

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05648

研究課題名(和文) グリア細胞由来の神経細胞死制御因子の同定と解析

研究課題名(英文) Screening and analysis of glial factors for neuroprotection

研究代表者

金丸 和典 (Kanemaru, Kazunori)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：10456105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイト特異的に高感度カルシウムインジケータを発現するマウスの大脳皮質に損傷刺激を与えたところ、その直後に惹起されるアストロサイトカルシウムシグナルは、予想よりも遥かに広い領域に伝播することを発見した。対照群としてカルシウムシグナル不全マウスを用いた解析ではシグナル伝播は見られなかった。さらに特異性の高い手法として、イノシトール三リン酸分解酵素発現マウスを作製し、生体内アストロサイトでもカルシウムシグナル不全であることを確認した。カルシウムシグナル伝搬領域をサンプルとした網羅的解析により発現変動因子を探索し、グリア性細胞骨格タンパク質を始めとする因子が有意に変動することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In vivo calcium imaging analysis using transgenic mice expressing ultrasensitive calcium indicator in astrocytes revealed that injury-induced astrocytic calcium signals can spread in large area of the brain. This signaling pattern was disappeared in calcium signal deficient mice. Furthermore, we developed new calcium signal deficient mice by astrocyte specific expression of inositol triphosphate hydrolyzing enzyme, IP3 5-phosphatase. Using these transgenic mice, we screened glial calcium-dependent factors for neuroprotection and found that some molecules including glial cytoskeletal proteins may responsible for neuroprotection.

研究分野：薬理学および神経科学

キーワード：アストロサイト カルシウムシグナル カルシウムイメージング 神経保護因子 脳損傷

1. 研究開始当初の背景

大規模な神経細胞死は脳機能障害を招く可能性が高く、その予防・抑制は新規治療戦略につながり得る。しかし、神経細胞死に至るメカニズムには現在でも不明な点が多い。近年の研究から、神経細胞死の制御にグリア細胞の活動が関与することが解明されつつある。細胞内カルシウム濃度上昇(カルシウムシグナル)はグリア細胞の活動の指標のひとつであり、その測定手法であるカルシウムイメージングを用いた研究が盛んに行われている。ある神経変性疾患モデルマウスでは、通常マウスとは異なる時空間動態のグリア細胞カルシウムシグナルが観察されることが報告されている。申請者らの先行研究においても、脳損傷ダメージがマウス大脳皮質グリア細胞のカルシウムシグナルを引き起こし、これが脳損傷後に起こる病変および治療過程の一部である反応性グリオシスを促進することを確認している。このように、グリア細胞カルシウムシグナルは神経細胞死制御のキープクターのひとつであると考えられる。

さらに申請者らは最近、これまでに生体内グリア細胞で観察することが難しかった微細突起のカルシウムシグナルを高い時空間分解能で解析できる遺伝子改変マウスの作出に成功し、マウス大脳皮質におけるグリア細胞の一種であるアストロサイトが生み出す新しいパターンのカルシウムシグナルを発見した。また、アストロサイトのカルシウムシグナルを狙った時期に抑制することが可能な遺伝子改変マウスも作製している。

2. 研究の目的

このようなグリア細胞研究の知見と手法・ツールを駆使し、本研究では、グリア細胞のカルシウムシグナル依存的に働く神経細胞死制御因子を新規同定・機能解析することで、神経細胞死の制御メカニズムの包括的な理解を目指す。

3. 研究の方法

病態に相当する刺激をマウス大脳皮質に与え、アストロサイトのカルシウムシグナルの伝播する範囲を解析する。その範囲をサンプリングしてトランスクリプトーム解析を行い、グリア細胞のカルシウムシグナル依存的に発現量が顕著に変化する因子群を同定する。同様の解析を申請者が既に作成済みのグリア特異的カルシウムシグナル抑制マウスで行ない、カルシウムシグナルとは関係なく発現変動する因子群を抽出、これを先の解析結果から除外することで、高精度にカルシウム依存性因子を絞り込む。絞り込んだ因子群を *in silico* (データベース)・*in vitro* (培養細胞)・*ex vivo* (培養脳スライス)・*in vivo* (動物個体) の各種実験系で詳細に解析し、神経細胞死を制御する因子を同定する。さらに、その因子の阻害剤および活性化剤を各種

