

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790243

研究課題名（和文） アストロサイトのカルシウムシグナルにより発現制御される翻訳抑制因子の機能解明

研究課題名（英文） Functional significance of astrocytic calcium signal-dependent regulation of translational repressor

研究代表者

金丸 和典 (KANEMARU KAZUNORI)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10456105

研究成果の概要（和文）： グリア細胞の一種であるアストロサイトが脳機能にどのように貢献するかは未だ不明な点が多い。本研究では、脳障害時にアストロサイト細胞内で起こるカルシウム濃度変化（カルシウムシグナル）が、翻訳抑制因子プミリオ2の発現量を減少させることで細胞間接着タンパク質N-カドヘリンの発現量を増大させ、脳損傷後の神経保護作用に貢献することを解明した。

研究成果の概要（英文）： The functional significance of astrocytes remains understood. Current study revealed that brain injury-induced calcium signaling in astrocytes contributes to the formation of reactive astrocytes and neuroprotective role of astrocytes via the regulation of translational repressor pumilio-2 and cell adhesion protein N-cadherin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：神経-グリア相互作用、アストロサイト、カルシウムシグナル、神経保護作用、カドヘリン、翻訳抑制因子

## 1. 研究開始当初の背景

ニューロンを取り囲むように存在するアストロサイトは脳機能発現・維持および脳形成に重要な役割を果たす。このような役割は近年「ニューロン-グリア相互作用」として

注目を集め盛んに研究されるようになったが、その基盤となる細胞内シグナル伝達経路や作用メカニズムは未だ多くが不明である。これを解明することは脳動作原理の理解だけでなく、中枢疾患に対する創薬シーズや治

療戦略の提供につながる重要な研究課題である。

アストロサイトは様々な刺激に応答してダイナミックな細胞内カルシウム濃度変化（カルシウムシグナル）を示すという特性を持つ。カルシウムシグナルは細胞運動や分泌および遺伝子発現といった多様な細胞機能を制御するため、アストロサイトの各種機能発現にもカルシウムシグナルの貢献が十分に予想されるが、その役割はほとんど解明されていない。

代表者の当初までの研究により、アストロサイトのカルシウムシグナルがN-カドヘリン発現を制御することを明らかにしていた。また、翻訳抑制因子プミリオ2がその制御を仲介する予備的知見を得ていた。

## 2. 研究の目的

アストロサイトにおけるカルシウムシグナル依存的なN-カドヘリン発現調節へのプミリオ2の関与を明らかにする。さらに、生体内でこの新規経路が寄与する現象を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究ではプミリオ2の免疫細胞・組織化学的実験が極めて重要となるため、まず抗プミリオ2抗体を作成した。その抗体を用いて、ウェスタンブロットや免疫染色などの生化学解析を行った。

また、プミリオ2結合配列を持つN-カドヘリン RNA の非翻訳領域を付加した緑色蛍光タンパク質（GFP）レポーターを構築し、生きた細胞のなかでプミリオ2活性を評価可能な実験系を確立した。

さらに、生体内でプミリオ2関連経路が重要となる現象を見出すため、アストロサイト

特異的N-カドヘリン・ノックアウトマウスを作成した。また、アストロサイトのカルシウムシグナルが減弱したモデルマウス（イノシトール三リン酸受容体2型ノックアウトマウス）を入手した。

これらの遺伝子改変マウスに、メス刺入による大脳皮質侵襲実験を施し、その後のアストロサイトの形態、プミリオ2発現、N-カドヘリン発現、および神経細胞死に与える影響を定量評価した。

## 4. 研究成果

培養アストロサイトを用いた実験系により、（1）アストロサイトのカルシウムシグナルがプミリオ2の発現量を低下させる作用を持つこと、（2）プミリオ2がN-カドヘリン発現を抑制すること、（3）上記1、2の結果、アストロサイトのカルシウムシグナルはプミリオ2依存的なN-カドヘリン発現抑制を解除することでN-カドヘリン発現量上昇を達成することを明らかにした。

また、成体マウス大脳皮質損傷モデルを用い、これらの発現制御が生体内のアストロサイトでも起こることを見出した。

さらに、その病理的意義を探るため、アストロサイトカルシウムシグナル不全マウスとアストロサイト特異的N-カドヘリン・ノックアウトマウスに脳損傷を与えた。その結果、いずれのマウスモデルにおいても、創傷治癒に重要とされる活性化アストロサイト形成が減弱することがわかった。さらに、損傷後の生存ニューロン数が顕著に減少することが観察され、アストロサイトのカルシウムシグナルがプミリオ2とN-カドヘリンの発現制御を介して、神経細胞保護作用に貢献するという新しい知見を得た。

この新規経路は、様々な脳疾患で見られる活性化アストロサイトに共通して起こる

ことが見込まれ、グリア細胞が関わる脳疾患に対する新たな治療戦略につながるものが期待される。また、カルシウムシグナルによるプミリオ2発現制御機構は、未知の転写制御機構を含む可能性があり、その解明は神経科学分野を超えて幅広い研究分野にインパクトを与えることも期待できる。

今後これらの検証を進めることで、ニューロン主体で行われてきたこれまでの研究とは異なった、グリア側の視点から脳機能解明を目指すことができると考えられる。

#### 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1件)

- ① Yohei Okubo, Kazunori Kanemaru, Masamitsu Iino.  
Imaging of  $Ca^{2+}$  and related signaling molecules and investigation of their functions in the brain.  
*Antioxidant Redox Signaling*(査読有)、  
14: 1303-1314 (2011)

[学会発表] (計7件)

- ① 金丸 和典、久保田 淳、廣瀬 謙造、大久保 洋平、飯野 正光  
カルシウム依存性なN-カドヘリン翻訳制御を介するアストロサイトの神経保護作用  
第85回日本薬理学会年会  
国立京都国際会館(京都府)  
2012年3月14日
- ② 金丸 和典、久保田 淳、廣瀬 謙造、大久保 洋平、飯野 正光  
 $Ca^{2+}$ および pumilio 2 依存性のN-カドヘリン翻訳制御は反応性アストロサイトによる神経保護作用に重要である  
第34回日本神経科学大会  
パシフィコ横浜(神奈川県)

2011年9月17日

- ③ 金丸 和典、大久保 洋平、廣瀬 謙造、飯野 正光  
Pumilio-2 mediates  $Ca^{2+}$  signal-dependent maintenance of N-cadherin expression in astrocytes  
第84回日本薬理学会年会  
パシフィコ横浜(神奈川県)  
2011年3月23日
- ④ 金丸 和典、大久保 洋平、廣瀬 謙造、飯野 正光  
アストロサイト  $Ca^{2+}$ シグナルにより発現制御される翻訳抑制因子 pumilio2 の機能解析  
第16回グリアクラブ  
ヒルトンニセコビレッジ(北海道虻田郡)  
2011年2月1日
- ⑤ 金丸 和典、大久保 洋平、廣瀬 謙造、飯野 正光  
アストロサイトにおける  $Ca^{2+}$ シグナル依存的なN-カドヘリン発現制御を担う因子の同定  
第38回薬物活性シンポジウム  
札幌市教育文化会館(北海道札幌市)  
2010年11月11日
- ⑥ 金丸 和典、大久保 洋平、廣瀬 謙造、飯野 正光  
Pumilio-2 mediates  $Ca^{2+}$  signal dependent maintenance of N-cadherin expression in astrocytes  
第29回内藤コンファレンス・GLIA WORLD  
湘南国際村センター(神奈川県三浦郡)  
2010年10月6日

⑦ 金丸 和典、大久保 洋平、廣瀬 謙造、飯野 正光

アストロサイト  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルによる N-カドヘリン発現維持を仲介する新規因子の機能解析

第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会

神戸コンベンションセンター（兵庫県神戸市）

2010年9月3日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金丸 和典 (KANEMARU KAZUNORI)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10456105

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし