

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 B  
研究期間：2006～2008  
課題番号：18700373  
研究課題名（和文）アストロサイトエストロゲン膜受容体を介したエストロゲンの脳神経機能調節機構の解明  
研究課題名（英文）Study of the involvement of astrocyte mERs in brain functions  
研究代表者  
佐藤 薫 (SATO KAORU)  
国立医薬品食品衛生研究所薬理部・第一室長  
研究者番号：10311391

## 研究成果の概要：

アストロサイト $\alpha$ タイプエストロゲン膜受容体 (mER $\alpha$ ) によるアストロサイト機能調節メカニズムとして、一酸化窒素産生を含む詳細な経路を明らかにした。また、mER $\alpha$  機能の検討に必要な特異的リガンドを探索し候補化合物を見いだした。さらに、nER $\alpha$  と mER $\alpha$  の一分子イメージングに成功した。この技術は、受容体全分子とリガンドとの interaction をイメージング出来る点でこれまでより進んだリガンド開発技術として応用可能である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 19 年度	1,000,000	0	1,000,000
平成 20 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：神経機能の可塑性, エストロゲン, アストロサイト, 膜受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、脳神経系の機能、構造に対してエストロゲンが多様な作用を持つことが明らかになりつつある。いわゆる古典的核受容体である nER $\alpha$ , nER $\beta$  を介した遺伝子発現の他、未だクローニングはなされていないものの、エストロゲンが膜上に存在する受容体 mERs に結合し、遺伝子発現とは異なる情報伝達経路を活性化することにより極めて短時間のうちに作用を呈することがわかってきた。我々はこれまでに ER $\alpha$  がアストロサイト細胞

膜上にも局在し (mER $\alpha$ )、この受容体を介して、エストロゲンが L-glu トランスポーターのトランスポート能を可逆的に減弱させるという新奇の作用を発見した。今まで、mERs がアストロサイトに存在していることを示した論文はごくわずかであり、その生理的な機能に言及した例はほとんど見あたらない。我々はこの作用が一酸化窒素 (NO) を介している可能性を示唆するデータを得ているが、これは同時にアストロサイト mER $\alpha$  が非常に広範な生理機能を担っている可能性をも提示する。アストロサイトは神経系の構築、細胞

外液の恒常性維持, 血液脳関門の形成といった機能が古くから知られていたが, 近年, tripartite synapse に代表されるアストロサイト-ニューロン, あるいはアストロサイト-血管クロストークといったアストロサイトと周辺細胞との機能連関が明らかになってきた. 最近ではニューロンの activity による毛細血管弛緩がアストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション依存性であることが示され, ニューロン-アストロサイト-血管クロストークにおいてアストロサイトが重要な役割を果たしていることが明らかになった. 一方, NO はニューロンにおいて受容体リサイクリング, シナプス再構築, LTP での分子クラスター生成, growth cone の searching behavior 等に関わる他, 血管においては血管弛緩作用等に関わっており, 非常に多岐にわたる生理現象のメディエーターである. さらに, アストロサイトに対して, エストロゲンがニューロンから, 血中から, と両方向から供給されていることもわかってきた. というのも, 血中からの脳内移行に加え, ニューロン自身が P45017 $\alpha$ , P450arom をもち, 内在性 cholesterol からエストロゲンを合成することが明らかになったからである. これらの知見は, 血管からアストロサイトを介してニューロンへ, あるいはその逆の communication がエストロゲンという共通のメディエーターを介して行われているという興味深い仮説を提示する. また, この communication が mER $\alpha$  と nER $\alpha$  のバランスで調節されている可能性も考えられる. そこで, 本研究ではエストロゲンの NO を介した分子調節機構を詳細に検討し, アストロサイト mER が影響を及ぼしうる新たな標的分子, あるいは現象発見をめざす. また, アストロサイトにおける mER $\alpha$  と nER $\alpha$  の発現バランスと脳神経機能との関連について検討する.

