様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月 １７ 日現在

機関番号：２４６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ０６９２８

研究課題名（和文）抑制性神経回路特異的なアストロサイトの同定とその機能解析

研究課題名（英文）The functional analysis of Olig2-astrocyte in adult mouse brain

研究代表者
辰巳　晃子（Kouko, Tatsumi）

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）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は脳内に特徴的な局在を示すアストロサイトの亜集団(以下Olig2-AS)を見出し報告している。このアストロサイト特異的な機能を明らかにするために、scRNA-seqデータベースを用いて解析したところ、Olig2-ASはトランスポーター関連遺伝子に富むアストロサイトクラスターに属することが解った。slc7a10は、このクラスターにおける代表的な中性アミノ酸トランスポーター遺伝子の一つである。そこでin vivo実験でその発現を検証したところ、in silico解析を裏付ける結果を得た。以上のことから、slc7a10は成体脳のOlig2-ASにおいて特異的な機能を発揮していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
このアストロサイト(Olig2-AS)は世界的にも研究がなされていないサブタイプであり、独自性は極めて高い。本研究で、このアストロサイトが特定の脳領域に局在して特定のトランスポーターを高発現する集団であることが明らかになった。この事はOlig2-ASがシナプス伝達の修飾或いは制御を介して、特定の神経回路の神経伝達機能の一翼を担っている可能性を示唆している。このアストロサイトは大脳基底核回路の神経核に局在する傾向にある事から、大脳基底核疾患(パーキンソン病に代表される)など大脳基底核疾患の理解と治療戦略に新たな局面を切り開く可能性があり、その意味で学術的・社会的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：We have reported that the transcription factor Olig2 labels a subpopulation of astrocytes (Olig2-AS). To uncover the specific functions of Olig2-AS, we first analyzed public single-cell RNA-seq databases of adult mouse brains. Unbiased classification of gene expression profiles and subsequent gene ontology analyses revealed that the majority of Olig2-AS belonged to an astrocytic cluster that is enriched for transporter-related genes. Slc7a10 (also known as Asc-1) was one of the representative neutral amino acid transporter genes in the cluster. To complement the in silico data analyses, we analyzed gene expression of Olig2-AS by quantitative reverse transcription PCR. Olig2-AS was isolated using laser microdissection. Furthermore, we confirmed that slc7a10 protein expressed in Olig2-AS by immunohistochemistry. Theses in vivo experiments corroborated the in silico data. Taken together, our findings suggest that SLC7A10 exerts specific functions in Olig2-astrocytes of the adult brain.

研究分野：神経解剖学

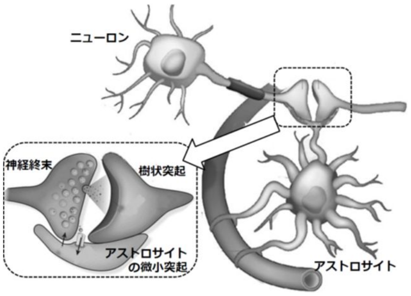
キーワード：アストロサイト　Olig2　アミノ酸トランスポーター　シングルセルRNAシーケンス解析　レーザーマイクロダイセクション　抑制性神経回路

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

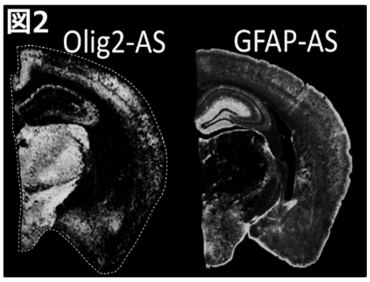
図1. 三つ組みシナプス模式図



近年、中枢神経系のアストロサイトがニューロンと共に三つ組みシナプスを構成し、シナプス伝達に積極的に関わるという概念が定着してきた(図１)。しかし神経伝達物質は代表的なグルタミン酸、GABA といったアミノ酸系神経伝達物質だけではなくドーパミンなどのアミン系、VIP などのペプチド性など多種多様であり、三つ組みシナプスを構成するアストロサイトにもそれに合わせた機能的バラエティが要求されるはずである。しかし近年グリア研究者が注目している「アストロサイトの多様性」はこの機能的バラエティを標的にしているわけではない。例えば、損傷時の活性化ミクログリアからのシグナルの有無で神経細胞に対する挙動が異なり、神経細胞をサポートするアストロサイト(A1 型) と神経細胞を攻撃するアストロサイト(A2 型)に分かれるというような「状況による多様性」を追求するもの、或いは線条体と海馬といった脳内の異なる神経核に存在するアストロサイトの性質の違いを網羅的に比較検討するといった研究が主流である。神経回路に特化したアストロサイトの本質に迫る研究は未だ殆ど認められず、多様な神経伝達物質を持つ神経回路に対応するメカニズムについては未だ不明な点が多い。

２．研究の目的

我々は遺伝子マーキングの手法を用いて転写因子 Olig2 を発現するアストロサイト（以下 Olig2-AS）の動態を解析する過程で、GFAP 陽性アストロサイト（以下 GFAP-AS）とは脳内で局在分布が相互排他的であることを見出している(図 2)。特に Olig2-AS は GABA やグリシンの抑制性入力を密に受けている神経核に豊富に存在していた。本研究ではこれら２種類のアストロサイトの性質の違いを組織学、生化学、生理学的な多面的アプローチで明らかにし、Olig2-AS が抑制性神経回路に対応するサブタイプである可能性を検証する。



３．研究の方法

① Olig2-AS と GFAP-AS の発現遺伝子の比較

（1）図２で示したように Olig2-GFP マウス、GFAP-GFP マウスの脳内ではそれぞれ Olig2-AS と GFAP-AS が GFP で十分に標識され、その排他的な局在性が観察できる。そこでこれら脳を単一細胞に分散し、ミエリン等のデブリスを除去、死細胞と生細胞を 7-AAD 染色を用いて分離、その後 NG2 抗体を用いて Olig2 陽性の OPC 集団を除去して Olig2-AS、GFAP-AS の集団をセルソーターにかけて分取した。分取した Olig2-AS と GFAP-AS から RNA を抽出しマイクロアレイ法により mRNA の発現を網羅的に解析した。神経伝達に関わる分子に注目したが、期待に反して、各アストロサイト集団に特異的な遺伝子発現の同定には至らなかった。

（2）そこで遺伝子解析の方法を再考し、公表されているシングルセル RNA-seq データベース利用して Olig2-AS が発現する遺伝子を解析する事とした。この *in silico* 解析により、Olig2-AS は 347 遺伝子特異的に発現していることが分かった(図 3)。オントロジーエンリッチメント(GO）解析により、これら遺伝子はトランスポーター関連遺伝子に富むアストロサイトクラスターに高

図3

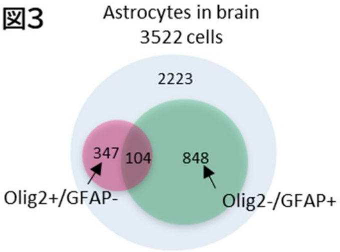


図4

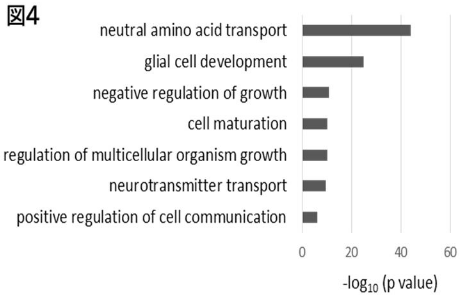
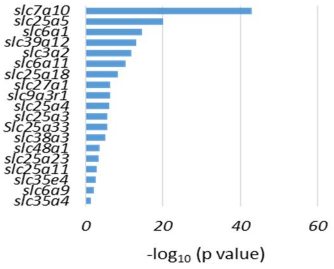


図5



発現することが明らかになった(図 4)。さらにこの中からトランスポーター遺伝子を抽出して解析するとアミノ酸トランスポーターである slc7a10 の発現が非常に高いことが分かった(図 5)。

②*in silico* 解析の実証

これらの解析結果を実証するため、以下の in vivo 実験による実験を行った。対象はマウスの淡蒼球外節とした。淡蒼球外節には Olig2-AS と GFAP-AS が共に豊富に存在するが、これらは排他的なテリトリーを持つため同一神経核内に存在する各アストロサイトの機能の違いを比較するのに有効であると考えた。

（1）まずレーザーマイクロダイセクション法を用いて Olig2-AS と GFAP-AS をマウス毎に約 500 個ずつ切り出した。　その後 RNA を抽出してトランスポーター遺伝子の発現を qPCR で定量し比較した(図 7)。

その結果、グルタミントランスポーター遺伝子(GLT-1、GLAST）の発現には有意差はないものの、GABA トランスポーター遺伝子（GAT-3）の発現は Olig2-AS が有意に高いことが明らかになった(図 7)。又 *in silico* 解析の結果と一致して、アミノ酸トランスポーターの slc7a10 の発現も Olig2-AS において有意に高いことが分った。

（2）次に slc7a10 抗体を用いて免疫組織化学的な検討を行った。淡蒼球において slc7a10 は tdTomato で標識される Olig2-AS のプロセスに発現することを、高解像度顕微鏡により確認できた(矢頭)(図 8)。

図6

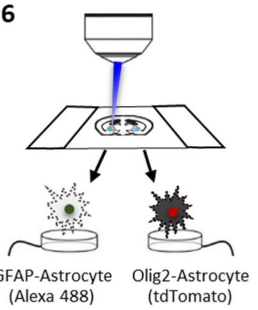


図7

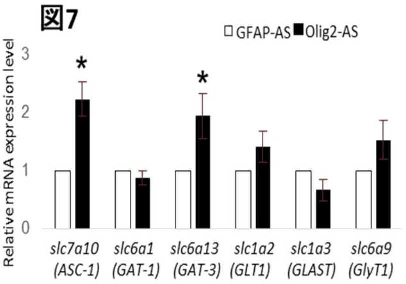
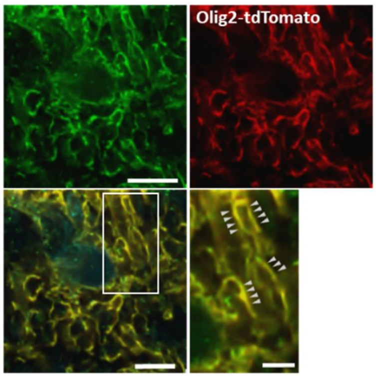


図8



４．研究成果

当初の仮説であった Olig2-AS と抑制性神経回路との関与については、GABA トランスポーター GAT-3 の発現を qPCR で検出できたものの、抑制性シナプス伝達特異的なアストロサイトであるいう実証には至らなかった。しかし *in silico* 解析を導入したことで、Olig2-AS がトランスポーター関連遺伝子を強く発現するアストロサイトクラスターに属する事、そしてその中でも slc7a10 遺伝子を高発現していることを明らかにすることができた。このトランスポーターは神経細胞が発現するとされてきたが、本研究でアストロサイトも発現する事が明らかにすることができた。近年、slc7a10 を発現するアストロサイトのサブタイプが報告されているが、Olig2-AS との関連も興味深い。slc7a10 は alanine–serine–cysteine トランスポーター1(Asc-1)ともよばれ、グリシンや D セリンの放出や回収により NMDA 受容体の制御に関与することが知られている。本研究では当初の仮説を実証するに至らなかったが、Olig2-AS が発現する重要な因子のひとつを抽出できた。今後の研究の進展に新しい視点を得ることができたことは一定の成果といえる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1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 Kouko Tatsumi, Kaoru Kinugawa, Ayami Isonishi , Masahiro Kitabatake , Hiroaki Okuda , Shoko Takemura , Tatsuhide Tanaka , Eiichiro Mori and Akio Wanaka	４．巻 14
２．論文標題 Olig2-astrocytes express neutral amino acid transporter SLC7A10 (Asc-1) in the adult brain	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Molecular Brain	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00874-8	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 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 辰巳晃子
２．発表標題 Olig2由来アストロサイトはアミノ酸トランスポーターSLC7A10を優先的に発現する
３．学会等名 第125回日本解剖学会総会
４．発表年 2021年

１．発表者名 辰巳晃子
２．発表標題 Olig2アストロサイトの抑制性シナプスとの関与
３．学会等名 第63回日本神経化学会総会
４．発表年 2020年

１．発表者名 辰巳晃子,石西綾美,山崎美和子,河邊良枝,竹村晶子,中原一貴,奥田洋明,田中達英,和中明生
２．発表標題 Olig2アストロサイトの脳内分布と抑制性シナプスとの関与
３．学会等名 第124回日本解剖学会総会（新潟）
４．発表年 2019年

１．発表者名 辰巳晃子，石西綾美，竹村晶子，田中達英，和中明生
２．発表標題 Comparison of molecular signatures of Olig2-lineage astrocyte and GFAP-positive astrocytes in the globus pallidus using laser micro-dissection
３．学会等名 NEURO2019（新潟）
４．発表年 2019年

１．発表者名 辰巳晃子，石西綾美，竹村晶子，田中達英，和中明生
２．発表標題 Comparison of molecular signatures of Olig2-lineage astrocyte and GFAP-positive astrocyte using laser microdissection
３．学会等名 ISN-ASN Meeting (Montreal, Canada)（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 辰巳晃子，石西綾美，竹村晶子，田中達英，和中明生
２．発表標題 Olig2アストロサイトの抑制性シナプスとの関与
３．学会等名 第125回日本解剖学会総会（山口）
４．発表年 2020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
研究分担者	石西　綾美 (Isonishi Ayami) (10836018)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究分担者	田中　達英 (Tanaka Tatsuhide) (80567032)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

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