

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K06718

研究課題名(和文) ショウジョウバエ変性空胞形成・修復へのグリア細胞の関与と分子基盤

研究課題名(英文) Cellular and molecular basis of injury induced-vacuoles in Drosophila central nervous system

研究代表者

加藤 健太郎 (Kato, Kentaro)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：30733068

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)：脳を含む中枢神経系が損傷を受けた時には組織中に空胞が形成される。ショウジョウバエをモデルとして、このような空胞の形成と修復について解析した。これにより中枢神経系に存在するグリア細胞と神経細胞のうち、グリア細胞の障害が空胞形成に関与することを明らかにした。空胞形成に関わる遺伝子を同定し、この遺伝子の関与する仕組みにより、損傷時にはグリア細胞が特定の神経繊維の維持に貢献しているらしいことがわかった。さらに発現解析により損傷時のグリア細胞に関与する遺伝子群の候補を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系が損傷を受けた時に形成される空胞は神経機能障害の一因であると考えられている。一般的には、血管系の損傷に、もしくは直接的な損傷に起因する神経終末の脱落、膨張、細胞死が関与すると言われる。しかし、空胞の形成、修復とその影響に関しては十分に明らかになっていない。本研究は、より単純なショウジョウバエをモデルとして、空胞形成、修復の細胞基盤を整理、形成に関わる遺伝子の一部を同定した。また、損傷時におけるグリア細胞 - 神経細胞の相互作用に関与する候補遺伝子リストを得た。

研究成果の概要(英文)：In some animals, including humans, the central nervous system undergoes vacuolization upon injury. In this study, using *Drosophila melanogaster* as a model system, a dynamic process of formation and repair of such vacuoles in neuropils was studied. Time-lapse microscopy revealed that vacuoles developed upon injury in neuropils are formed by glial cells. A gene was identified as a regulator of the vacuole formation. This gene in glial cells is also likely to be required for supporting certain neural fibers in damaged neuropil, implying that a glial-neuron interaction contributes to the integrity of the neural tissue upon injury. In addition, a list of candidate genes that have a role in the glial-neuron interaction in response to injury was obtained by gene expression analyses.

研究分野：発生生物学

キーワード：グリア細胞 損傷応答 ショウジョウバエ 中枢神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞は中枢神経系の正常機能に貢献するだけでなく、神経細胞に異常が起きたときや中枢神経系が損傷を受けた時にも応答する。切断された神経繊維の再生抑制など、損傷からの再生、回復にグリア細胞が抑制的であることが示されてきたが、同時に損傷回復に大きく貢献することが明らかになりつつある。損傷に応答して、グリア細胞は性質を活性化し、形態を変える、増殖するなどにより、傷害を受けた細胞の除去によって二次損傷を抑制する、また炎症反応の防波堤としての役割などさまざまな機能を実行する。

変性空胞はヒトやラットの中枢神経系が損傷を受けたときに観察される病態の一つであり、神経機能阻害の一因であると考えられている。一般的には、物理的な細胞損傷とそれによる血管系の崩壊が引き起こす細胞死・神経終末の脱落・細胞の膨張が関与するとされている。ゆえに血管新生が空胞の形成・修復の鍵を握ると考えられている。一方で、グリア細胞由来神経栄養因子を発現するグリア細胞の移植による変性空胞の形成抑制と修復促進が報告されており、変性空胞形成とグリア細胞に何らかの関係があると推測される。しかしながら、空胞形成の形成、修復に関与する細胞、分子基盤、組織への影響については十分に解析されているとはいえない。

申請者はこれまでに、ショウジョウバエの中枢神経系において損傷時の空胞形成を見出している。幼虫の腹側神経索に物理的な損傷を与えると、ニューロピルに空胞が形成され、その後24時間程度で修復される。ショウジョウバエ中枢神経系には血管系は存在しないこと、ライブイメージングにより空胞へのグリア細胞質の侵入が観察されたこと、遺伝的操作によりグリア細胞の数を増やした個体では空胞の形成が抑制されること、形成された場合においても速やかに修復されることから、ショウジョウバエの中枢神経系における空胞形成と修復にはグリア細胞が関与すると示唆される。

