

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K01974

研究課題名（和文）アストロサイト由来てんかん重積誘発因子の解明

研究課題名（英文）An astrocytic factor related to seizure susceptibility

研究代表者

繁富 英治（Shigetomi, Eiji）

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：00631061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：アストロサイトのCa²⁺シグナルにおいてP2Y₁受容体は中心的な役割を果たす。このP2Y₁受容体をアストロサイト選択的に過剰発現するマウスは、薬物誘発てんかん発作に対する易感受性を示す。このマウスを用いて、てんかん易感受性の原因となるメカニズムを、イメージング、電気生理学、遺伝子発現の解析を行ったところ、新規アストロサイト興奮性シグナル分子を介したニューロン-アストロサイト間の双方向性情報伝達の亢進がその原因となる可能性を見出した。見出された新規アストロサイト興奮性シグナル分子はアストロサイトに豊富に存在し、神経過興奮を示す様々な病態に寄与するシグナル分子の可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で見出されたP2Y₁受容体シグナリングは、新規興奮性シグナル分子を介したシナプス制御機構であり、この点において学術的意義がある。アストロサイトの機能変調が様々な中枢神経系疾患で報告されてきており、その疾患メカニズムを明らかにする上でアストロサイトの役割を明らかにすることは重要な課題の1つとなっている。この新規興奮性シグナルはてんかんのみならず神経過興奮を伴う様々な疾患に寄与する可能性があり、治療法の確立していない中枢神経系疾患の治療法開発に資する知見を与える点において社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：P2Y₁ receptor plays a central role in Ca²⁺ signals in astrocytes. Astrocytes upregulate P2Y₁ receptors in neurological disease such as epilepsy. Overexpression of astrocytic P2Y₁ receptor increases susceptibility to drug-induced status epilepticus. To understand the underlying mechanisms, we performed start-of-art imaging, electrophysiology, and transcriptome analysis of astrocytes and found that the overexpression of astrocytic P2Y₁ receptor led to enhancement of bidirectional communications between neurons and astrocytes through a novel excitatory signal derived from astrocytes. The novel excitatory signal of astrocytes is enriched in astrocytes and may be involved in disease pathogenesis in which neurons exhibit hyperexcitability.

研究分野：神経薬理学・神経化学・神経科学

キーワード：アストロサイト てんかん カルシウムシグナル P2Y₁受容体 てんかん重積 海馬 カルシウム感受性タンパク質 神経過興奮

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の異常放電によって起こるてんかん発作において、アストロサイト機能の寄与が指摘されている^{1,2}。アストロサイトはCa²⁺の濃度変化により興奮性する細胞で、病態時において様々なCa²⁺シグナルを示す。てんかん病態においてアストロサイトのCa²⁺シグナルが増加し、これがてんかん発作を増悪させる可能性が指摘されている¹。P2Y1受容体シグナルはアストロサイトのCa²⁺シグナルの発生において中心的な役割を果たし³、てんかん重積モデルにおいて増加する⁴。しかし、そのてんかん病態における意義は不明なままであった。

我々は、マウスのアストロサイト特異的にP2Y1受容体を過剰発現させると、薬剤誘発てんかん重積の感受性増加及びてんかん病態で見られる神経過興奮を惹起することを見出した。このマウスでは、神経活動に依存しない、アストロサイトの細胞全体に広がる異常なCa²⁺シグナルが発生するが、劇的な形態学的変化を示す反応性アストロサイトの所見はなかった。以上の事実は、アストロサイトの機能異常がてんかん病態に積極的に寄与することを示す。アストロサイトにおけるP2Y1受容体を介したCa²⁺シグナルの増加のみでは、神経活動の顕著な増加及びてんかん重積は観察されないため、なぜアストロサイトのP2Y1受容体を介したCa²⁺シグナル増加が、ピロカルピン誘発てんかん重積増加に繋がるのか？アストロサイト由来の何らかの因子がてんかん重積誘発し、増悪化している可能性がある。本研究は、「アストロサイト由来てんかん重積誘発因子」を見出すことを目的とするため、アストロサイト特異的P2Y1受容体過剰発現マウスを用いたイメージング及び遺伝子発現解析を中心とした検討を計画した。反応性アストロサイトの所見を伴うてんかんモデル動物では、多数の変動遺伝子が想定される⁵が、アストロサイト特異的P2Y1受容体過剰発現マウスは、反応性アストロサイト様の変化を示さないことから、比較的少ない変動遺伝子がてんかん重積の感受性亢進が起こっていると考えられたことから、「アストロサイト由来てんかん重積因子」を見出す上で利点となると考えられた。

2. 研究の目的

神経細胞の異常な放電によって起こるてんかん発作のメカニズムとして神経細胞の興奮性にかかわるイオンチャネルの異常やシナプス伝達の異常が指摘されている。これに加えて、非神経細胞であるグリア細胞がてんかん発作並びにてんかん原生などのてんかん病態に積極的に寄与することが示されつつある。我々は、グリア細胞の1種であるアストロサイトがてんかん病態形成における重要な役割を果たすことを示してきた⁶。この研究と並行して、アストロサイトのCa²⁺シグナルにおいて中心的な役割を果たす分子P2Y1受容体に着目して、その機能的意義を解析する過程で、アストロサイト特異的P2Y1受容体過剰発現マウス(P2Y1OE)はてんかん重積の易感受性を示す事実を見出した。このことから、アストロサイトP2Y1受容体過剰発現はアストロサイトの機能異常を介することでてんかん重積易感受性を引き起こすという仮説立てた。この仮説を検証するため、このマウスを用いて、イメージング、電気生理学、遺伝子発現解析を行うことにより、てんかん発作を制御するアストロサイト由来因子を見出すことが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

AAV マイクロインジェクション

アストロサイトおよびニューロンの活動を併発的に同時に計測するために、緑色と赤色の異なる蛍光を発するCa²⁺感受性蛍光タンパク(GCaMP6f及びjRGECO1a)を、アストロサイト特異的プロモーター(GfaABC1D)制御下にアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて導入した。麻酔したマウスを脳定位固定装置に保持し、海馬CA1領域にAAVを注入した⁷。細胞外グルタミン酸レベルの検出にはAAVを用いてiGluSnFrをアストロサイトに導入した。

二光子励起レーザー顕微鏡イメージング

AAV注入3-4週間後に急性脳スライス標本を作成し、二光子励起顕微鏡下においてGCaMP6f発現アストロサイトとjRGECO1a発現ニューロンのCa²⁺シグナルを同時イメージングした。GCaMP6fは920nmでjRGECO1aは1200nmの波長のレーザーを用いて励起した。イメージングはCA1領域の錐体細胞層及び放線状層を含む視野において行った。シャーファー側枝を電気刺激して誘発されるCa²⁺シグナルを可視化した。iGluSnFRは920nmの波長のレーザーで励起して、Ca²⁺と同様の領域においてイメージングを実施した。試薬は灌流投与した。一部の試薬については、95%O₂/5%CO₂を通気しながらインキュベーションして処置した。

アストロサイト RNA-seq

P2Y1受容体過剰発現によって変動するアストロサイト因子を見出すため、マウスからアストロサイトを単離して、そのRNAを用いたRNA-seq解析を行った。申請時には大脳皮質及び海馬を含む組織のアストロサイトを利用する予定であったが、アストロサイトの遺伝子発現に脳領域特異性があることが判明したため^{8,9}、イメージング実験を行った海馬組織に限定した解析を行

った。アストロサイトは磁気活性化細胞分離法を用いて単離した。RNA を定法に従って単離し、BGI JAPAN の解析サービスを利用して RNA-seq を実施した。