## 2. 研究の目的

本研究は アストロサイト mER $\alpha$  による脳神経機能調節機構およびその意義の解明を目標とする. アストロサイト mER $\alpha$  が NO を介して L-glu トランスポーターに及ぼす影響とそのメカニズムを詳細に検討, 解明する. また, アストロサイトと周辺細胞との機能連関において, アストロサイト mER $\alpha$  が果たしている役割を明らかにする. この目的を実現する新たなアプローチとして nER $\alpha$  と mER $\alpha$  の構造的差異を明らかにし, それぞれに特異的なリガンド開発をめざす. ER $\alpha$  が多くの疾患において保護的に働く基礎研究報告

も数多く, このリガンドは創薬ターゲットとしても有望である.

## 3. 研究の方法

### 1. mER $\alpha$ による GLAST 機能調節の詳細なメカニズム検討

mER $\alpha$  を介した NO 産生による GLAST の可逆的機能阻害にどの NO 合成酵素 (NOS) サブタイプが関わっているかについて eNOS 阻害剤である L-NIO (3-10  $\mu\text{M}$ ), nNOS 阻害剤である VL-NIO (1-3  $\mu\text{M}$ ), iNOS 阻害剤である 1400W (30  $\mu\text{M}$ ) を E2-BSA (膜非透過性  $\beta$ -estradiol) (1 nM) と 24 時間共添加し薬理学的な検討を行った. また, NO による分子制御を検討するため, S-nitrosyl 化の阻害剤である N-ethylmaleimide (NEM) (1-10 nM), cGMP 依存性 protein kinase 阻害剤である Rp-8-pCPT-cGMPS (RP) (10-100  $\mu\text{M}$ ), guanylate cyclase (GC) 阻害剤の ODQ (10-100 nM) と E2-BSA (1 nM) を 24 時間共添加し薬理学的検討を行った. 試薬はそれぞれ培地に直接溶解した. さらに GLAST の S-nitrosyl 化をビオチンスイッチ法により確認した. 最初に in vitro S-nitrosylation による GLAST の S-nitrosyl 化を確認した. 培養アストロサイトをホモジナイズし, 膜面分を, 水層において NO を放出する S-nitroso-L-acetyl penicillamine (SNAP) (100  $\mu\text{M}$ ), グルタチオン (GSH) (100  $\mu\text{M}$ ) で 30 分処置した後, nitrosothiol を持ったタンパク質をビオチン化した. ビオチン化したタンパク質を streptavidin-agarose で回収しウェスタンブロッティングを行った. また, E2-BSA による GLAST の S-nitrosyl 化を確認するために, E2-BSA (1 nM) あるいは E2-BSA (1 nM) + NEM (10 nM) で 24 時間処置した培養アストロサイトから回収した膜面分を用いて同様の実験を行った.

### 2. Xenopus oocyte を用いた検討

NO による GLAST の調節機構をより詳細に検討し, 成熟動物の前脳アストロサイトに発現している GLAST, GLT-1 両サブタイプに対する作用についても検討する目的で, Xenopus oocyte に L-glu トランスポーターを強制発現しトランスポーター電流を記録する実験系を立ち上げた. GLAST cDNA, GLT-1 cDNA が入手できなかったため EAAT1 (human GLAST), EAAT2 (human GLT-1) を用いて実験を行った. トランスポーター cDNA を大腸菌で増幅し NotI で直

鎖化した。直鎖化した DNA を鋳型として、RNA (cRNA) を合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、cRNA を注入しトランスポーターを発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。トランスポーターを介するイオン電流は卵母細胞を  $-50$  mV に保持し、 $-120$  mV へ周期的なステップパルスを加えた状態で、L-glu を用いて誘発した。NO 関連試薬を用いた詳細な検討を試みたところ、反応のばらつきが大きかったため、NO 関連試薬、酸化還元試薬等をナノインジェクターを用いて電流測定中に直接 oocytes に injection する実験系を立ち上げた。

