

平成30年6月14日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14354

研究課題名(和文) グリア主導で神経回路活動は変更できるか？—三つ組みシナプス仮説の実証—

研究課題名(英文) Can glia modify the neuronal activities-proving "tripartite synapse theory"-

研究代表者

和中 明生 (Wanaka, Akio)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90210989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは三つ組みシナプスを構成して神経伝達に関わるが、アストロサイトを人為制御することで神経伝達を変化させるか否かについては未だ不明である。本研究では淡蒼球アストロサイトをモデルとしてこの現象を検討した。まず自発運動を付加したマウスではアストロサイトの微細突起の複雑性が増すこと、及びOlig2を発現するアストロサイトOlig2-ASとGFAPを発現するGFAP-ASの2種類があり相互排他的であることを見出した。これらのアストロサイトにDREADD法を用いて活性化した際に運動の変化(神経伝達の変化)が検出できたので、現在それぞれのアストロサイトに特異的な現象が否かを検証している。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes are known to form "Tripartite synapse" with pre-and post synaptic neuronal elements. The question we would like to address in the present study is "Does modification of astrocytic functions influence neuronal activity?" To this end, we checked ultrastructures of astrocytes before and after three-week voluntary exercise. After exercise, the fine processes of astrocytes increased their complexities, suggesting that astrocytes responded to increased neuronal activities. During this morphological study, we noticed that in the Globus Pallidus there are two distinct populations of astrocytes, one is Olig2-expressing astrocytes and another is GFAP-expressing astrocytes. These two populations distributed in a mutually-exclusive manner. We transfected M3Dq receptor, which can activate cells in the presence of designer drug, CNO (DREADD method). Using this method, we activated astrocytes in the Globus Pallidus and the mice were less active as compared to the control mice.

研究分野：神経解剖学、分子神経科学

キーワード：アストロサイト 三つ組みシナプス GFAP Olig2 DREADD法 自発運動

1. 研究開始当初の背景

近年、神経-グリア相互作用を中心に研究が大きく発展するにつれて、グリア細胞の神経系における機能の重要性が大きくクローズアップされてきている。しかしながら、その多くが神経細胞の機能が変化した場合のグリア細胞の変化に注目したものであり、言わば一方通行(神経からグリア)の議論がほとんどであった。グリア細胞の中でも特にアストロサイトは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、三つ組みシナプスという名称で呼ばれている。

2. 研究の目的

アストロサイトは「三つ組みシナプス」を通じて神経活動を制御していると考えられているが、実証例は少ない。本研究ではアストロサイトに GABA トランスポーター阻害剤、グリオトランスミッター代謝阻害剤などを投与することで自発運動にどのような影響が出るか、またアストロサイトにムスカリン受容体の変異体である M3Dq 或いは M4Di を発現させたトランスジェニックマウスを用いて、デザイナー薬剤刺激法 (DREADD) によりこれらアストロサイトを特異的に刺激、抑制することで自発運動にどのような影響が出るかを検討することでアストロサイトの機能改変による運動回路を制御できるか否かを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 淡蒼球アストロサイトの形態変化が神経入力に応じたものか否かを、運動負荷前後での淡蒼球でのシナプス数の定量により評価する。免疫電子顕微鏡法によりシナプスと GAT-3 陽性アストロサイト突起の関係も同時に評価する。

2) 定量的に両側淡蒼球にカニューレを挿入し、これを介してアストロサイト毒、GAT-3 阻害剤、アデノシン産生阻害剤を投与して同部位アストロサイトの機能を変化させた場合にマウスの全般行動 (Open field テストで評価) や淡蒼球神経細胞の電気活動を電気生理的に検出する。

3) 淡蒼球アストロサイトに特異的に薬剤が感受性チャネル分子である M3Dq 等を発現させたマウスを用いて、同部位アストロサイトを特異的に活性化、或いは不活化した場合の全般行動、自発運動を行動実験で、神経活動を電気生理的に検出する。これらの検討を通じて淡蒼球アストロサイトが脳基底核回路に果たす役割を明らかとする

4. 研究成果

まず淡蒼球における三つ組みシナプスの存在を形態学的に示すために、Olig2-CreER マウスと ROSA-Flox-GAP43-EGFP マウスを交配させたダブルトランスジェニックマウス (以下ダブル TG マウス) に運動負荷を与える実験を行った。具体的にはダブル TG マウスを 3 群に分けて、コントロール群は固定して回

