

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460293

研究課題名(和文) イオンチャネルにより駆動される胎生期の神経細胞移動と細胞間情報伝達機序の解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanisms for neuronal migration and intercellular communication steered by ion channels in the embryonic brain

研究代表者

秋田 天平 (Akita, Tenpei)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00522202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イオンチャネルによる胎生期の神経細胞移動の駆動と細胞間情報伝達機序を明らかにするため、胎生脳内のGABA作動性介在神経前駆細胞について、大脳皮質発達過程時にその細胞移動を誘導又は抑制するガイダンス分子の作用により活性化されるイオンチャネルの種類と、その活性化機序を明らかにすることを試みた。その結果、移動誘導時のカリウムチャネルの抑制と陰イオンチャネルの活性化、そして移動の誘導及び抑制時ともに、細胞内カルシウムイオン濃度上昇を介してイオンチャネル活性が制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms for neuronal migration and intercellular communication steered by ion channels in the embryonic brain, we investigated the mechanisms of ion channel activation induced by the action of guidance molecules that promote migration or repulsion of GABAergic interneuron precursors during development of the cerebral cortex in embryos. We found that potassium ion channels are suppressed and anion channels are activated during migration, and that the regulation of ion channels during both migration and repulsion might be mediated by the rises in intracellular calcium ion concentration.

研究分野：細胞生理学・神経生理学

キーワード：イオンチャネル 胎生期 大脳皮質形成 GABA 細胞移動 移動誘導因子 移動忌避因子 細胞内カルシウムシグナリング

1. 研究開始当初の背景

細胞が組織内を移動する際、その移動経路の幅等に応じて細胞の容積は常に調節されており、その容積調節は移動時の細胞骨格の再編成を誘起する上でも必須なものである。細胞の容積調節は、細胞膜の各種イオンチャネルやトランスポータ蛋白により細胞膜を横断する正味の溶質の出入が調節され、それに付随して受動的な水の出入が誘導されることにより達成される。そのような容積調節はほぼ全ての種類の細胞で行われるが、特に移動や増殖の活発な上皮細胞や腫瘍細胞、そして低分化な発達期の細胞では、容積調節に関わるイオンチャネルの発現量やそれによる容積調節能は他に比して大きく、またその容積調節の阻害によりそれらの移動・増殖・分化は全て阻害される。従って、移動・増殖・分化の過程では容積調節機構は必須であり且つ積極的に働いている。

容積調節時に細胞膜の陰イオン（アニオン）透過を担う主なイオンチャネルとして、細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル（VSOR）があり、ほぼ全ての種類の細胞に発現している。本研究代表者はかつてそのVSOR活性化機序の一つとして、ブラジキニン・ATP・グルタミン酸等の化学伝達物質が細胞に作用した際に、開口した個々のCa²⁺透過型イオンチャネルの数十ナノメートル以内に形成される高Ca²⁺濃度領域「Ca²⁺ナノドメイン」を通じてVSORが活性化される機序があることを見出した（引用文献）。この機序により化学伝達物質の作用部位近傍にあるVSORが選択的に活性化されることから、この機序は1細胞上の局所的な容積変化を誘導するための基盤機序の一つと考えられる。そのような局所的な容積調節機構は、細胞の多様な形態変化や移動方向への伸展及びその反対側の退縮を、その部位毎に独立して制御する上で必須であると示唆されてきたが、実際の組織内を移動する細胞において、その機構が如何に誘導され移動が制御されているかについて、未だ統一的な見解が得られていない。その理由として、イオンチャネルやトランスポータを介する溶質の移動は細胞膜電位や細胞内外の溶質の濃度勾配によってその溶質の移動量や方向が規定されるため、単純に一種の膜蛋白質の分布や増減に注目するだけでは容積変化の方向性を特定し難いこと、また細胞の移動速度や機能に応じて異なる機能蛋白の組み合わせが用いられている可能性があること等が考えられる。従って、細胞移動における容積調節機構を正確に理解するためには、細胞の種類や部位毎に種々の要素の影響を総合的に検討する必要がある。

細胞の移動・増殖・分化の全てが活発に行われている系の一つとして、胎生期の脳の発達過程が挙げられ、その過程においても容積調節機構は積極的に働いているはずである。しかし、これまでに様々な細胞骨格関連分子

