

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06743

研究課題名(和文) 光遺伝学を用いたアストロサイト機能改変 - 基底核回路の人為的制御の実現に向けて

研究課題名(英文) Targeted astrocytic functional modification using optogenetics - toward realization of artificial control of the basal ganglia circuit

研究代表者

辰巳 晃子 (Tatsumi, Kouko)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90208033

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)：我々は成熟脳内に特徴的な局在を示すアストロサイトの亜集団を見出し、これらの微細突起が脳基底核の淡蒼球において抑制性シナプスと三者間シナプスを構成する傾向があることを確認した。これは我々が見出したアストロサイトの亜集団が抑制性シナプスの情報伝達の制御に関わる可能性を示唆している。このアストロサイトの機能的意義を探るため、光遺伝学による人為的活性化を試みたが、光ファイバー挿入など侵襲性が高いためか動物行動実験での再現性が得られるには至らなかった。そこでDREADD法に切り替えたところ、アストロサイトの活性化は周辺の神経細胞の活性を誘導した。現在病態マウスを用いて、その再現性を確認している。

研究成果の概要(英文)：We found Olig2-lineage mature astrocytes (Olig2-AS) in the adult brain using Olig2CreER;YFP transgenic mice. They were found to be preferentially clustered in some adult brain nuclei. We made distribution map of Olig2-AS in the adult mouse brain, and compared the map with the distribution of GFAP-positive astrocytes (GFAP-AS) visualized in GFAPCre;YFP mice. Brain regions rich in Olig2-AS tended to lack GFAP-AS. Even within a single brain nucleus, Olig2-AS and GFAP-AS frequently occupied mutually exclusive territories. These findings strongly suggest that Olig2-AS is a subpopulation of astrocytes and that it differs from GFAP-AS in its distribution pattern and perhaps also in its function. Immunoelectron microscopic study showed that fine processes of Olig2-AS are preferentially associated with GABAergic terminals, suggesting they are involved in inhibitory neuronal transmission. We activated Olig2-AS in the globus pallidus by DREADD method, and observe the influence to neural activity.

研究分野：神経解剖学 細胞組織化学

キーワード：Olig2 アストロサイト GFAP DREADDシステム 淡蒼球

1. 研究開始当初の背景

大脳基底核は大脳皮質 - 基底核ループを形成し、運動調節、認知機能、動機づけや学習など様々な機能を担うとされている。その入力部である線条体では、GABA 作動性の中型有棘細胞が細胞全体の 9 割ほどを占め、運動を促進する直接路と運動を抑制する間接路に分かれて、その拮抗的なバランスによって運動発現が適切に制御される(図 1)。大脳基底核の変性疾患の代表であるパーキンソン病は、無動、寡動、安静時振戦などの運動症状がよく知られ、これは間接路が直接路に比して大きく活性化した状態であることが知られている。淡蒼球は間接路の中継核として重要な機能を担っており、この神経核が強く抑制されることが運動障害を引き起こす大きな要因のひとつと考えられている。

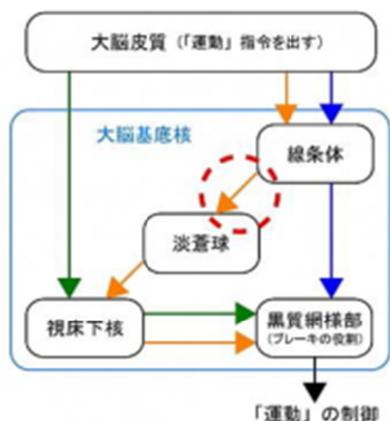


図1 大脳基底核回路 (直接路と間接路)

2. 研究の目的

従来、神経情報の伝達場所であるシナプスでは神経細胞であるシナプス前細胞からシナプス後細胞へ化学伝達物質を受け渡すことで情報伝達が完了するとされてきたが、近年、グリア細胞であるアストロサイトの微細な突起がシナプスを包み込み伝達物質の再取り込みやグリオトランスミッターの放出を通じて神経機能調節に関わっていることが明らかになった。つまりシナプス伝達はシナプス前細胞、シナプス後細胞に加え、アストロサイトをも含めた三者によって機能しているという「三つ組シナプス」と呼ぶ概念が確立された。