免疫組織化学法

アストロサイト由来てんかん重積因子の候補分子の発現を評価するために、免疫組織化学法を実施した。定法に従い、マウス脳を 4%PFA により固定し、凍結切片を作成し、蛍光標識二次抗体を用いた免疫染色法を実施した。コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いて染色した切片の画像を取得した。

In vivo 電気生理学的計測

海馬における局所電位変化を計測するために、脳定位固定下に海馬 CA1 領域近傍に双極電極を留置し、生体アンプを用いて電気活動を計測した。記録は手術 1 週間後に実施した。

スライスパッチクランプ法

ニューロンの発火特性を計測するために、急性脳スライス標本を用いたパッチクランプ法を実施した。膜電流固定下に、歯状回顆粒細胞から脱分極パルスによって生じる活動電位を記録・定量した。

4. 研究成果

アストロサイト P2Y1 受容体発現マウスにおける神経活動の解析

P2Y1OE マウスは、ピロカルピン誘発てんかん重積発作の感受性が増加していたことから、神経過興奮することが示唆された。これを電気生理学的に検証するために、*in vivo* 電気生理学的記録を行ったところ、P2Y1OE マウスにおいて有意に異常なスパイク活動が計測された。個々の神経細胞の活動について調べるため、脳スライス標本を作成し、歯状回顆粒細胞の発火特性を検証したところ、P2Y1OE マウスにおいて有意に発火頻度が増加した。これらの事実は P2Y1OE により神経過興奮が生じる可能性を示唆した。

アストロサイト P2Y1 受容体発現マウスにおけるニューロン-アストロサイト情報伝達の亢進

P2Y1OE が神経の興奮性を上昇させる細胞メカニズムを明らかにする目的で、アストロサイト及び神経細胞に異なる色の Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質を発現させて二光子励起レーザー顕微鏡下にこれら 2 種の細胞活動の同時 Ca^{2+} イメージング (Dual color Ca^{2+} imaging) を、海馬 CA1 領域を含む急性脳スライス標本を用いて行った。シャーフアー側枝の電気刺激によって最初に速い Ca^{2+} 応答がニューロンにおいて観察された。このニューロンの応答に続いて、P2Y1OE のアストロサイトにおいて遅延性の大きな Ca^{2+} 応答が観察された。コントロールマウスでは、このアストロサイトにおける遅延性 Ca^{2+} 応答は殆ど観察されなかった。P2Y1OE マウスにおいて、ニューロンの Ca^{2+} 応答は延長、すなわち、 Ca^{2+} 応答の増強が観察された。このニューロンの Ca^{2+} 応答の増強並びにアストロサイトにおける遅延性 Ca^{2+} 応答は、P2Y1 受容体の薬理的遮断により消失した。一方、コントロールでは P2Y1 受容体の薬理的遮断のニューロン応答への影響は観察されなかった。このことから、P2Y1OE において、ニューロンからアストロサイトへの情報伝達並びにアストロサイトからニューロンへの情報伝達が共に増強されており、これらはアストロサイトの P2Y1 受容体活性化を介することが示された。P2Y1OE において、AMPA/KA 及び NMDA 受容体遮断は、ニューロンの Ca^{2+} 応答を消失させたが、アストロサイトの Ca^{2+} 応答は残存した。また、アストロサイトのグルタミン酸シグナルに寄与するとされる mGluR5 及び mGluR2/3 受容体遮断は、ニューロンおよびアストロサイトの Ca^{2+} 応答のいずれにも大きな影響を及ぼさなかった。以上より、ニューロンからアストロサイトへの情報伝達の増強は、ニューロンから放出された ATP もしくは ADP を介すると考えられた。

アストロサイト P2Y1 受容体過剰発現によって誘発されるニューロン活動亢進メカニズムの解析

P2Y1OE で観察されるアストロサイトからニューロンへの情報伝達に関わる因子として、グルタミン酸の寄与が多く報告されている。グルタミン酸センサータンパク質を用いたイメージングを行い、シャーフアー側枝刺激誘発グルタミン酸を可視化したところ、P2Y1OE では刺激誘発グルタミン酸放出が増加することが見出された。このことから、アストロサイトの P2Y1 受容体依存的な Ca^{2+} 応答がニューロン活動を延長・増強する原因として、アストロサイトを介したグルタミン酸放出増加の可能性が示唆されたが、Dual color Ca^{2+} imaging とグルタミン酸イメージングデータの詳細な時空間解析により、グルタミン酸動態と Ca^{2+} 動態には時間的乖離があることが判明し、グルタミン酸放出増加を起こすメカニズムはアストロサイト由来のグルタミン酸放出を介するのではなく別の因子を介する可能性が示唆された。

この別の因子を探索するため、海馬アストロサイトから RNA を抽出し RNA-seq を行ったところ、P2Y1OE において有意に発現増加及び低下する分子を見出した。発現増加する 1 つの分子 X について詳細に検討したところ、この分子 X が、P2Y1OE のアストロサイトにおいて発現増加していることが免疫組織化学法により示された。この分子 X は CA1 領域及び歯状回領域のアストロサイトにおいて確認された。この分子 X が、P2Y1OE においてニューロンの Ca^{2+} 応答の増強に寄与するかを検証するため、この分子 X の中和抗体を処置したところニューロンの Ca^{2+} 応

答が減弱することが示された。P2Y1OE によって誘発されるてんかん易感受性において、この分子 X の必要性を検証するために、ゲノム編集技術に基づいてアストロサイト選択的に候補分子を欠損させる AAV を作出し、これの有用性を評価した。

本研究課題によりアストロサイトに由来する神経興奮性シグナル X を見出した。今後、この分子 X をアストロサイト選択的に欠損させることでこの分子 X が「アストロサイト由来てんかん重積因子」となり得るかを検証し、得られた成果をまとめて論文として公表する。アルツハイマー病などの神経疾患のモデル動物では、神経過興奮とアストロサイト P2Y1 受容体の発現上昇が共に起こる。今回見出した分子 X がほかの病態においても共通した神経興奮性増大因子である可能性もあり、これについては今後の検討課題としたい。

引用文献

- 1 Wetherington, J., Serrano, G. & Dingledine, R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* **58**, 168-178, doi:10.1016/j.neuron.2008.04.002 (2008).
- 2 Robel, S. & Sontheimer, H. Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nat Neurosci* **19**, 28-33, doi:10.1038/nn.4184 (2015).
- 3 Koizumi, S. Synchronization of Ca²⁺ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J* **277**, 286-292, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07438.x (2010).
- 4 Alvarez-Ferradas, C. *et al.* Enhanced astroglial Ca²⁺ signaling increases excitatory synaptic strength in the epileptic brain. *Glia* **63**, 1507-1521, doi:10.1002/glia.22817 (2015).
- 5 Zamanian, J. L. *et al.* Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* **32**, 6391-6410, doi:10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012 (2012).
- 6 Sano, F. *et al.* Reactive astrocyte-driven epileptogenesis is induced by microglia initially activated following status epilepticus. *JCI Insight* **6**, doi:10.1172/jci.insight.135391 (2021).
- 7 Shigetomi, E., Hirayama, Y. J., Ikenaka, K., Tanaka, K. F. & Koizumi, S. Role of Purinergic Receptor P2Y1 in Spatiotemporal Ca⁽²⁺⁾ Dynamics in Astrocytes. *J Neurosci* **38**, 1383-1395, doi:10.1523/JNEUROSCI.2625-17.2017 (2018).
- 8 Chai, H. *et al.* Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* **95**, 531-549 e539, doi:10.1016/j.neuron.2017.06.029 (2017).
- 9 John Lin, C. C. *et al.* Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat Neurosci* **20**, 396-405, doi:10.1038/nn.4493 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 佐野史和, 繁富英治, 小泉修一.	4. 巻 93
2. 論文標題 グリア性てんかん原生のメカニズム.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 441-446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 繁富英治, 小泉修一	4. 巻 37
2. 論文標題 グリア ニューロン間情報発信・受信イメージング技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 182-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eiji Shigetomi, Kozo Saito, Fumikazu Sano, Schuichi Koizumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Aberrant Calcium Signals in Reactive Astrocytes: A Key Process in Neurological Disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shigetomi E, Hirayama YJ, Ikenaka K, Tanaka KF, Koizumi S.	4. 巻 38
2. 論文標題 Role of Purinergic Receptor P2Y1 in Spatiotemporal Ca ²⁺ Dynamics in Astrocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1053-1067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2625-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 繁富英治, 小泉修一.
2. 発表標題 Gqタンパク質受容体を介したアストロサイト ニューロン間情報処理メカニズム.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 繁富英治, 小泉修一.
2. 発表標題 グリア研究による脳疾患の解明と創薬を目指して～アストロサイトに魅せられて～.
3. 学会等名 第13回日本薬学会関東支部若手シンポジウム.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木秀明, 繁富英治, 平山幸歩, 佐野史和, 田中謙二, 尾藤晴彦, 小泉修一.
2. 発表標題 アストロサイトP2Y1受容体を介したニューロン興奮性制御.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木秀明, 繁富英治, 平山幸歩, 佐野史和, 田中謙二, 尾藤晴彦, 小泉修一.
2. 発表標題 P2Y1受容体を介したニューロン-アストロサイト-ミクログリア間情報処理機構.
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Yukiho J Hirayama, Kazuhiro Ikenaka, Kenji F Tanaka, Haruhiko Bito, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Dynamic feature of bidirectional communication between neurons and astrocytes
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 繁富英治、齋藤光象、小泉修一
2. 発表標題 アストロサイトの異常カルシウムシグナルとその病態生理学的意義
3. 学会等名 第140回薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 繁富英治、平山幸歩、佐野史和、田中謙二、尾藤晴彦、小泉修一
2. 発表標題 アストロサイトGqPCRシグナルを介した神経過興奮
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Multi-modal imaging of astrocyte-neuron communication
3. 学会等名 2nd Mini-Symposium on The Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Yukiho J Hirayama, Kazuhiro Ikenaka, Kenji F Tanaka, Haruhiko Bito, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Dual color Ca ²⁺ imaging of neuron-astrocyte interaction
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 繁富英治、小泉修一
2. 発表標題 アストロサイト - ニューロン間双方向性情報伝達の可視化
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Yukiho J Hirayama, Kazuhiro Ikenaka, Kenji F Tanaka, Haruhiko Bito, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Visualization of spatiotemporal interaction of neurons and astrocytes
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 繁富英治、小林憲司、齋藤光象、小泉修一
2. 発表標題 アレキサンダー病モデルにおけるミクログリアの役割
3. 学会等名 第61回日本神経化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Discovery of novel calcium signals of astrocytes in health and disease
3. 学会等名 The second international symposium for frontend brain science of the University of Yamanashi (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 繁富英治、齋藤光象、小泉修一
2. 発表標題 活性化アストロサイトにおけるCa ²⁺ シグナルの病態生理学的意義
3. 学会等名 平成30年度生理研研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Yukiho Hirayama, Fumikazu Sano, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 When do astrocytes listen to ATP derived from neurons?
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 繁富英治、平山幸歩、小泉修一
2. 発表標題 アストロサイト微細突起Ca ²⁺ シグナルにおけるP2Y ₁ 受容体の役割
3. 学会等名 第137回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yukiho Hirayama, Eiji Shigetomi, Kenji F Tanaka, Kazuhiro Ikenaka, Haruhiko Bito, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Visualization of spatiotemporal relationship between neurons and astrocytes
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関