### 3. nER $\alpha$ , mER $\alpha$ の発現バランスを調節するためのウィルス構築

アストロサイト特異的形質転換を行うため、アストロサイト特異的発現プロモーターである hGFAP プロモーター下流に蛍光蛋白質 DsRed をもつレンチウィルスをサブクローニングし、このウィルスのアストロサイト特異性について確認した。ウィルスを初代培養アストロサイトに  $10^{4-6}$  pfu/ml で適用し、初代培養系に用いる際の至適濃度を検討した。さらに、培養大脳皮質細胞(ニューロン・グリア混合培養)にウィルスを適用し、Tuj1, S100 $\beta$ , GLAST, O4, Nestin の抗体染色を行い、ウィルスの発現細胞特異性について検討した。nER $\alpha$ , mER $\alpha$  発現バランスを調節する目的で、このレンチウィルスをもとに以下のようなウィルスを現在サブクローニング中である。wild type (WT) ER $\alpha$  もしくはその siRNA を組み込んだウィルス。serine522 を alanin 置換した mutant ER $\alpha$  (S522A) を組み込んだウィルス (S522A は ER $\alpha$  の機能に影響を与えず ER $\alpha$  の膜局在を阻害する)、あるいはその dominant negative 体を組み込んだウィルス、などである。

### 4. mER $\alpha$ 選択的リガンドの探索

上記 3 のウィルス構築が時間を要することが判明したので、今後の実験のために mER $\alpha$  特異的なリガンドを探索した。我々は平成18年度までに mER $\alpha$  がアストロサイトの L-glu トランスポータートランスポート能を減弱させることを明らかにしている。東京大学薬学部薬化学教室 大和田智彦教授よりエストロゲン関連化合物ライブラリを供与されたので、上記の反応に対するライブラリ化合物の作用を検討し、mER $\alpha$  特異的なリガンドを探索した。エストロゲン関連化合

物は DMSO に溶解し、24 時間適用した。L-glu 取り込み能は既報に従って定量した (Sato et al., J. Neurochem., 86 1498-1505 (2003))。

### 5. 一分子イメージングを用いた細胞内局在による ER $\alpha$ 構造変化の検討

nER $\alpha$  と mER $\alpha$  の構造的差異を明らかにする目的で NTT 物性科学研究所 鳥光 慶一 部長のご協力により原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた一分子イメージングを試みた。培養アストロサイトをホモジナイズし遠心により細胞膜画分と細胞質画分とに分画した。それぞれの画分において、antiER $\alpha$  抗体、protein A ビーズを用いて nER $\alpha$ , mER $\alpha$  を回収した。Tris バッファーにより必要な濃度に希釈し高速原子間力顕微鏡 (AFM) で一分子イメージングを行った。

### 6. エストロゲンによる神経回路形成への影響とそのメカニズム

ERs が神経機能に関わる可能性を検討するため、培養海馬切片を E2-BSA 処置し、DiI を用いて spine density への影響を検討した。また、PSD95 の抗体染色によりシナプス形成への影響を検討した。この影響の原因として歯状回 (DG) 顆粒細胞の脳由来神経栄養因子 (BDNF) 放出の関連が疑われたため、E2-BSA の BDNF 放出量への影響を ELISA 法を用いて定量した。

## 4. 研究成果

### 1. mER $\alpha$ による GLAST 機能調節の詳細なメカニズム検討

mER $\alpha$  を介した NO 産生による GLAST の可逆的機能阻害にどの NOS サブタイプが関わっているかについて eNOS 阻害剤である L-NIO, nNOS 阻害剤である VL-NIO, iNOS 阻害剤である 1400W を用いて薬理的に検討した。これらの薬物の内、eNOS 阻害剤である L-NIO のみが用量依存的に E2-BSA (膜非透過性  $\beta$ -estradiol) の作用を阻害したことから、アストロサイトにおいては mER $\alpha$  の下流で eNOS が NO を産生することが明らかとなった。ウェスタンブロッティングにより培養アストロサイトには 3 種の NOS サブタイプの内、eNOS のみが発現していることも確認した。NO による分子機能制御としては、タンパク質中 Cys 残基の SH 基の S-nitrosyl 化、あるいは、GC を介した反応の 2 経路が予想された。そこで、S-nitrosyl 化の阻害剤である NEM, cGMP 依

存性 protein kinase 阻害剤である RP, GC 阻害剤の ODQ を用いて薬理的検討を行ったところ、NEM のみが E2-BSA の作用を強力に阻害した。これは NO が GLAST を直接 S-nitrosyl 化して機能を阻害していることを示唆している。NO による GLAST の S-nitrosyl 化をビオチンスイッチ法により確認した。SNAP で in vitro S-nitrosylation 処理した培養アストロサイトでは単一バンドが検出された。一方、GLAST の SH 基をグルタチオン処理によりあらかじめ還元しておくことこのバンドは消失した。さらに、E2-BSA 処理した培養アストロサイトでは SNAP 処理群より弱いながらも単一バンドが検出され、このバンドは NEM 処理により消失した。以上のことから、mER $\alpha$ →eNOS活性化→NO 産生→GLAST の S-nitrosyl 化という反応経路が明らかになった。

## 2. Xenopus oocyte を用いた検討

NO による GLAST 機能調節機構をより詳細に検討し、さらに成熟動物の前脳アストロサイトに発現している GLAST, GLT-1 両サブタイプに対する作用についても検討する目的で、Xenopus oocyte に L-glu トランスポーターを強制発現しトランスポーター電流を記録する実験系を立ち上げた。SNAP は確かに EAAT1 電流を阻害した。また、NO 放出を介さず、標的分子を直接 S-nitrosyl 化する化合物 NNO1 を東京大学薬学部薬化学教室 大和田智彦教授より供与されたので、この化合物を用いて同様の検討を行ったところ、やはり EAAT1 電流が有意に阻害された。さらに、SNAP, NNO1 の作用は EAAT2 電流においても確認された。よって、NO はアストロサイトに発現する GLT-1, GLAST の両サブタイプのトランスポーター能を阻害することが明らかとなった。ナノインジェクターを用いて EAAT1 電流, EAAT2 電流に対する Dithiothreitol (DTT) の作用を検討したところ、両電流は優位に増大した。以上の結果は、アストロサイト L-glu トランスポーターが Cys 残基の分子修飾により正負両方向に調節されている可能性を示唆しており興味深い。

## 3. nER $\alpha$ , mER $\alpha$ の発現バランスを調節するためのウイルス構築

アストロサイト特異的形質転換を行うため、アストロサイト特異的発現プロモーターである hGFAP プロモーター下流に蛍光蛋白質 DsRed をもつレンチウイルスを作成し、このウイルスのアストロサイト特異性について確

認した。ウイルスを初代培養アストロサイトに適用したところ、 $10^6$  pfu/mlが初代培養系に用いる指摘濃度であることを明らかにした。また、培養大脳皮質細胞（ニューロン・グリア混合培養）にウイルスを適用し、Tuj1, S100 $\beta$ , GLAST, O4, Nestin の抗体染色を行ったところ、ウイルスはアストロサイトにのみ DsRed を発現させることを確認した。さらに培養大脳皮質スライスにこのウイルスを適用したところ、培養スライス標本においてもアストロサイト特異的な形質転換が可能であることを確認した。今後、局在による脳神経機能調節機構の解析を行うためには、nER $\alpha$ , mER $\alpha$  発現バランスを調節する技術が必須である。そのために現在、このレンチウイルスをもとに以下のようなウイルスのサブクロニング中である。wild type (WT) ER $\alpha$  もしくはその siRNA を組み込んだウイルス、serine522 を alanin 置換した mutant ER $\alpha$  (S522A) を組み込んだウイルス (S522A は ER $\alpha$  の機能に影響を与えず ER $\alpha$  の膜局在を阻害する)、あるいはその dominant negative 体を組み込んだウイルス、などである。これらのウイルスは培養アストロサイトあるいは培養スライス標本に感染させ、アストロサイト細胞機能および神経細胞-アストロサイト-血管機能連関と nER $\alpha$ , mER $\alpha$  の関連について明らかにする予定である。

## 4. mER $\alpha$ 選択的リガンドの探索

上記 3 でウイルス構築が時間を要することが判明したので、今後の実験のために mER $\alpha$  特異的リガンドを探索した。我々は平成 18 年度までに mER $\alpha$  がアストロサイトの L-glu トランスポータートランスポーター能を減弱させることを明らかにしている。東京大学薬学部薬化学教室 大和田智彦教授よりエストロゲン関連化合物ライブラリを供与されたので、上記の反応に対するライブラリー化合物の作用を検討し、mER $\alpha$  を特異的に活性化するリガンドを探索した。今までのところ、nER の partial agonist として知られるタモキシフェンおよびその類縁化合物 2 種がエストロゲン同様 mER $\alpha$  を介して L-glu トランスポーターを阻害することを見いだした。これらの化合物は全てジフェニルブテン構造を備えていた。そこで「グルタミン酸トランスポーター阻害剤」として国内（特願 2008-032687）、国外（PCT/JP2009/000568）の両特許を出願した。今後、ライブラリに含まれるその他の化合物についても検討を進める予定である。