らないランニングホイールを入れたケージ、ランナー群では回転可能なランニングホイールの入ったケージ、ランナー休息群も同様のケージに入れて 3 週間飼った。前 2 群はこの 3 週目で灌流固定し、淡蒼球における GFP 免疫組織化学染色を行った。ランナー休息群はさらに 3 週間今度は固定したランニングホイールの入ったケージで飼育し、その後灌流固定し免疫染色に供した。それぞれの群の GFP 陽性アストロサイトの形態をまずレーザー共焦点顕微鏡で比較検討し、顕微鏡画像上の蛍光量を NIH Image ソフトで定量し 3 群を比較した。ランナー群ではコントロールに比して有意に蛍光量が増大しており、またランナー休息群では減少傾向を認めた。さらにこれら 3 群の GFP 陽性細胞の微細構造を電子顕微鏡で観察し、電子顕微鏡画像における GFP 免疫陽性構造を NIH Image ソフトで定量評価した。レーザー共焦点顕微鏡の結果と良く一致して、コントロール群に比してランナー群では単位面積あたりの GFP 陽性の突起断片数が有意に増加しており、ランナー休息群ではコントロールと同じレベルにまで減少していた。いずれの群も GFP 陽性構造の面積は有意差は無かった。これらの結果はランニングという運動負荷に応じてアストロサイトが形態を複雑化させていること、また一度複雑化した構造も、運動負荷が無くなると再び単純な構造に復することを示唆している。これは神経活動とアストロサイトの形態変化が強調している、すなわち三つ組みシナプスの存在を強く示唆するものと考えられた。この形態解析を行っている過程で淡蒼球アストロサイトには Olig2 を発現するものと GFAP を発現するものの 2 種類があり、それらは相互排他的に存在する可能性が考えられた。そこで脳内各部位における両者の分布を詳細に比較検討した。Olig2-AS は主に基底核回路、視床、橋、延髄に分布し、GFAP のそれとは明らかに分布パターンが異なっていた。また Olig2-AS はグリア型 GABA トランスポーターである GAT-3 や小胞型 GABA トランスポーターである VGAT の分布と酷似していた。Olig2-AS の全般的な機能抑制を行うために、Olig2-AS 特異的に M3Dq 遺伝子を発現させた。この蛋白は人工的なりガンドである CNO を投与すると Gq 蛋白を介して細胞機能抑制がかかるものである。CNO 投与時と非投与時での主にマウスの四肢の動きをモニターする目的で透明なシリンダーに一定時間入れて前肢の動きをビデオ解析した。また運動評価としてグリッド上を歩行させてどれくらい足を踏み外すかの評価も行った。結果としては CNO 投与時に明らかに片側前肢の動きが正常よりも抑制されていることが明らかとなった。本研究の開始時には Olig2-AS の人為的機能操作を光感受性チャネルであるチャネロドプシンやハロドプシンで行うことを計画していたが、実際に計画を遂行する過程で光遺伝子操作よりもより長期

に細胞機能の人為操作を行うことができる DREADD 法がより目的に合致していることが分かって、特に本年度はその方法を採用して一定の成果が得られている。さらに本年度の分布解析から、Olig2-AS は GABA 作動性の伝達を特異的に調節している可能性があるため、今後の計画として Olig2-AS 特異的に GAT-3 のノックダウンを行う系を確立し、機能解析を行う予定である。

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 16 件)

Shinjo T, Tanaka T, Okuda H, Kawaguchi AT, Oh-Hashi K, Terada Y, Isonishi A, Morita-Takemura S, Tatsumi K, Kawaguchi M, Wanaka A. Propofol induces nuclear localization of Nrf2 under conditions of oxidative stress in cardiac H9c2 cells. PLoS One. 2018 Apr 24;13(4):e0196191. doi: 10.1371/journal.pone.0196191. eCollection 2018. PubMed PMID: 29689082; PubMed Central PMCID: PMC5915683.

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. doi: 10.3389/fnana.2018.00008. eCollection 2018. PubMed PMID: 29497365; PubMed Central PMCID: PMC5819569.

Makinodan M, Okumura K, Ikawa D, Yamashita Y, Yamamuro K, Toritsuka M, Kimoto S, Yamauchi T, Komori T, Kayashima Y, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Effects of cross-rearing with social peers on myelination in the medial prefrontal cortex of a mouse model with autism spectrum disorder. Heliyon. 2017 Dec 1;3(11):e00468. doi: 10.1016/j.heliyon.2017.e00468. eCollection 2017 Nov. PubMed PMID: 29234739; PubMed Central PMCID: PMC5717317.

Tanaka T, Murakami K, Bando Y, Nomura T, Isonishi A, Morita-Takemura S, Tatsumi K, Wanaka A, Yoshida S. Microglia support ATF3-positive neurons following hypoglossal nerve axotomy. Neurochem Int. 2017

Sep;108:332-342.

doi:10.1016/j.neuint.2017.05.007.

Epub 2017 May 15. PubMed PMID: 28522413.

Makinodan M, Ikawa D, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Yamauchi T, Okumura K, Komori T, Fukami SI, Yoshino H, Kanba S, Wanaka A, Kishimoto T. Effects of the mode of re-socialization after juvenile social isolation on medial prefrontal cortex myelination and function. Sci Rep. 2017 Jul 14;7(1):5481. doi: 10.1038/s41598-017-05632-2. PubMed PMID: 28710465; PubMed Central PMCID: PMC5511224.

Ouji Y, Sakagami M, Omori H, Higashiyama S, Kawai N, Kitahara T, Wanaka A, Yoshikawa M. Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from mouse ES cells using combination of Math1 transfection and conditioned medium from ST2 stromal cells. Stem Cell Res. 2017 Aug;23:50-56. doi: 10.1016/j.scr.2017.06.013. Epub 2017 Jul 1. PubMed PMID: 28689068.

Manabe T, Wanaka A. Regulation and/or Repression of Cholinergic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells Using RNAi Directed Against Transcription Factor L3/Lhx8. Methods Mol Biol. 2017;1622:101-109. doi:10.1007/978-1-4939-7108-4_8. PubMed PMID: 28674804.

Kayashima Y, Yamamuro K, Makinodan M, Nakanishi Y, Wanaka A, Kishimoto T. Effects of Canon chord progression on brain activity and motivation are dependent on subjective feelings, not the chord progression per se. Neuropsychiatr Dis Treat. 2017 Jun 12;13:1499-1508. doi: 10.2147/NDT.S136815. eCollection 2017. PubMed PMID: 28652751; PubMed Central PMCID: PMC5476716.

Ikawa D, Makinodan M, Iwata K, Ohgidani M, Kato TA, Yamashita Y, Yamamuro K, Kimoto S, Toritsuka M, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Okumura K, Tanaka T, Wanaka A, Owada Y,

Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya K, Mori N, Hashimoto R, Matsuzaki H, Kanba S, Kishimoto T. Microglia-derived neuregulin expression in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun*. 2017 Mar;61:375-385.

doi:10.1016/j.bbi.2017.01.003. Epub 2017 Jan 10. PubMed PMID: 28089559.

Makinodan M, Ikawa D, Miyamoto Y, Yamauchi J, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Social isolation impairs remyelination in mice through modulation of IL-6. *FASEB J*. 2016 Dec;30(12):4267-4274. Epub 2016 Sep 9. PubMed PMID: 27613805.

Morita-Takemura S, Nakahara K, Tatsumi K, Okuda H, Tanaka T, Isonishi A, Wanaka A. Changes in endothelial cell proliferation and vascular permeability after systemic lipopolysaccharide administration in the subfornical organ. *J Neuroimmunol*. 2016 Sep 15;298:132-7. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.06.011. Epub 2016 Jul 1. PubMed PMID: 27609286.

Takahashi H, Ogawa Y, Yoshihara S, Asahina R, Kinoshita M, Kitano T, Kitsuki M, Tatsumi K, Okuda M, Tatsumi K, Wanaka A, Hirai H, Stern PL, Tsuboi A. A Subtype of Olfactory Bulb Interneurons Is Required for Odor Detection and Discrimination Behaviors. *J Neurosci*. 2016 Aug 3;36(31):8210-27. doi:10.1523/JNEUROSCI.2783-15.2016. PubMed PMID: 27488640.

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. doi:10.3389/fncel.2016.00165.eCollection 2016. PubMed PMID: 27445692; PubMed Central PMCID: PMC4914586.

Nochioka K, Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Ogata N, Wanaka A. Hedgehog Signaling Components Are Expressed in Choroidal Neovascularization in Laser-induced Retinal Lesion. *Acta*

Histochem Cytochem. 2016 Apr 28;49(2):67-74. doi: 10.1267/ahc.15036. Epub 2016 Apr 9. PubMed PMID: 27239075; PubMed Central PMCID: PMC4858541.

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. doi:10.1007/s11064-015-1791-y. Epub 2015 Dec 22. PubMed PMID: 26694649.

Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, Miyata S. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res*. 2016 Feb;363(2):497-511. doi: 10.1007/s00441-015-2207-7. Epub 2015 Jun 6. PubMed PMID:26048259.

[学会発表](計12件)

河邊良枝、田中達英、石西綾美、森田-竹村晶子、中原一貴、辰巳晃子、和中明生 Multiplex staining法を用いた脳梁内数珠状グリア細胞の免疫組織化学的解析 第123回日本解剖学会総会 2018年3月27日 於 武蔵野市

辰巳晃子、石西綾美、河邊良枝、森田-竹村晶子、中原一貴、田中達英、和中明生 FACS解析による成熟脳に存在するOlig2系譜アストロサイトの分離 第123回日本解剖学会総会 2018年3月27日 於 武蔵野市

森田-竹村晶子、中原一貴、長谷川-石井さなえ、石西綾美、辰巳晃子、奥田洋明、田中達英、和中明生 脳弓下器官のIL-1産生における血管周囲マクロファージ様細胞の役割 第123回日本解剖学会総会 2018年3月27日 於 武蔵野市

Tatsuhide Tanaka, Koichi Murakami, Yoshio Bando, Taichi Nomura, Ayami Isonishi, Shoko Morita-Takemura, Kouko Tatsumi, Akio Wanaka, Shigetaka Yoshida Microglia support ATF3-positive neurons following hypoglossal nerve axotomy 第60回日本神経化学会大会 2017年9月8日 於 仙台市

Kouko Tatsumi, Ayami Isonishi, Shoko Morita-Takemura, Tatsuhide Tanaka, Akio Wanaka Olig2-lineage astrocytes comprises a subpopulation of astrocytes distinct from GFAP-positive ones in the adult mouse brain. 第60回日本神経化学会大会 2017年9月8日 於 仙台市

森田一竹村晶子
弓状核及び正中隆起における血中物質の到達と血管構築変化 第122回日本解剖学会総会 2017年3月30日 於 長崎市

田中達英 運動神経損傷後の神経細胞体周囲に集積するミクログリアの機能 第122回日本解剖学会総会 2017年3月30日 於 長崎市

Tatsumi K, Okuda H, Takemura SM, Tanaka T, Isonishi A, Wanaka A Astrocytic structural changes correlate with overall running activities in the globus pallidus 第14回 アジア太平洋神経化学会議(国際学会) 2016年08月27日 於 マレーシア、クアラルンプール市

辰巳晃子、奥田洋明、森田晶子、和中明生 Characterization of Olig2 positive astrocytes in the normal adult forebrain 第58回日本神経化学会大会 2015年09月12日 於 埼玉県大宮市

辰巳晃子、奥田洋明、森田晶子、和中明生 Characterization of Olig2 positive astrocytes in the normal adult forebrain 第58回日本神経化学会大会 2015年09月12日 於 埼玉県大宮市

奥田洋明、辰巳晃子、森田晶子、和中明生 Hedgehog signaling modulates the release of gliotransmitters from cultured cerebellar astrocytes. 第58回日本神経化学会大会 2015年09月13日 於 埼玉県大宮市

Akio Wanaka, Hiroaki Okuda, Kouko Tatsumi, Shoko Morita Astrocytic chondroitin sulfate proteoglycan in brain injury and in glutamate uptake functions 第25回国際神経化学会大会(国際学会) 2015年08月25日~2015年08月27日 於 オーストラリア ケアンズ市

〔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

和中 明生 (WANAKA, Akio)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：90210989

(2) 研究分担者

奥田 洋明 (OKUDA, Hiroaki)
金沢大学・医学部・准教授
研究者番号：40453162

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 (NAMBU, Atsushi)
生理学研究所・システム脳科学研究領域・教授
研究者番号：80180553

(4) 研究協力者

()