我々は helix-loop-helix 型の転写因子である Olig2 由来のアストロサイト(以下、Olig2-AS)が、淡蒼球に局在することを見出している。更にこのアストロサイトは運動負荷後にその形態を複雑に変化させること、そして GABA トランスポーター(GAT-3)を発現し自発運動負荷後にはその発現が増強することを私達は捉えてきた。これらの事から、淡蒼球の Olig2-AS が三つ組シナプスの場において GABA の uptake による神経伝達調節を行って運動制御に関わるとの仮説を立てた。非神経細胞であるアストロサイトの中でもひ

とつのサブタイプであると考えられる Olig2-AS に注目し、アストロサイトの視点から大脳基底核の機能・病態を論じ、大脳基底核神経回路の人為的制御の可能性に迫ることが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

これまでに我々は Olig2 プロモーター下に膜移行型 GFP を発現させるダブルトランスジェニックマウス(Olig2CreER; ROSA-EGFP)を用いて、成熟脳内における Olig2 の系譜細胞の動態に注目してきた。その過程で Olig2-AS の存在を見出し、それらが主に大脳基底核に局在する事に注目した。

(1) そこでこの Olig2-AS を人為的に操作する目的で、Olig2CreER マウスと掛け合わせるレポーターマウスを変更し、チャネルドプシン(ChR2)を発現するマウス(Olig2CreER; ROSA-ChR2-EYFP)、或いはハロドプシン(HR)を発現するマウス(Olig2CreER; ROSA-eNpHR3-EYFP)を作成し、オプトジェネティクス法による淡蒼球アストロサイトの機能変化を誘導する。Olig2-AS の活性化、または不活性化が神経細胞に与える影響を cFos の発現など免疫組織化学的に確認する。しかしアストロサイトは神経細胞と異なり、ChR2 による陽イオンの細胞内流入により細胞内 Ca イオンの上昇は簡単に起こらないことが想定されるので、レーザー光の強度、照射頻度、時間を変化させて動物の行動の変化を詳細に解析する。

(2) 淡蒼球の光刺激条件検討の結果を踏まえて、光刺激による Olig2-AS の活性亢進あるいは低下を促すことにより、パーキンソン病の運動症状を改善できるかどうか、行動試験により評価する。パーキンソン病モデルマウスは、片側の黒質緻密部にドーパミン神経毒(6-OHDA)を微量注入することで作成できる。黒質線条体路のドーパミン経路の変性により、同側の淡蒼球の活動は強く抑制され、左右の大脳基底核回路にアンバランスが生じることでマウスは損傷側への回転運動を行う。損傷側の淡蒼球アストロサイト活性化操作が神経細胞にどのような影響を与えたか、運動症状を改善できるかどうか免疫組織化学的、電気生理学的解析、そして行動評価により解析を行う。

4. 研究成果

(1) 長期タモキシフェン投与法(0.05%/粉末餌を連続 3 週間投与)により、ダブルトランスジェニックマウスの組み換え効率を大幅に増加することができた。このことで Olig2-AS が大脳基底核のみではなく成熟脳内のいくつかの神経核に局在することが明らかになった。免疫組織化学的、電子顕微鏡的解析によってもそれは明らかにアストロサイトの特徴を示したが、一般的なアストロサイトマーカーである GFAP の発現が非常に弱いという特徴を持つ事も明らかになった。

これは、Olig2-AS が成熟脳内において GFAP 陽性アストロサイト (GFAP-AS) と別のサブポピュレーションを構成する可能性を強く示唆している。そこで Olig2-AS の局在性を詳細に解析し、その分布マップを作成した。そして Olig2-AS が抑制性ニューロンの投射を受ける神経核に局在する傾向があることを見出し、免疫電子顕微鏡的解析により詳細な解析を行った。その結果、Olig2-AS が関わる三つ組シナプスは、vGluT1/2 を発現する興奮性シナプスより、vGAT 陽性の抑制性シナプスが有為に多いことを証明した。このことは、Olig2-AS が GABA の回収に特化することを示唆しており、「抑制性アストロサイト」との新しい概念を提示できた (Tatsumi et al., Front Neuroanat. 14;12:8. 2018)。

(2) オプトジェネティクスによるアストロサイトの操作に関しては、光の分散による標的細胞の不確実性、オプトファイバーの挿入による組織損傷それに伴うアストロサイトの活性化など、予想以上に条件設定が難航した。そこでまずダブルトランスジェニックマウスの使用をあきらめ、Olig2CreER マウスへアデノ随伴ウイルスによりタモキシフェン誘導性に Olig2 系譜細胞へ ChR2,HR を発現させる方法へ切り替えた。淡蒼球 Olig2-AS への標的化は成功したが、実験結果に再現性が乏しく、やはりオプトファイバーの挿入による組織損傷の影響が大きいものと考えられた。そこで、侵襲性のかなり低い方法としてアデノ随伴ウイルスによりデザイナー受容体を発現させ、クロザピン-N-オキシドによりこの受容体を活性、または抑制する方法 (DREADD 法) に切り替えることとした。タモキシフェン誘導性に受容体が効率よく発現する条件検討を行い、さらにアストロサイトにおけるクロザピン-N-オキシドの最適濃度や作用時間を検討した。現段階で、DREADD 法によりアストロサイトの活性を操作する報告は国内外でも少数であり、今後この分野での報告が増加すると考えられる。本研究では、DREADD 法により淡蒼球に局在する Olig2-AS の活性化させ、淡蒼球の神経細胞活性化できることを cFos の発現により確認できたことで、一定の成果を得たと考えられる。残念ながら期間中にマウスの行動評価の再現性を得るまでには至らなかったが、今後実験を重ねて成果を得るものと考えられる。

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3件)

Tatsumi K, Isonishi A, Yamasaki M, Kawabe Y, Morita-Takemura S, Nakahara K, Terada Y, Shinjo T, Okuda H, Tanaka T, Wanaka A. Olig2-Lineage Astrocytes: A Distinct Subtype of Astrocytes That

Differs from GFAP Astrocytes. Front Neuroanat. 2018 Feb 14;12:8. 査読あり

Tatsumi K, Okuda H, Morita-Takemura S, Tanaka T, Isonishi A, Shinjo T, Terada Y, Wanaka A. Voluntary Exercise Induces Astrocytic Structural Plasticity in the Globus Pallidus. Front Cell Neurosci. 2016 Jun 21;10:165 査読あり

Okuda H, Tatsumi K, Morita-Takemura S, Nakahara K, Nochioka K, Shinjo T, Terada Y, Wanaka A. Hedgehog signaling modulates the release of gliotransmitters from cultured cerebellar astrocytes. Neurochem Res. 2016 Feb;41(1-2):278-89 査読あり

[学会発表](計7件)

Kouko Tatsumi, Ayami Isonishi, Shoko Morita-Takemura, Tatsuhide Tanaka, Akio Wanaka Olig2-lineage cells constitute a subset of astrocytes in adult mouse brain. 第60回神経化学学会大会, 2017

Kouko Tatsumi, Ayami Isonishi, Shoko Morita-Takemura, Tatsuhide Tanaka, Akio Wanaka. Olig2-lineage astrocytes: A subtype of astrocytes differs from GFAP-positive astrocytes. ISN-ESN Meeting, 2017

Kouko Tatsumi, Hiroaki Okuda, Shoko Morita, Ayami Isonishi, Akio Wanaka Astrocytic structural changes correlate with overall running activities in the globus pallidus. 14th Annual Meeting of the Asia-Pacific society for Neuroscience. 2016

Kouko Tatsumi, Ayami Isonishi, Yoshie Kawabe, Hiroaki Okuda, Shoko Morita-takemura, Akio Wanaka The distribution of Olig2 lineage astrocytes in the normal adult mouse brain 第121回日本解剖学会総会, 2016

Kouko Tatsumi, Hiroaki Okuda, Shoko Morita, Akio Wanaka 成熟マウス脳における olig2 陽性アストロサイト 第38回日本神経科学大会, 2015

Kouko Tatsumi, Hiroaki Okuda, Shoko Morita, Akio Wanaka The characterization of Olig2 positive astrocytes in the normal adult forebrain. 第58回神経化学学会大会, 2015

Kouko Tatsumi, Hiroaki Okuda, Shoko Morita, Akio Wanaka The characterization of Olig2 positive astrocytes in the normal adult forebrain. 第120回日本解剖学会総会, 2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
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

6. 研究組織

(1)研究代表者

辰巳 晃子 (TATSUMI, Kouko)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90208033

(2)研究分担者

森田 晶子 (MORITA, Shoko)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70647049

(3)連携研究者

南部 篤 (NANBU, Atsushi)
生理学研究所・システム脳科学研究領
域・生体システム研究部門・教授
研究者番号：800180553

(4)研究協力者

()