## 5. 一分子イメージングを用いた細胞内局在による ER $\alpha$ 構造変化の検討

nER $\alpha$  と mER $\alpha$  の構造的差異を明らかにする目的で NTT 物性科学研究所 鳥光 慶一 部長のご協力により AFM を用いた一分子イメージングを試みた. nER $\alpha$ , mER $\alpha$  の一分子イメージングに成功し, 局在により明らかに立体構造が変化していることを確認した (図 1). これは nER $\alpha$  と mER $\alpha$  とで個別のリガンドを探索できる可能性を示唆している. 今後, リガンドによる nER $\alpha$  と mER $\alpha$  の挙動を検討するため, 高速 AFM で time lapse imaging を行う予定である. これまで, ER のリガンド開発のためにはリガンドバインディングドメインを合成してリガンド共存下で X 線結晶解析を行う方法がとられていたが, 本法では受容体全分子とリガンドとの interaction をイメージング出来る点でより進んだリガンド開発技術といえる. また, mER $\alpha$  と nER $\alpha$  がタンパク質 complex である可能性もまだ残っているため, Native PAGE で確認する予定である. さらに mER $\alpha$  は raft に集積するのかなど, 膜脂質の組成と ER $\alpha$  局在との関連についても検討する予定である.

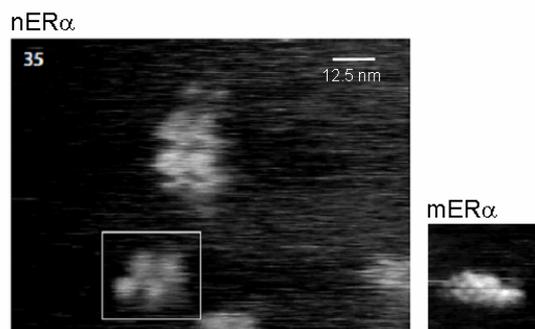


図 1. nER $\alpha$  と mER $\alpha$  の AFM イメージング像

## 6. エストロゲンによる神経回路形成への影響とそのメカニズム

エストロゲンが脳神経機能に及ぼす影響の一つとして, 神経回路形成への影響について検討した. 培養海馬切片の歯状回—CA3 野シナプス形成をモデルとした. エストロゲンは歯状回顆粒細胞に高濃度で存在する BDNF の放出を促進することにより歯状回—CA3 野のシナプス形成を特異的に促進することを明らかにした (図 2). ただし, この作用には ERs が関与していないことが薬理的に示されたため, 海馬では, エストロゲンは ER $\alpha$  以外の膜受容体を介して神経回路形成に影響を及ぼす可能性が示された.

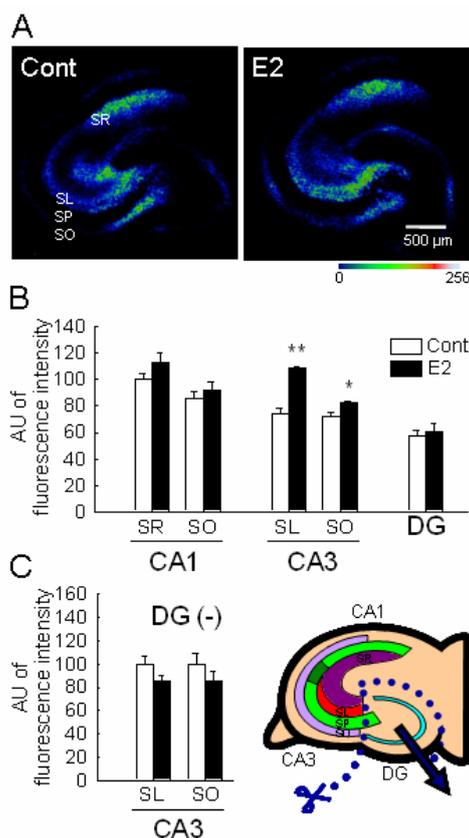


図 2. 培養海馬切片のシナプス形成に対する E2 の作用  
A. PSD95 (postsynaptic marker) 抗体染色像  
B. E2 は mossy fiber-CA3 シナプス形成を特異的に促進する (PSD95 発現量により定量)  
C. DG 除去培養切片では E2 の作用は見られない.

