

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32623

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05963

研究課題名（和文）グルタミン酸回収機構を調節する神経細胞とアストロサイトのクロストーク

研究課題名（英文）Crosstalk between neurons and astrocytes for glutamate recovery

研究代表者

林 真理子（Hayashi, Mariko）

昭和女子大学・生活機構研究科・准教授

研究者番号：30525811

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）：アストロサイトの分岐形成とグルタミン酸回収機能の成熟過程を二次元培養で観察し、報告した。アストロサイトの成熟を促す神経細胞との相互作用因子を同定するため、アストロサイト特異的に発現する膜タンパク質200種余を標的とした遺伝子破壊によるスクリーニングを行い、10余に絞りこんだ。複数の遺伝子の関与が想定されたので、グルタミン酸トランスポーター3種を標的に複数の遺伝子の同時破壊が可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アストロサイトは神経細胞の存在下でのみ、複雑に分岐した構造をとり、神経細胞が放出した興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を回収してシナプス伝達を終結させるのに必要なグルタミン酸トランスポーターGLT1を発現するようになる。しかし、神経細胞との間にどのようなシグナルのやりとりが行われているかは不明である。本研究ではアストロサイト特異的に発現し、この過程に関わる膜タンパク質の同定を目指し、候補を10余に絞りこんだ。

研究成果の概要（英文）：We reported the observation of astrocyte morphology and the maturation process of glutamate recovery function in two-dimensional culture. To identify the interacting factors with neurons that promote astrocyte maturation, we performed screening by gene disruption targeting more than 200 types of membrane proteins specifically expressed in astrocytes, narrowing it down to more than 10. Since we assumed the involvement of multiple genes, we confirmed that it was possible to disrupt multiple genes targeting three types of glutamate transporters simultaneously.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞 アストロサイト グルタミン酸トランスポーター ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸はシナプスに放出されてグルタミン酸受容体を活性化した後、神経細胞やグリア細胞の一種であるアストロサイトに回収されてシナプス伝達が終結する。グルタミン酸をシナプスから回収し、神経伝達を終結させる過程に関わっているグルタミン酸トランスポーターは、アストロサイトの微細な突起に局在して神経シナプスにアプローチする。ここでヒアルロン酸が継続して合成されることがグルタミン酸トランスポーターの突起先端への局在とグルタミン酸取り込み活性の維持に関わることを示していた。神経細胞がアストロサイトの分岐構造の形成やグルタミン酸トランスポーターの発現を誘導することは知られているが、この過程にかかわる神経細胞由来の因子は何であるかについてはわかっていない。そこで、アストロサイトの微細な突起の形成、神経シナプスへのアプローチ、突起同士が互いを避けて排他的な領域を形成するタイリング現象、ヒアルロン酸の合成など、アストロサイトによるグルタミン酸の回収機構の成熟に関わる伝達物質は何か、グルタミン酸回収機構を強化してグルタミン酸による過剰な興奮による損傷から神経細胞を保護するような化合物はあるかについて明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

アストロサイトの分岐形成、グルタミン酸トランスポーターの発現誘導、ヒアルロン酸の合成によりグルタミン酸の回収機構が成熟する仕組みを明らかにする。アストロサイトが複雑な分岐を形成して神経シナプスにアプローチし、グルタミン酸トランスポーターをよく発現するには神経細胞の働きを必要とするため、神経細胞とアストロサイトの間のどのような分子間相互作用がアストロサイトの形態的、機能的分化を促し、グルタミン酸回収機構を成熟させるのかを調べるため、候補となる分子をリストアップする。そして、CRISPR-Cas9による遺伝子破壊を利用したスクリーニングでアストロサイトの成熟に関わるものを絞り込んでいく。

また、ヒアルロン酸を骨格とする細胞外マトリクス構造であるペリニューロナルネットの形成やグルタミン酸トランスポーターの発現・局在・活性、アストロサイトの分岐形成や神経細胞へのアプローチに影響を与える生理活性物質や有機化合物をスクリーニングする。これによって、どのような分子がアストロサイトによるグルタミン酸回収機構の成熟に関与しているかの手がかりを掴む。

3. 研究の方法

この研究には、神経細胞とアストロサイトの同時形態観察や分子局在解析が容易な細胞培養系が必要である。単独培養のアストロサイトは脳組織内とは異なる炎症型に近い単純な形態をとり、アストロサイトに最も多いグルタミン酸トランスポーターであるGLT1の発現が乏しいという欠点があった。そこで、高度に分岐しグルタミン酸トランスポーターをよく発現する成熟したアストロサイトを含む神経細胞・アストロサイトの混合培養系を開発したので、これを利用して研究を進める。

(1) グルタミン酸の回収を制御する生理活性物質の探索

神経細胞やグリア細胞に由来する生理活性物質やサイトカインがグルタミン酸回収機構やペリニューロナルネットの形成に与える影響、特に神経保護作用を評価する。神経細胞とアストロサイトの混合培養に対し、アストロサイトの炎症形態である反応性アストロサイトの形成にかかわるとされる伝達物質やサイトカイン類、マイクログリアに由来する炎症性物質を添加し、培養ののち固定して多重免疫染色する。ヒアルロン酸を標識するHABPによってヒアルロン酸の合成を、神経細胞の形態と損傷を示す樹状突起マーカーのMAP2によって神経細胞の損傷を、アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターであるGLT1でアストロサイトの形態の変化とトランスポーター発現量を同時に評価できる。人為的な偏りを避けるため、ハイスループット画像撮影装置CQ1で撮影し、画像は画像解析ソフトウェアImageJのマクロ機能を用いて定量解析する。また、同じ評価方法で、化合物スクリーニングをめざし、評価指標の基準をクリアできるように条件検討する。

(2) アストロサイトのグルタミン酸回収機構に関わる神経由来因子の探索

アストロサイトによるグルタミン酸回収機構の形態的、機能的成熟を誘起する神経細胞との相互作用に関わる膜タンパク質の候補として、既存のアストロサイトの遺伝子発現やプロテオミクスのデータに基づき、アストロサイト特異的に発現し、神経損傷や老化で発現量が減少する傾向にあるものを200個程度選定した。そして、CRISPR-Cas9による遺伝子破壊のためのガイドRNAを設計した。プラスミドに搭載したCRISPR-Cas9システムでは遺伝子導入試薬の神経細胞への毒性が強くてうまくいかなかった。そこでHAタグを融合したCRISPR-Cas9システムを搭載し

たアデノ随伴ウイルスに組み込み、神経細胞とアストロサイトの混合培養系に添加して感染させ、候補遺伝子の遺伝子破壊を行う方法を試みたところ、多数のアストロサイトに導入し、かつ分岐構造を作らせることに成功した。HA タグに対する免疫染色により Cas9 を発現する細胞を検出し、グルタミン酸トランスポーターGLT1 に対する免疫染色により遺伝子破壊アストロサイトにおける GLT1 の発現と形態に与える影響を評価した。

(3) 神経細胞 アストロサイト細胞間相互作用因子の機能評価

(2) で実施した遺伝子破壊の結果、アストロサイトの分岐やタイリング現象に影響がみられたものについて、複数のガイド RNA を使用して確実に遺伝子破壊する。また、アストロサイトでの発現が報告されている他のサブタイプがあれば、それぞれ、もしくは同時に遺伝子破壊して、表現型が強化されるかどうかを評価する。そして、それぞれの遺伝子産物について、免疫染色で発現の細胞特異性や多様性、局在、アストロサイト形態と発現量の関係、神経シナプスとの位置関係を観察する。遺伝子破壊を行った培養サンプルと野生型で上述のマーカータンパク質の発現や局在を比較する。

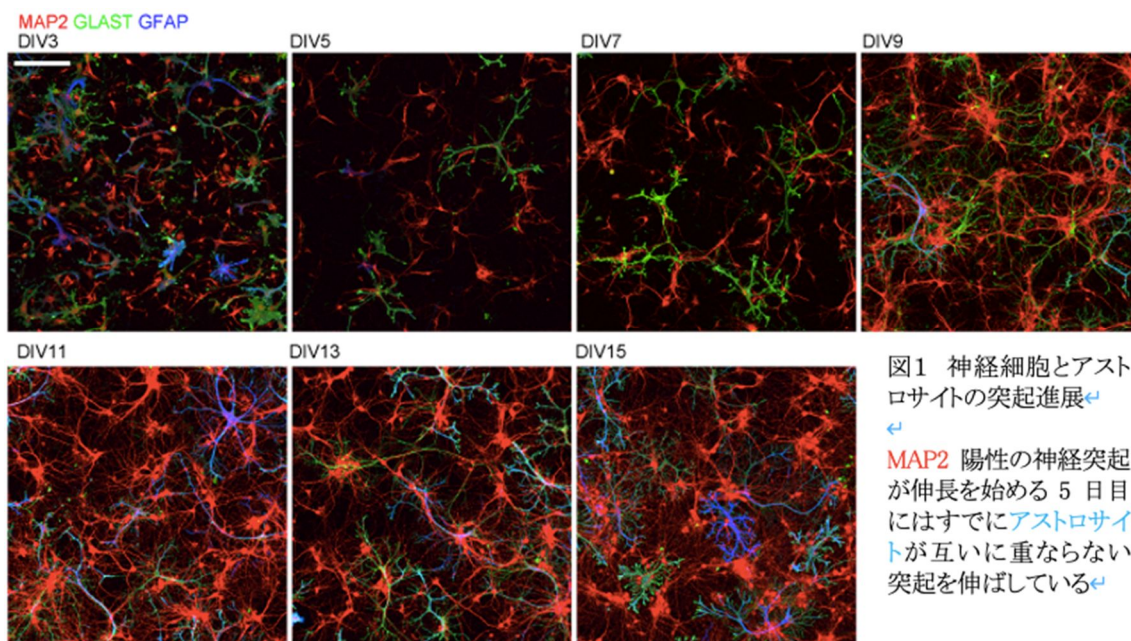
4. 研究成果

(1) グルタミン酸の回収を制御する生理活性物質の探索

マイクログリア由来で神経損傷性を持つ反応性アストロサイトを生成させるとされる C1q、TNF、IL1 をはじめ、BDNF、GDNF、LIF、EGF、IGF などの成長因子、IL1、IL6 などのサイトカイン類、アミロイド、リポポリ多糖などアストロサイトの性質に影響を与えそうな物質をさまざまな濃度で神経細胞とアストロサイトの混合培養に添加し、24 時間後もしくは 48 時間後に固定した。グルタミン酸トランスポーターGLT1 に対する免疫染色でアストロサイトの形態と GLT1 の発現量を、ピオチン標識ヒアルロン酸結合タンパク質による染色でヒアルロン酸やペリニューロナルネットの沈着量を、チューブリン結合タンパク質 MAP2 に対する染色で神経繊維に対するダメージを、それぞれ評価した。しかし、いずれの物質、また複数の物質の組み合わせによっても顕著な影響はみられなかった。

この検出、評価法を用いて、ハイスループット化合物スクリーニングの可能性についても模索した。ヒアルロン酸分解酵素の添加でアストロサイトの形態、ヒアルロン酸の沈着、神経損傷のいずれについても評価指標値の T 検定で有意な差がみられたが、化合物スクリーニングに要求される CV 値、Z' 因子や S/B 比、S/N 比などの基準を満たすことができなかった。条件を変えながら試行を繰り返したが、基準に到達できず、化合物スクリーニングを断念した。

一方、この神経細胞・アストロサイトの混合培養系を利用して、アストロサイトの突起形成過程や、神経細胞によるアストロサイトのグルタミン酸トランスポーター発現誘導の過程を継時観察した。そして、アストロサイトは神経繊維の伸長開始とほぼ同時に分岐の形成を開始し、その段階ですでに他の枝を避けて排他的な領域を形成するタイリングの性質を備えていることを報告した(図1)。また、グルタミン酸受容体やグルタミン酸トランスポーターGLT1、シナプス小胞にグルタミン酸を充填する小胞型グルタミン酸トランスポーターvGluT1 の発現はアストロサイトの突起形成より後のシナプス形成の時期に増加し、シナプス形成はアストロサイトの分岐形成に必要とされてはいないこともわかった。



(2) アストロサイトのグルタミン酸回収機構に関わる神経由来因子の探索

神経細胞とアストロサイトのクロストークに関わる遺伝子の候補として選んだものについてアデノ随伴ウイルスに搭載したCRISPR-Cas9法による遺伝子破壊を行い、アストロサイトの形態とグルタミン酸トランスポーターの発現に対する影響を評価した。アデノ随伴ウイルスの力価を調整することでアストロサイトの一部がHAタグを融合したCas9を発現する状態をつくる

GLT1 HA

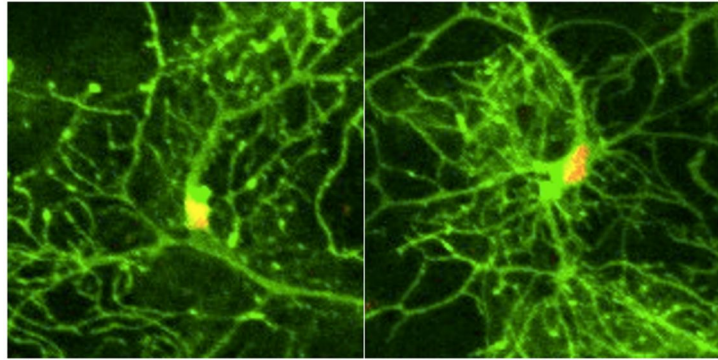


図2 Cas9陽性細胞でタイリングに影響がない例(左)とある例(右)

ことができた。グルタミン酸トランスポーターそのものを遺伝子破壊の標的としたものを除いては、その発現に顕著な影響がみられたものはなかった。また、分岐が作られない、といった強い表現型を示すものもなかった。一方、タイリングの性質が弱まっているような細胞は観察された(図2)ので、その再現性を検証しながら200余の候補から十数個の遺伝子を選び出した。

(3) 神経細胞 アストロサイト細胞間相互作用因子の機能評価

これらの遺伝子が実際にタイリングに関わるかを検証するため、複数のガイドRNAを設計し、アデノ随伴ウイルスに組み込んで同時に感染させ、確実に遺伝子破壊する試みを進めている。また、類似した機能を持つと予測される複数のサブタイプをアストロサイトに発現するものについては、それらについても同様にガイドRNAを設計してアデノ随伴ウイルスに組み込み同時に感染させることにした。

複数のアデノ随伴ウイルスを同時に感染させ、遺伝子破壊することが可能かを検証するため、グルタミン酸トランスポーターSlc2(GLT1)、Slc3(GLAST)と中性アミノ酸トランスポーターSlc4(ASCT1)を標的とするガイドRNAを組み込んだアデノ随伴ウイルスをそれぞれの組み合わせで感染させ、遺伝子産物の発現量を免疫蛍光染色を行ったサンプルの蛍光シグナル強度を指標に測定し、その分布を調べた。その結果、複数のアデノ随伴ウイルスを同時に添加してHAタグに対する免疫染色を指標に細胞を選んだ場合、多くの細胞で遺伝子産物発現量が下がっており、同時感染に成功していることを確認できた。

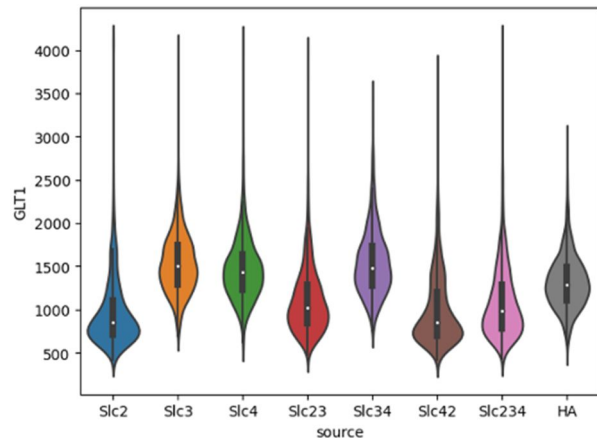


図3 Cas9陽性細胞での遺伝子産物発現量の分布

本研究を通して、神経細胞とアストロサイト間のクロストークもしくはアストロサイトのタイリングに関わる分子を絞り込むことができた。アストロサイト由来の神経細胞成熟因子は複数知られているが、逆方向に働きアストロサイトのタイリングに関わる分子はこれまでに知られていない。本研究を進めることで、神経細胞とアストロサイトが互いに相手を育て成熟させる仕組みについての新しい知見が得られることができると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashi MK, Sato K, Sekino Y	4. 巻 23
2. 論文標題 Neurons Induce Tiled Astrocytes with Branches That Avoid Each Other	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23084161	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 Takahashi K, Chen L, Sayama M, Wu M, Hayashi MK, Irie T, Ohwada T, Sato K	4. 巻 299
2. 論文標題 Leucine 434 is essential for docosahexaenoic acid-induced augmentation of L-glutamate transporter current	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 102793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102793	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 Togo K, Fukusumi H, Shofuda T, Ohnishi H, Yamazaki H, Hayashi MK, Kawasaki N, Takei N, Nakazawa T, Saito Y, Baba K, Hashimoto H, Sekino Y, Shirao T, Mochizuki H, Kanemura Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Postsynaptic structure formation of human iPS cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00851-1	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0件

〔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
---------	---------