298

研究課題名(和文) 神経発生期に存在する細胞外電位勾配：軸索ガイダンスにおける役割とイオン機序の解明

研究課題名(英文) Molecular and ionic mechanisms for 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：発生初期の網膜には周辺部から腹側部へ向かう電位勾配が形成される。この電位勾配の方向は網膜神経節細胞の軸索伸長方向と一致する。本研究では、細胞外電位勾配による軸索ガイダンスの分子メカニズム、及び、細胞外電位勾配の起源となるイオン機序の解明を目的とした。

鶏胚網膜から網膜切片を作製し、本研究において開発した定電場培養システムにおいて24時間培養した。その結果、1) 電気的軸索誘導に細胞外カルシウムイオンが関与すること、2) 細胞接着分子であるインテグリンが関与すること、及び、3) 細胞外電位は上皮型ナトリウムチャンネルを介すること、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Retinal ganglion cell axons extend along the extracellular voltage gradient.

However, there is no experimental evidence for the cell surface molecule that is activated asymmetrically in electric fields. Here I show that integrins and the extracellular calcium ions are involved in the electric axon guidance. Retinal strips of chick embryos were cultured in a constant electric field. Retinal ganglion cell axons extended towards the cathode. Anti-chicken integrin antibodies and a reduction in the extracellular calcium ions with EGTA enhanced the cathodal growth. These results suggested that the inhibition of integrins by the extracellular calcium ions underlies the electric axon guidance. In the embryonic retina, positive direct current (DC) potentials are generated by neuroepithelial cell's sodium transport, of which disruption results in erroneous axon path-finding. Thus, the electric field plays a pivotal role in orienting newborn neurons' axons.

研究分野：神経生理学

キーワード：軸索ガイダンス galvanotropism (電気向性) 網膜神経節細胞 神経上皮細胞 イオンチャンネル 細胞外電位勾配 電場 培養

1. 研究開始当初の背景

軸索の伸長は細胞外電位勾配に誘導されることが、培養系を用いた研究により報告されていた。しかしながら、発生初期胚の神経組織に細胞外電位勾配が存在するか、また、電位勾配による形態変化の分子メカニズムは不明であった。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、網膜の周辺部から腹側部へ向かう電位勾配が形成されることを発見した。即ち、発生初期の鶏胚網膜神経上皮内に正の直流電位が存在し、その振幅は周辺部、特に、背側部で大きく(8 mV)、腹側部で最も小さい(<1 mV)ことを明らかにした(Yamashita, 2013)。網膜神経節細胞は網膜の中央部で最初に分化し、その軸索は、腹側部、即ち、将来の視神経乳頭へ向かう。この軸索伸長方向は、網膜中央部での細胞外電位勾配(約 15 mV/mm)の方向と一致する。網膜神経節細胞の軸索は、網膜の各領域から腹側部、即ち、将来の視神経乳頭へ向かい、網膜内における電位勾配の方向と一致する。これらの事実から、細胞外電位勾配が、軸索伸長の開始時点におけるガイダンスキューではないかという着想を得た。

脳と網膜・脊髄を結ぶ伝導路の軸索伸長方向を決定するメカニズムとして、標的細胞から分泌される“遠距離軸索誘引分子”の濃度勾配が想定された。しかし、伝導路の起始ニューロンは中枢神経内で最も早期に分化し、これらのニューロンが軸索伸長を開始する時点において標的細胞は未だ分化していない。また、胚の神経組織では細胞外スペースが極めて狭く、誘引タンパク分子の遠距離拡散は単純ではない。現在では、“遠距離軸索誘引分子”の存在は否定的であり、伝導路の起始ニューロンが軸索伸長を開始する時点での伸長方向を決定するメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外電位勾配による軸索ガイダンスの分子メカニズム、及び、細胞外電位勾配の起源となるイオン機序の解明を目的とし、中枢神経系において伝導路の起始ニューロンが軸索伸長を開始する時点での伸長方向決定原理の構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究では一定の電位勾配が設定できる培養システムを開発した。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、軸索伸長の足場となる基底膜分子(ラミニン・コラーゲン)を含む Matrigel® に包埋して24時間培養した。本研究で開発した定電場培養システムでは、網膜切片を挟む2点の電位差を常時記録し、この電位差が一定となるようにフィードバック回路を設計し、培養液に直流電流を通電した。培養後、生細胞のラベルに用いられる蛍光色素(calcein-AM)

によって軸索と細胞体を蛍光染色し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて軸索の走行を撮影した。また、ImageJを用いて軸索の伸長を定量的に解析した。

4. 研究成果

発生初期の鶏胚網膜内に形成される正の直流電位は、網膜神経上皮細胞に存在する上皮型 Na⁺チャネル(ENaC)を介する Na⁺輸送によることを明らかにした。即ち、上皮型 Na⁺チャネルの阻害剤(amiloride)を投与すると、この直流電位が可逆的に抑制され、さらに、網膜器官培養系に amiloride を添加すると、軸索の走行が乱れることを明らかにした。

次に、網膜神経節細胞の軸索を誘導する電場強度を求めるために、定電場培養システムを開発し、0.0005 mV/mm から 10 mV/mm の電位勾配において網膜切片を培養した。その結果、電場強度が 0.0005 mV/mm から電位勾配に従って陰極側へ向かう伸長が見られ、0.2-0.5 mV/mm 以上では電場に沿った直進が観察された。以上の結果から、発生初期の網膜内に存在する電位勾配(15 mV/mm)は、網膜神経節細胞の軸索を、将来の視神経乳頭へ正確に誘導するのに十分な強度であると結論された。

さらに、電氣的軸索誘導の分子メカニズムを解明するために、上記の定電場培養システムを用い、細胞外電位勾配の存在下で軸索の細胞膜において非対称的に活性化される分子の同定を試みた。細胞外電位勾配は Ca²⁺を含むイオン流を起こすと想定され、まず、EGTA(1 mM)を培養液に添加し、細胞外 Ca²⁺濃度を低下させ、軸索走行に対する影響を解析した。網膜内に存在する電場強度(15 mV/mm)で網膜切片を培養した結果、EGTAの添加により、陰極方向への軸索伸長は促進されることを明らかにした。EGTAの濃度を2 mMに上げた場合は、軸索の伸長方向がランダムになったことから、軸索伸長の方向決定には、少なくともミリモル濃度の Ca²⁺が必要であることが示唆された。これらの結果から、電氣的軸索誘導に Ca²⁺流が関与すると考えられた。次に、細胞外 Ca²⁺によって活性が制御される細胞接着分子としてインテグリンの関与を検討した。鶏のインテグリンβ1サブユニットに結合するモノクローナル抗体である TASC(200 µg/mL)、及び、W1B10(200 µg/mL)を Matrigel® に添加した結果、陰極方向への軸索伸長が促進されることを明らかにした。

以上の結果から、電場が起こす Ca²⁺流により軸索の細胞膜表面における Ca²⁺濃度が非対称となり、即ち、陽極側では Ca²⁺濃度が上昇し、陰極側では低下することにより、インテグリンの活性が非対称になると考えられた。インテグリンは細胞外 Ca²⁺により抑制的に制御されることが知られているので、陽極側ではインテグリンの活性が低下し、陰極側では上昇すると思われる。インテグリンの活性化

は細胞骨格分子（アクチンフィラメント・微小管）の重合を促進するので、インテグリンの活性が非対称になると細胞骨格分子の重合も非対称となり、軸索は陰極方向へ伸長すると考えられる。

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 10 件）

- ① Yamashita, M. (2017) Neural stem cells of the neuroepithelium direct newborn neurons' axons electrically: Galvanotropism precedes chemotropism. *Stem Cell Research and Regenerative Medicine* 1: 1-2. (査読有)
<https://www.omicsonline.org/open-access/neural-stem-cells-of-the-neuroepithelium-direct-newborn-neurons-axons-electrically-galvanotropism-precedes-chemotropism.pdf>
- ② Yamashita, M. (2017) Electric axon guidance in embryonic retina: Involvement of integrins. *Journal of Neurology and Neurophysiology*, 8: 39. (査読有)
doi.org/10.4172/2155-9562.C1.043
- ③ Yamashita, M. (2017) Integrins mediate electric axon guidance. *Journal of Physiological Sciences*, 67: S119. (査読有)
- ④ Yamashita, M. (2016) Epithelial sodium channels (ENaC) produce extracellular positive DC potentials in the retinal neuroepithelium. *Data in Brief*, 6: 253-256. (査読有)
doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.068
- ⑤ Yamashita, M. (2016) Weak electric fields direct retinal ganglion cell axons *in vitro*. *Journal of Physiological Sciences*, 66: S125. (査読有)
- ⑥ Yamashita, M. (2015) Weak electric fields serve as guidance cues that direct retinal ganglion cell axons *in vitro*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 4: 83-88. (査読有)
doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.022
- ⑦ Yamashita, M. (2015) Electrophysiological recordings from neuroepithelial stem cells. *Methods in Molecular Biology, Springer Protocols*, 1212: 195-200. (査読有)
[doi 10.1007/7651_2014_96](https://doi.org/10.1007/7651_2014_96)
- ⑧ Yamashita, M. (2015) Threshold strength of electric fields for orientation of retinal ganglion cell axons *in vitro*. *Journal of Physiological Sciences*, 65: S116. (査読有)
- ⑨ Yamashita, M. (2014) Electric axon guidance in constant electric field culture.

Journal of Physiological Sciences, 64: S124. (査読有)

- ⑩ Yamashita, M. (2013) From neuroepithelial cells to neurons: Changes in the physiological properties of neuroepithelial stem cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 534: 64-70. (査読有)
doi.org/10.1016/j.abb.2012.07.016

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① 山下 勝幸, 電氣的軸索誘導にインテグリンが関与する. 第94回日本生理学会大会, 2017.3.29, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市).
- ② Yamashita, M. Electric axon guidance in embryonic retina: Involvement of integrins. 10th International Conference on Neuroscience and Neurochemistry, 2017.2.27, Amsterdam (Netherlands).
- ③ 山下 勝幸, 電氣的軸索誘導の分子機構: 発生初期における網膜神経節細胞の軸索伸長方向決定メカニズムの解明. 第20回視覚科学フォーラム研究会, 2016.8.26, 大阪大学脳情報通信融合研究センター (大阪府・吹田市).
- ④ Yamashita, M. Weak electric fields serve as guidance cues that direct retinal ganglion cell axons *in vitro*. 10th FENS Forum of Neuroscience, 2016.7.6, Copenhagen (Denmark).
- ⑤ 山下 勝幸, 網膜神経節細胞の軸索を誘導する電場強度: 定電場培養系での研究. 第93回日本生理学会大会, 2016.3.23, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市).
- ⑥ Yamashita, M. Physiological properties of neural stem cells of the neuroepithelium. 9th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, 2016.3.16, Seoul (South Korea).
- ⑦ 山下 勝幸, 細胞外電位勾配による軸索ガイダンス: 網膜神経節細胞の軸索を誘導する電場強度. 第246回生理学東京談話会, 2015.9.26, 東邦大学医学部 (東京都・大田区).
- ⑧ 山下 勝幸, 網膜神経節細胞の軸索を誘導する電場強度. 第19回視覚科学フォーラム研究会, 2015.8.19, ホテル福島グリーンパレス (福島県・福島市).
- ⑨ Yamashita, M. Weak electric fields serve as a guidance cue directing axons of retinal ganglion cells *in vitro*. 9th World Congress of International Brain Research Organization (IBRO2015), 2015.7.8, Rio de Janeiro (Brazil).

- ⑩ 山下 勝幸, 培養網膜神経節細胞の軸索伸長方向を決める細胞外電場強度. 第 92 回日本生理学会大会, 2015.3.21, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市).
- ⑪ Yamashita, M. Electric axon guidance during development of retinal ganglion cells. The 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2014), 2014.7.20, Montreal (Canada).
- ⑫ 山下 勝幸, 定電場培養による軸索伸長方向の制御. 第 91 回日本生理学会大会, 2014.3.16, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市).
- ⑬ Yamashita, M. Electric fields guide axons of retinal ganglion cells: galvanotropism revisited. Neuroscience 2013, Society for Neuroscience, 2013.11.10, San Diego (USA).

6. 研究組織

(1) 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