や移動のガイダンス分子、そしてそれらの転写因子については多数検討が行われているにもかかわらず、容積調節に関わるイオンチャネルやトランスポータの意義を検討した研究は皆無である。

また、VSORをはじめとする多くのアニオンチャネルに共通の性質として、グルタミン酸・アスパラギン酸やタウリン等、或る種の化学伝達物質に対しても有意な透過性を持つという性質がある。成体脳における化学伝達物質の放出は主にシナプス部位での開口放出によるが、脳浮腫や炎症等の病態時にVSORをはじめとするアニオンチャネルが多数活性化され、それらを通じて放出される化学伝達物質が隣接細胞への情報伝達や、ひいては過興奮性毒性をもたらすことが知られている（引用文献）。一方、胎生脳においてもGABAやタウリン・グルタミン酸等の化学伝達物質が神経細胞の発生・増殖・移動・分化の全ての段階で重要な役割を果たすが（引用文献）、シナプスや開口放出機構が未発達の胎生脳でそれらの化学伝達物質がどのように放出されているかについては知見が確定しておらず、アニオンチャネルの関与については未だ検討されていない。

2. 研究の目的

イオンチャネルやトランスポータにより駆動される細胞容積調節機構は、細胞の移動を駆動する上で必要不可欠である。本研究は胎生期の脳皮質発達過程における神経細胞移動に注目し、移動細胞の前部と後部のそれぞれの部位で、移動を制御することが知られる各種化学伝達物質やガイダンス分子の作用により活性化されるイオンチャネルやトランスポータの種類を同定し、それらの活性化により同部位に誘起される細胞膜電位や細胞内外の溶質濃度勾配の変化と、その部位の容積（形態）変化との相関を調べることにより、局所的な容積調節を通じて細胞全体の移動が駆動される機序を明らかにする。また、胎生脳の発達過程において重要なGABAやタウリン等の化学伝達物質が、アニオンチャネルを通じて放出されている可能性についても検討する。

3. 研究の方法

研究対象は、大脳皮質形成期にあるマウス胎仔終脳の皮質内を放射状及び接線方向に移動中の神経細胞とする。スライス切片中の細胞は常時組織間液中の化学伝達物質の作用や隣接細胞との相互作用の影響を受けることを考慮し、本研究では無酵素処理で急性単離した細胞と切片内の細胞の双方の観測を行い、相補的に比較検討を進める。初年度は主に単離細胞について、次年度以降は切片内の細胞についても、各種化学伝達物質や移動のガイダンス分子の作用により活性化されるイオンチャネルやトランスポータの種類と細胞上の部位を、電気生理学・分子生物

学・免疫化学的手法を駆使して同定し、それらの活性化と部位毎の細胞内各種イオン濃度及び容積（形態）変化との相関をライブセルイメージングにより明らかにする。また、アニオンチャネルによる化学伝達物質放出の可能性についても、単離細胞及び切片標本双方の利点を生かして検討する。

4. 研究成果

(1) 初年度（平成 26 年度）は、大脳皮質形成期にあるマウス胎仔（妊娠 14 - 16 日目）終脳内の神経細胞のうち、腹側基底核原基より皮質内を接線方向に移動する GABA 作動性介在神経細胞の前駆細胞を研究対象とした。スライス切片中の腹側基底核原基から急性単離した細胞に対してホールセルパッチクランプ法を適用し、細胞膜電位固定下で Neuregulin 1 (NRG1) の作用により活性化ないし抑制されるイオンチャネルやトランスポータの種類について検討した。NRG1 は胎生脳内で分泌され、その受容体の ErbB4 への作用を通じて GABA 作動性神経前駆細胞の移動を調節することが知られており、統合失調症発症脆弱性因子としても知られている。胎生期神経前駆細胞に対してホールセルパッチクランプ法により安定した細胞膜電流を記録することは思いの外難しく、まだ確定的とは言えないが、NRG1 の作用により或る種の外向整流性カリウムチャネルが抑制され、また或る種のアニオンチャネルが活性化される傾向が認められた。今後はより安定的な記録法を模索しつつ、それらのイオンチャネルの種類と同定を行う必要がある。

また、本年度は中枢神経系における細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) についての総説を執筆し（雑誌論文）、胎生期大脳皮質発達過程での神経細胞移動における VSOR の役割について議論を行った。さらに、第 92 回日本生理学会大会・第 120 回日本解剖学会総会の合同大会において、本研究代表者はシンポジウム「神経発達制御機構研究の新たな潮流」を主催し、本研究代表者自身は胎生期大脳皮質発達過程で VSOR を介して放出されるタウリンによる、グルタミン酸作動性錐体神経前駆細胞の放射状移動の制御について、昨年度我々が論文発表した内容を基に今後の展望についての議論を行った（学会発表）。また、連携研究者の福田敦夫・浜松医科大学教授らによっても、別の総説中（雑誌論文）及び第 37 回日本神経科学大会において（学会発表）同様の議論が行われた。

(2) 平成 27 年度も引き続き、大脳皮質形成期にあるマウス胎仔（妊娠 14 - 16 日目）終脳内の神経細胞のうち、腹側基底核原基より皮質内を接線方向に移動する GABA 作動性介在神経細胞の前駆細胞を研究対象とし、スライス切片中の腹側基底核原基から急性単離した細胞に対しホールセルパッチクランプ

法を適用して、統合失調症発症脆弱性因子として知られている NRG1 の作用により活性化されるアニオンチャネル及び同時に抑制される外向整流性カリウムチャネルの種類を同定する予定であった。しかし、本年度は他大学研究者と共同で進めている他の研究課題の検討に追われ、それらのチャネルの種類を確定するに足るまでの検討を進めることができなかった。

一方で、昨年度末の日本解剖学会・日本生理学会合同大会にて、本研究代表者が主催したシンポジウム「神経発達制御機構研究の新たな潮流」が大変好評だったことを受け、本年度は *The Journal of Physiological Sciences* 誌の編集長からの依頼で総説執筆の機会を得て、出版することができた（雑誌論文）。本研究代表者は総説の責任著者としてシンポジウム各演者に分担執筆を依頼し、その一人として本研究代表者は、胎生期大脳皮質発達過程での神経細胞移動におけるイオンチャネルの役割について、特に細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) の役割を中心に、これまでの研究成果及び本研究課題での検討を基に議論を行った。また、イオンチャネルとともに、他の分担執筆者により議論された軸索誘導因子・細胞内情報伝達系・転写因子を介する神経系の発達制御機構が、循環系にも一部共通して認められることについても例示し、本研究課題の意義の 1 つである、全ての器官系の組織構築において普遍的に成り立つ細胞移動現象の基本作動原理を捉えなおす可能性についても議論した。

(3) 平成 28 年度も、大脳皮質形成期にあるマウス胎仔（妊娠 14 - 16 日目）終脳内の神経細胞のうち、腹側基底核原基より皮質内を接線方向に移動する GABA 作動性介在神経細胞の前駆細胞を研究対象とし、スライス切片中の腹側基底核原基から急性単離した細胞に対しホールセルパッチクランプ法を適用して、統合失調症発症脆弱性因子として知られている NRG1 の作用により活性化されるアニオンチャネル及び同時に抑制される外向整流性カリウムチャネルの種類を同定する予定であった。しかし、本年度は特に第 94 回日本生理学会大会（2017 年 3 月 28 - 30 日）の事務局長として 5 月頃から大会開催準備に追われ、また予想に反して大会運営協力業者の都合が多く、それを穴埋めするためにほとんど研究活動を行うことが出来なかった。

一方、その大会準備業務の合間を縫って、何とか 8 月末に佐賀で開かれた第 13 回 日韓脳科学・心筋・平滑筋合同シンポジウムに参加した際に、その関連講演会として学部学生・大学院生向けに、一研究者のこれまでの歩みとして、これまでの研究活動について講演を行う機会を得た（学会発表）。本研究代表者はその中の話題の一つとして、胎生期大脳皮質発達過程での神経細胞移動におけ

るイオンチャネルの役割について、特に細胞容積感受性外向整流性アニオンチャネル (VSOR) の役割を中心に、これまでの研究成果及び本研究課題での検討について紹介した。また、イオンチャネルとともに、軸索誘導因子・細胞内情報伝達系・転写因子を介する神経系の発達制御機構が、循環系にも一部共通して認められることについても例示し、本研究課題の意義の1つである、全ての器官系の組織構築において普遍的に成り立つ細胞移動現象の基本作動原理を捉えなおす可能性についても議論した。

(4) 最終年度(平成 29 年度)も引き続き、大脳皮質形成期にあるマウス胎仔(胎生 14 日目)終脳内の神経細胞のうち、腹側基底核原基より皮質に向かって移動中の GABA 作動性介在神経細胞の前駆細胞を研究対象とした。その前駆細胞の移動誘導因子であり、統合失調症発症脆弱性因子として知られている Nrg1 と、移動忌避因子である Semaphorin 3A (Sema3A) の作用により誘起される細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の有無を、ライブセルイメージング法により検討を行った。その結果、どちらの因子も有意に Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすことが判明した。Nrg1 による Ca^{2+} 濃度上昇については、作用直後に細胞膜の何らかの Ca^{2+} チャネルが開口し、細胞外からの Ca^{2+} 流入が起こることによることも判明した。一方、Sema3A による Ca^{2+} 濃度上昇は、作用後 1 - 2 分遅れて開始する傾向があり、 Ca^{2+} の起源については現在検討中である。

以上のことから、前年度までの検討で判明した、Nrg1 の作用により誘起される K^+ チャネルの抑制や陰イオンチャネルの活性化は、細胞内 Ca^{2+} シグナリングを介する可能性が示唆された。一方、Nrg1 とは相反する効果をもたらす Sema3A の作用についても、細胞内 Ca^{2+} シグナリングを介する可能性が示唆され、Nrg1 とは異なる Ca^{2+} 源が用いられていることが予想される。また、これらの異なる因子の作用が、どちらも Ca^{2+} シグナリングを介して起こるということは、それぞれの因子により最終的に活性化される機能蛋白分子が、 Ca^{2+} 源の極めて近傍に配置されており、開口した Ca^{2+} 源の種類の違いに応じて異なる機能蛋白が駆動されるような機序の存在を示唆している。今後の検討によりその機序を明確にすることは、 Ca^{2+} シグナリングの多様性の統合的な理解を進める上で、普遍的に重要である。

<引用文献>

Akita T & Okada Y. "Regulation of bradykinin-induced activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels by Ca^{2+} nanodomains in mouse astrocytes." , *The Journal of Physiology (London)* 589(16):3909-3927, 2011.
DOI:10.1113/jphysiol.2011.208173

Akita T, Fedorovich SV & Okada Y. " Ca^{2+} nanodomain-mediated component of swelling-induced volume-sensitive outwardly rectifying anion current triggered by autocrine action of ATP in mouse astrocytes." , *Cellular Physiology and Biochemistry* 28:1181-1190, 2011.
DOI:10.1159/000335867

Liu HT, Akita T, Shimizu T, Sabirov RZ & Okada Y. "Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels." , *The Journal of Physiology (London)* 587(10):2197-2209, 2009.
DOI:10.1113/jphysiol.2008.165084

Fukuda A, Nakanishi Y, Kumada T & Furukawa T. "Multimodal GABA_A receptor functions on cell development." , In *Comprehensive Developmental Neuroscience: Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections*, eds. Rubenstein JL & Rakic P, Elsevier, volume 2, pp. 921-939, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Akita T, Kumada T, Yoshihara S, Egea J & Yamagishi S. "Ion channels, guidance molecules, intracellular signaling and transcription factors regulating nervous and vascular system development." *The Journal of Physiological Sciences* 66(2):175-188, 2016. (査読有)
DOI:10.1007/s12576-015-0416-1

Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. "Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:4, 2015. (査読有) DOI:10.3389/fncel.2015.00004

Akita T & Okada Y. "Characteristics and roles of the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) anion channel in the central nervous system." *Neuroscience* 275:211-231, 2014. (査読有)
DOI:10.1016/j.neuroscience.2014.06.015

[学会発表](計3件)

秋田 天平、生理学者への歩み - カエル

の神経から遺伝子疾患に至るまで -、第
13 回日韓脳科学・心筋・平滑筋合同シン
ポジウム関連講演会（招待講演）、2016
年

Akita T, Furukawa T & Fukuda A. “ Roles
of volume-regulated anion channels
during neuronal migration in the
developing brain. ” 第 92 回日本生理
学会大会、2015 年

福田 敦夫、古川 智範、山田 順子、
秋田 天平、松島 芳隆、柳川 右千夫、
母体由来タウリンによるトニック GABAA
受容体刺激が胎仔脳の放射状細胞移動に
及ぼす影響、第 37 回日本神経科学大会、
2014 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

秋田 天平 (AKITA, Tenpei)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：0 0 5 2 2 2 0 2

(2)連携研究者

福田 敦夫 (FUKUDA, Atsuo)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：5 0 2 5 4 2 7 2