## 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 2 件)

1. Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K:  $\beta$ -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells., **Brain Res.**, 1150, 108-120 (2007)
2. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Ohwada T, Nakazawa K: Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes., **J. Pharmacol. Sci.**, 107, 226-230 (2008)

[学会発表] (計 12 件)

1. 佐藤 薫, Goldman JE: eGFP 標識された neural progenitor をもつ生後ラット前脳切片培養系の確立, 第 29 回 日本神経科学大会 (2006. 7, 京都市)
2. Sato K, Ohno Y, Goldman JE, Nakazawa K: Organotypic slice culture of postnatal rat forebrain involving neural progenitors

- labeled by eGFP-encoding Retrovirus., 2006 Annual Meeting of Society for Neuroscience (2006. 10, Atlanta, GA, USA)
3. 佐藤 薫, 大野泰雄, Goldman JE, 中澤憲一: 神経系前駆細胞の遊走および分化の薬理的検討に適した実験系の確立, 第 80 回 日本薬理学会年会 (2007. 3, 名古屋市)
  4. 佐藤 薫, Ventura RE, Goldman JE, 中澤憲一: hGFAP プロモーター下流に DsRed をもつレンチウイルスを用いたアストロサイト特異的標識法の確立, 第 30 回日本神経科学大会 (2007. 9, 横浜市)
  5. Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K: astrocyte-specific labeling with a recombinant lentiviral vector carrying DsRed protein driven by a human glial fibrillary acidic protein promoter., 2007 Annual Meeting of Society for Neuroscience (2007. 10, San Diego, USA)
  6. 佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中澤憲一: タモキシフェンと類縁化合物のアストロサイトグルタミン酸トランスポーターに対する作用, 第 81 回日本薬理学会年会 (2008. 3, 横浜市)
  7. Sato K, Matsuki N, Nakazawa K: Estrogens inhibit L-glutamate uptake by astrocytes by membrane estrogen receptor alpha., US-Japan joint meeting for glia research (2008. 3, Philadelphia, PA, USA)
  8. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Ohwada T, Nakazawa K: Effects of Tamoxifen on L-glutamate transporter., Neuroscience 2008 (2008. 9, Tokyo, Japan)
  9. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Ohwada T, Nakazawa K: Effects of tamoxifen and the related compounds on L-glutamate transport activity of cultured astrocytes., Neuroscience2008 (2008. 11, Washington D.C., USA)
  10. Shigemoto-mogami Y, Nakazawa K, Sato K: Microglia instructs neurogenesis and gliogenesis in the subventricular zone., 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3, 京都市)
  11. Takahashi K, Nakazawa K, Nozawa R, Ohno Y, Takeuchi T, Sato K: Inhibitory effects of NSAIDs on excitatory amino acid transporter EAAT1/GLAST in Xenopus oocytes., 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3, 京都市)
  12. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Goldman JE, Nakazawa K: Establishment of the risk assessment system for the brain at an early postnatal stage., 第 82 回日本薬理学会 (2008. 3, 横浜市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: 「グルタミン酸トランスポーター阻害剤」

発明者: 大和田 智彦, 佐藤 薫, 中澤憲一  
権利者: 国立大学法人東京大学, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

番号: 特願 2008-032687

出願年月日: 平成 20 年 2 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: 「グルタミン酸トランスポーター阻害剤」

発明者: 大和田 智彦, 佐藤 薫, 中澤憲一  
権利者: 国立大学法人東京大学, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

番号: PCT/JP2009/000568

出願年月日: 平成 21 年 2 月 13 日

国内外の別: 国際特許

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 薫 (SATO KAORU)

国立医薬品食品衛生研究所薬理部  
第一室長

研究者番号: 10311391

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし