

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290021

研究課題名(和文) アストロサイトの多様性の分子基盤解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of astrocyte heterogeneity

研究代表者

田中 光一 (Tanaka, Kohichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80171750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：Intersectional法を用い、アストロサイトの誕生する神経上皮の部位とアストロサイトの最終的に分布する脳部位との対応地図を作成した。背側前脳のアストロサイトはEmx1発現領域から、線条体のアストロサイトはGsh2発現領域から、視床のアストロサイトはOlig3発現領域から、視床下部のアストロサイトはNkx2.1発現領域から、小脳・中脳のアストロサイトはEn1発現領域から、脊髄のアストロサイトはHoxb8発現領域から、産生されることを明らかにした。また、アストロサイトが脳部位により異なる機能を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes were thought to be a homogenous population of cells. However, several studies have demonstrated that astrocytes from different regions show heterogeneity in their expression of ion channels and coupling molecules. To dissect astrocyte heterogeneity, we decode the origin of astrocytes in different brain regions. To elucidate the embryonic origins of astrocyte in a specific brain region, we applied a recombinase-based intersectional genetic strategy in mice. Astrocytes in dorsal forebrain, thalamus, hypothalamus, cerebellum/midbrain, and spinal cord are derived from Emx1-, Olig3-, Nkx2.1-, En1, Hoxb8-positive domain of the ventricular zone, respectively. In addition, intersectional approach can control the activity of astrocytes in a region-specific manner. We can demonstrate that astrocytes in different brain regions contribute to different brain functions.

研究分野：分子神経科学

キーワード：アストロサイト ゲノム編集 脳神経疾患 神経科学

1. 研究開始当初の背景

従来アストロサイトは、神経細胞が機能するための脳内環境の恒常性維持という受動的な役割が強調され、脳の情報処理という表舞台での役割は無視されてきた。しかし、グリア細胞には多くの神経伝達物質受容体が発現し、シナプス伝達によりシナプス周囲のグリア細胞の機能が変化を受ける。また、グリア細胞からは、神経細胞に向けて多様なグリア伝達物質が放出され、神経細胞の興奮性・シナプスの伝達効率を変化させることがわかってきた。アストロサイトは、神経細胞と同様に、均一な細胞集団ではなく、脳部位により形態・細胞内カルシウム緩衝能力・pH感受性など異なった特徴を持つサブタイプが存在する。しかし、神経細胞に比べ、アストロサイトの多様性がどのように生じ、その多様性の背景にどのような分子基盤があるのかは、不明である。

2. 研究の目的

本研究では、以下の2点を明らかにし、アストロサイト多様性の分子基盤解明の端緒とする。

(1)アストロサイトの誕生する神経上皮の部位・マーカー遺伝子・アストロサイトの最終的に分布する脳部位との対応地図を作成する。

(2)性質の異なるアストロサイトが局在する大脳皮質・線条体・小脳・延髄・視床下部のアストロサイトの発現遺伝子プロファイリングを行う。

3. 研究の方法

(1)アストロサイトの誕生する神経上皮の部位・マーカー遺伝子・アストロサイトの最終的に分布する脳部位との対応地図の作成

各種 Cre マウス&floxed-GLT1 マウスの GLT1 免疫染色、各種 Cre マウス & bactin: tet0-DIO-GFP マウス (tet0 プロモーターの下流に蛍光蛋白質 GFP の cDNA を逆向きに挿入したベクター。cDNA の両端には loxP, lox2722 サイトがあり、Cre により正常な向きになる) の GFP 染色により、アストロサイトの誕生する神経上皮の部位・マーカー遺伝子・アストロサイトの最終的に分布する脳部位との対応地図を作成する。

(2)大脳皮質・線条体・小脳・延髄・視床下部のアストロサイトの発現遺伝子プロファイリング

アストロサイトに発現している遺伝子は、培養や単離操作により変化することが知られている。そこで、本研究では、培養や単離などの操作を行わず、アストロサイトから mRNA を単離できる TRAP(translating ribosome affinity purification)法を用いる。各種 Cre マウス & Mlc1-tTA & bactin :tet0-DIO-GFP-L10 マウス (tet0 プ

ロモーターの下流に蛍光蛋白質 GFP とリボソーム蛋白質 L10 を融合したキメラ cDNA を逆向きに挿入したベクター。cDNA の両端には loxP, lox2722 サイトがあり、Cre により正常な向きになる) に TRAP 法を応用し、特定の脳部位のアストロサイトのリボソームに結合している RNA を精製し、発現遺伝子プロファイリングを行い、アストロサイトの脳部位特異的機能に関与している候補遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1)アストロサイトの誕生する神経上皮の部位・マーカー遺伝子・アストロサイトの最終的に分布する脳部位との対応地図の作成

各種 Cre マウスと floxed-GLT1 マウスを交配し、作成したマウス脳の GLT1 免疫染色を行い、アストロサイトの誕生する神経上皮の部位とアストロサイトの最終的に分布する脳部位との対応地図を作成した。背側前脳のアストロサイトは Emx1 発現領域から、線条体のアストロサイトは Gsh2 発現領域から、視床のアストロサイトは Olig3 発現領域から、視床下部のアストロサイトは Nkx2.1 発現領域から、小脳・中脳のアストロサイトは En1 発現領域から、脊髄のアストロサイトは Hoxb8 発現領域から、間脳より尾側の脳のアストロサイトは foxb1 発現領域から、産生されることを明らかにした。

各種 Cre マウスと bactin: tet0-DIO-GFP マウス (tet0 プロモーターの下流に蛍光蛋白質 GFP の cDNA を逆向きに挿入したベクター。cDNA の両端には loxP, lox2722 サイトがあり、Cre により正常な向きになる) 及び Mlc1-tTA マウス (アストロサイト特異的にテトラサイクリン依存性転写因子 tTA を発現しているマウス) を交配し、GFP の蛍光により、アストロサイトの誕生する神経上皮の部位とアストロサイトの最終的に分布する脳部位との対応地図を作成した。上記と同様な結果が得られた。

(2)大脳皮質・線条体・小脳・延髄・視床下部のアストロサイトの発現遺伝子プロファイリング

培養やセルソーターを経ずに、脳をホモゲナイズするだけで特定の脳部位のアストロサイトからのみ mRNA を精製するため、新規アストロサイトレポーターマウスを作成した。b-actin 遺伝子の polyA シグナルの下流に tet0-DIO-GFP-L10 (tet0 プロモーターの下流に蛍光蛋白質 GFP とリボソーム蛋白質 L10 を融合したキメラ cDNA を逆向きに挿入したベクター。cDNA の両端には loxP, lox2722 サイトがあり、Cre により正常な向きになる) をノックインしたマウス (bactin: tet0-DIO-GFP-L10) を、最新のゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) を用いて作成した。このマウスと Emx1-Cre (背側前脳の神経上皮に Cre

が発現しているマウス)及び Mlc1-tTA マウスを交配し、脳をホモゲナイズし TRAP 法で mRNA を単離したが、mRNA の回収率が低かった。その原因は、GFP-L10 のアストロサイトにおける発現量が少ないことであった。そこで、GFP-L10 の発現量を増やすため、ROSA 遺伝子座に tetO-DIO-GFP-L10 をノックインしたマウスを改良型 CRISPR/Cas 9 法を用い作成した。現在、このマウスを用い、脳部位特異的なアストロサイトの遺伝子プロファイリングを行っている。

(3) in vivo における脳部位特異的なアストロサイトの機能解析

脳部位により形態・細胞内カルシウム緩衝能力・pH 感受性・可塑性など異なった特徴を持つサブタイプに分かれることが in vitro の系を用いて報告されている。しかし、in vivo において、アストロサイトの機能に脳部位による多様性があるかどうかは不明である。

アストロサイトは細胞内カルシウム濃度を変動させることにより機能を変化させている。従って、アストロサイトの脳機能における役割を解析するためには、アストロサイト特異的に細胞内カルシウム濃度を上昇させ、脳機能における影響を解析することが必要である。本研究では、人工リガンドである clozapine-N-Oxide(CNO)投与により、視床下部におけるアストロサイト特異的に細胞内カルシウム濃度を上昇できるマウスを作製した。具体的には、tetO-FLEX-hM3Dq マウス、Nkx2.1-Cre マウス、Mlc1-tTA マウスを交配し、視床下部のアストロサイト特異的に CNO 投与により細胞内カルシウム濃度を上昇させるデザイナー受容体(hM3Dq)を発現させるマウスを作製した。作製したマウスに CNO を腹腔投与したところ、摂食量の増加と体温の上昇が観察された。しかし、背側前脳のアストロサイト特異的に細胞内カルシウム濃度を上昇させても、摂食量の増加と体温の上昇は観察されなかった。これらの結果は、異なる脳部位のアストロサイトは異なる脳機能に参与していることを示唆しており、アストロサイトの機能的多様性を in vivo で示すことに成功した。

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 13 件)

Kubo, K., Deguchi, K., Nagai, T., Ito, Y., Yoshida, K., Endo, T., Benner, S., Shan, W., Kitazawa, A., Aramaki, M., Ishii, K., Shin, M., Matsunaga, Y., Hayashi, K., Takeyama, M., Tohyama, C., Tanaka, K.F., Tanaka, K., Takashima, S., Nakayama, M., Itoh, M., Hirata, Y., Antalffy, B., Armstrong, D.D., Yamada,

K., Inoue, K., Nakajima, K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight* (in press) 査読有り
Nakamori, T., Kato, T., Sakagami, H., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Regulation of visual wulst cell responsiveness by imprinting causes stimulus-specific activation of rostral cells. *Sci Rep* 7. 42927, 2017. doi:10.1038/srep42927 査読有り

Aida, T., Nakade, S., Sakuma, T., Ishikubo, H., Usami, T., Aizawa, H., Yamamoto, T., Tanaka, K. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17. 979, 2016. doi:10.1186/s12864-016-3331-9 査読有り

Dong, Z., Shinmei, Y., Dong, Y., Inafukuu S., Fukuhara, J., Ando, R., Kitaichi, N., Kanda, A., Tanaka, K., Noda, K., Harada, T., Chin, S., Ishida, S. Effect of geranylgeranylacetone on the protection of retinal ganglion cells in a mouse model of normal tension glaucoma. *Helvion* 2. e00191, 2016. doi:10.1016/j.helivon.2016.e00191 査読有り

Perkins, EM., Suminaite, D., Clarkson, YL., Lee, SK., Lydon, AR., Rothstein, JD., Wyllie, DJ., Tanaka, K. Jackson, M. Posterior cerebellar Purkinje cells in An SCA5/SPARCA1 mouse models are especially vulnerable to the synergistic effect of loss of α -III spectrin and GLAST. *Hum Mol Genet* 25. 4448-44461, 2016. Doi: 10.1093/hmg/ddw274 査読有り

Ageta-Ishihara, N., Yamazaki, M., Konno, K., Nakayama, H., Abe, M., Hashimoto, K., Nishioka, T., Kaibuchi, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Tanaka, K., Huda, F., Hrai, H., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Kinoshita, M.

A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold that facilitates glutamate clearance. *Nature Commun* 6. 10090, 2015. doi: 10.1038/ncomms10090. 査読有り

Ishii, K., Kubo, K., Endo, T., Yoshida, K., Benner, S., Ito, Y., Aizawa, H., Aramaki, M., Yamanaka, A., Tanaka, K., Takata, N., Tanaka, K., Mimura, M., Tohyama, C., Takeyama, M., Nakajima, K. Neuronal heterotopias affect the activities of distant brain areas and lead to behavioral deficits. *J Neurosci* 35. 12432-12445, 2015. doi:10.1523/JNEUROSCI.3648-14.2015 査

読有り

Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka K.F., Sakuma, T., Yamamoto, T., Tanaka, K. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knockin in mice. *Genome Biol* 16. 87, 2015. doi: 0.1186/s13059-015-0653-x. 査読有り

Yanagisawa, M., Aida, T., Takeda, Namekata, K., Harada, T., Shinagawa, R., Tanaka, K. Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter (GLAST) expression neural cell death in a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Dis* 6. e1693, 2015. doi: 10.1038/cddis.2015.45. 査読有り

Aida, T., Yoshida, J., Nomura, M., Tanimura, A., Iino, Y., Soma, M., Bai, N., Ito, Y., Cui, W., Aizawa, H., Yanagisawa, M., Nagai, T., Takata, N., Tanaka, K.F., Takayanagi, R., Kano, M., Gotz, M., Hirase, H., Tanaka, K. Astroglial glutamate transporter deficiency increases synaptic excitability and leads to pathological repetitive behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 40. 1569-1579, 2015. doi: 10.1038/npp.2015.26. 査読有り

Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Kanamatsu, T., Sakagami, H., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Positive feedback of NR2B-containing NMDA receptor activity is the initial step toward visual imprinting: a model for juvenile learning. *J Neurochem* 132. 110-123, 2015. doi: 10.1111/jnc.12954. 査読有り

Kimura, A., Guo, X., Noro, T., Harada, C., Tanaka, K., Namekata, K., Harada, T. Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. *Neurosci Lett* 588. 108-113, 2015. doi:10.1016/j.neulet.2014.12.054. 査読有り

doi:10.1016/j.neulet.2014.12.054.

査読有り

Cui, W., Mizukami, H., Yanagisawa, M., Aida, T., Nomura, M., Isomura, Y., Takayanagi, R., Ozawa, K., Tanaka, K., Aizawa, H. Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance. *J Neurosci* 34. 16273-16285, 2014. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1465-14.2014. 査読有り

doi: 10.1523/JNEUROSCI.1465-14.2014.

査読有り

[学会発表](計 21 件)

田中 萌子、杉本 潤哉、石田紗 恵子、相田 知海、橋本 謙二、相澤 秀紀、田

中 光一 「前脳特異的グルタミン酸輸送体 GLT1 欠損マウスに見られるてんかん・神経細胞死の解析」第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30~12 月 2 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

楠瀬 未菜、平岡 優一、Pawel Obrocki、石久保 春美、宇佐見 貴子、相田 知海、田中 光一 「Rapid multiples genetic interrogation for developmental biology.」ゲノム編集学会第 1 回大会 2016 年 9 月 6~7 日 広島国際会議場(広島県・広島市)

Tanaka K., Aida T. 「High efficient CRISPR knock-in in mouse」第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20~22 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

杉山 香織、相田 知海、野村 政壽、高柳 涼一、田中 光一 「脊髄グリア型グルタミン酸トランスポーター欠損は AMPA 型受容体の過剰活性化を介して運動ニューロン死を引き起こす」第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20~22 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Tanaka K. 「Cloning-free CRISPR/Cas9 system」第 48 回日本動脈硬化学会総会 2016 年 7 月 14~15 日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

Aizawa H, Sun W, Ito Y, Toyoda S, Cui W, Aida T, Nomura M, Yanagisawa M, Takayanagi R, Tanaka K. 「Glial glutamate transporter GLT-1 determines sensitivity to the cortical spreading depression」Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2014 年 11 月 16~19 日 Washington, DC (米国)

Aida T, Yoshida J, Nomura M, Tanimura A, Iino Y, Soma M, Bai N, Ito Y, Cui W, Aizawa H, Nagai T, Tanaka N, Takayanagi R, Kano M, Goetz M, Hirase H, Tanaka K.

「Deficiency of glutamate transporter in astrocyte increases brain excitability and induces Tourette's Syndrome-like excessive repetitive behaviors in mice」Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2014 年 11 月 16~19 日 Washington, DC (米国)

Cui W, Mizukami H, Yanagisawa M, Aida T, Nomura M, Isomura Y, Takayanagi R, Ozawa K, Tanaka K., Aizawa H. 「Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive behaviors and sleep disturbance」Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2014 年 11 月 16~19 日 Washington, DC (米国)

今橋 理沙、相田 知海、張 景閔、佐久間 哲史、宇佐見 貴子、石久保 春美、Pawel Obrocki、山本 卓、田中 光一 「高速・高効率 in vivo ゲノム編集によるノックインマウス作出」第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11~13 日 パシフィコ横

浜（神奈川県・横浜市）
杉本 潤哉、伊藤 亨子、相馬 美歩、崔
万鵬、三谷 章、野村 政壽、高柳 涼一、
相澤 秀紀、田中 光一「グリア型グル
タミン酸トランスポーターGLT1の脳部位
特異的機能解析」第37回日本神経科学大
会 2014年9月11～13日 パシフィコ横浜
（神奈川県・横浜市）

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：簡便で高効率に遺伝子改変非ヒト哺乳
類動物の作製方法

発明者：田中光一・相田知海・和田悠作

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-560107

出願年月日：平成 27 年 10 月 6 日

国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：簡便で高効率に遺伝子改変非ヒト哺乳
類動物の作製方法

発明者：田中光一・相田知海・和田悠作

権利者：同上

種類：特許

番号：未定

取得年月日：平成 29 年 4 月 21 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/aud/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

田中 光一（TANAKA Kohichi）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80171750