2. 研究の目的

本研究ではショウジョウバエをモデルとして、グリア細胞に着目し、変性空胞とは何か、何に起因するのか、その修復とは何かを理解することを目的とする。変性空胞は神経細胞内に形成され、グリア細胞によって修復・除去されると仮説を立て、これをもとに実験を計画した。ショウジョウバエ中枢神経系損傷後における変性空胞形成と修復へのグリア細胞の関わりの細胞動態の解析を4D(3Dと時間)にて行い、基盤的な知識の集積を行う。さらに変性空胞の形成と修復における介在分子を神経グリア相互作用の見地からの探索をすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) グリア細胞と神経細胞の二重標識と遺伝子発現操作。各グリアサブタイプ、ポスト・プレシナプス、樹状突起などはGAL4/UAS発現システムとLexA/LexAop発現システムを組み合わせ、それぞれ緑色あるいは赤色蛍光色素によって同時に標識した。下記の損傷実験系と組み合わせ、それぞれの細胞要素の損傷への関わりを評価した。また、GAL4/UAS発現システムとtubGAL80[ts]の組み合わせにより、幼虫期中期特異的にmiRNAの発現による標的遺伝子の発現抑制などを行い、それぞれの遺伝子の関わりを評価した。

(2) 損傷実験とタイムラプス解析。上に記したように各要素を二重標識したショウジョウバエを用いた。3齢幼虫中期の幼虫から中枢神経系を摘出し、実体顕微鏡下にてタングステン針により腹側神経索に損傷を与え、培養液中にて24時間程度維持した。これらの試料の底面から上面までの蛍光画像取得を1時間おきに計24時間、共焦点顕微鏡により行った。もしくは、24時間後に固定し、共焦点顕微鏡により観察した。遺伝子の強制発現系と組み合わせた場合は摂氏30度、それ以外の場合は摂氏25度で実験を行った。

(3) 次世代シーケンスによる関連遺伝子の探索。標的とするグリアサブタイプの個数は一つの腹側神経索に100個以下であること、また損傷によってもさらに数を減らすことから、標的細胞を精製するのは難しい。そこで細胞種特異的ではなく、標的とするグリアサブタイプを遺伝操作した腹側神経索を対象とした。候補遺伝子を得ることを目的として次の六種類の条件を準備した。遺伝的操作を行わない遺伝型、標的グリアサブタイプの分化を抑制する遺伝型、同グリアサブタイプの増殖と分化を亢進させる遺伝型のそれぞれについて損傷ありとなしの試料を準備した。これらから得られた結果を複合的に解析した。

4. 研究成果

(1) 変性空胞とは何か、何に起因するのか、その修復とは何かを理解するために、タイムラプス解析を行った。中枢神経系のニューロピルに近接する三種類のグリアサブタイプ、また神経細胞の軸索、樹状突起、シナプス領域等のそれぞれ一つを緑色、もしくは赤色蛍光タンパク質により

標識し、グリア細胞と神経細胞要素を同時に観察した。この結果、ニューロピル中に観察される空胞は、主にグリアサブタイプ1が形態を変え神経細胞要素を押しつけることで形成されることが明らかになった。単一細胞のみの標識によるタイムラプス解析によっても同様の結果が得られた。これらのことから空胞形成はグリア細胞の障害であり、ネクローシス・プログラム細胞死に至らなかった場合に修復されると考えられる。次に空胞には何が関与するのかを明らかにするために、貪食やオートファジーとの関わりを検証した。空胞内にはリソソームやオートファゴソームは顕著には観察されないこと、これらの関連遺伝子の発現をグリアサブタイプ1で時期特異的に抑制しても空胞形成には影響しなかったことから、これらは変性空胞の形成には関与しないことが示唆された。グリア細胞内における空胞の役割については明らかにすることができなかったが、細胞の形態の制御に関わる遺伝子を時期特異的にグリアサブタイプ1で発現抑制したところ、それぞれ異なる遺伝子が損傷初期の形態変化と空胞形成・修復過程の形態変化に関与することを明らかにできた。一方の形態変化を抑制しても、他方の形態変化には影響が見られないことから、それぞれ独立的に制御されている過程であることが示唆された。

(2) 損傷の神経索への影響を明らかにすることを目的に、特定の中枢神経細胞を標識しタイムラプス解析を行った。この結果、単離培養した中枢神経系において、対象とした神経繊維では顕著な神経繊維の再生や伸長、また変性は見られないことがわかった。一方で、一部の神経繊維では defasciculation/refasciculation が観察されたが、これは空胞の形成と修復に関連した受動的な現象であるらしいことがわかった。グリアサブタイプ1と同様に、神経繊維中に空胞が形成される場合も見受けられたが、時間と共に修復されることが見出された。次に(1)で明らかにしたグリアサブタイプ1の変性空胞形成と修復の形態変化に関わる遺伝子の発現抑制を行い、その上で神経繊維の変化を観察した。この結果、発現操作をしない場合には顕著な変性が見られなかったにもかかわらず、特定の神経繊維では損傷によりワーラー変性様の神経変性が観察された。このことから、グリア細胞は少なくとも一部の神経繊維の損傷耐性に貢献していると示唆される。

(3) 変性空胞の形成と修復、また上記で明らかにできたようなグリア細胞-神経細胞の相互作用に関与する関連遺伝子の探索のために、発現解析を行った。特に損傷後のグリアサブタイプ1で発現が増加する遺伝子に着目した。損傷後のグリア細胞における発現量増加が既知であるいくつかの遺伝子の発現量と変動を基に解析し、ショウジョウバエの約14,000遺伝子から関与する遺伝子を約1300遺伝子まで絞り込んだ。これを基にDAVIDを用いてGene Ontology解析をしたところ、細胞形態制御、オートファジー、細胞死、細胞増殖、貪食に関連する遺伝子の濃縮が確認され、さらに神経発生、シナプス制御関連などの遺伝子の濃縮が認められた。また、Kegg-pathway解析では特定のシグナル伝達経路に関わる分子の濃縮が明らかになった。絞り込んだ遺伝子のうち、グリア細胞自身に働くものとして転写因子やシグナル伝達経路に関わる分子を、神経細胞へ働きかけるものとしてリガンドとして働く分子などを候補遺伝子とした。ショウジョウバエをモデルとして神経損傷におけるグリア細胞の増殖、貪食にかかわる分子・遺伝子について新しい知見が報告されてきているが、いまだ不明なことが多い。本研究で得られたグリア細胞に働く候補遺伝子についても今後さらに解析を進めることにより、損傷におけるグリア細胞の応答のさらなる理解に貢献できると期待される。本研究では、特にグリア細胞-神経細胞相互作用に焦点を定めてさらに研究を進めた。

(4) 上記(3)で得られた候補遺伝子からグリア細胞-神経細胞の相互作用に関する分子を同定することを目的に、神経繊維への損傷にばらつきが少ない新たな実験系を確立した。候補遺伝子に対するmiRNAを用いてグリア細胞での発現抑制を行い、神経繊維への影響を解析している。現在まで関連遺伝子の同定には至っていないが、この過程で、グリア細胞の損傷時の形態変化はグリア細胞の持つ特定の神経繊維に対する役割には必要がないことを示唆する結果が得られた。今後、解析を続け、グリア細胞-神経細胞相互作用に関与する分子の同定を目指す。グリア細胞による神経細胞・繊維の維持についてはまだ明らかでないことが多く、本研究を進展させることでこれに貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|