脳疾患モデル動物に適用・効果を検証し、臨床応用が可能かを探る。

4. 研究成果

アストロサイト特異的に高感度カルシウムインジケータを発現するマウスの大脳皮質に二光子励起顕微鏡観察下で高出力レーザーを一部領域に照射して損傷刺激を与えたところ、その直後に惹起されるアストロサイトカルシウムシグナルは、予想よりも遙かに広い領域に伝播した。また、持続時間も明らかにした。さらに、別の侵襲刺激として、脳梗塞モデルを適用した際のカルシウムシグナルを観察したところ、同様の結果を得た。対照群としてカルシウムシグナル不全マウスを用いた解析ではそのようなシグナル伝播は見られなかった。このマウスよりも特異性の高い手法として、イノシトール三リン酸分解酵素発現マウスを作製し、脳スライス標本および生体内アストロサイトでもカルシウムシグナル不全であることを確認した。このように、マウス生体内の大脳皮質アストロサイトにおける傷害誘発性のカルシウムシグナルパターンを詳細に解析することに成功した。カルシウムシグナル伝播領域をサンプルとした網羅的解析により発現変動因子を探索し、グリア性細胞骨格タンパク質を始めとする因子が有意に変動することを見出した。カルシウムシグナル不全マウスでも損傷により変動した因子を同様に解析し、野生型マウスの変動因子との比較を行った。

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5件)

1. Yohei Okubo, Yoshinori Mikami, Kazunori Kanemaru, Masamitsu Iino: Role of endoplasmic reticulum-mediated Ca^{2+} signaling in neuronal cell death. *Antioxidants and Redox Signaling* In press (Date of Acceptance: 17-Jan-2018). 査読あり

2. 金丸和典: Ca^{2+} イメージングによるアストロサイト機能. 日本薬理学雑誌 (公益社団法人日本薬理学会) 151, 5, 2018 査読なし

3. 金丸和典: Ca^{2+} シグナルから解明するアストロサイト機能. 生化学 (公益社団法人日本生化学会) 88, 1, 2016 査読なし

4. 金丸和典: 高感度 Ca^{2+} 指示タンパク質 YC-Nano50 発現マウスを用いた生体内アストロサイトの活動解析. 日本薬理学雑誌 (公益社団法人日本薬理学会) 147, 4, 2016 査読なし

5. 金丸和典, 飯野正光: 高感度 Ca^{2+} 指示タ

ンパク質を用いた生体内アストロサイト活動の可視化解析. 生体の科学(医学書院) 66, 6, 2015 査読なし

〔学会発表〕(計 40 件)

1. Kazunori Kanemaru, Hiroshi Sekiya, Yohei Okubo, Masamitsu Iino: In vivo analysis of astrocytic calcium signaling. 第5回グリアアセンブリ国際シンポジウム「グリアアセンブリによる脳機能の発現と病態」, 東京, 2018

2. 金丸 和典:カルシウムイメージングで切り拓くアストロサイト機能. 第90回日本薬理学会年会, 2017

3. Hiroshi Sekiya, Kenji Takikawa, Kaname Sato, Miki Takagi, Nami Kitajima, Toshiko Yamazawa, Hirokazu Sakamoto, Shigeyuki Namiki, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino: In vivo imaging analysis of astrocytic neuroprotective effects in cerebral infarction. 第90回日本薬理学会年会, 2017

4. Hiroshi Sekiya, Nami Kitajima, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino: Cerebral blood flow regulation by the locus coeruleus via astrocytes. 第21回グリア研究会, 2016

5. 関谷 敬, 北島 奈美, 金丸 和典, 田中 謙二, 飯野 正光: アストロサイトを介した青斑核による脳血流制御. 第26回日本循環薬理学会, 2016

6. Hiroshi Sekiya, Nami Kitajima, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino: In vivo visualization of the glial assembly: Techniques and applications. 第3回グリアアセンブリ Workshop, 2016

7. Kazunori Kanemaru: Calcium imaging method using YC-Nano50 for the visualization of subtle and local activity of astrocytes in vivo. 2nd "Young Glia" meeting in Homburg, Germany: Japanese-German YoungGlia collaborative meeting for mutual research exchange, 2016

8. 金丸 和典, 関谷 敬, 北島 奈美, 高木 美貴, 田中 謙二, 飯野 正光: 超高感度カルシウムセンサーを発現するマウスを用いた生体内アストロサイトのイメージング解析. 第89回日本薬理学会年会, 2016

9. 関谷 敬, 北島 奈美, 金丸 和典, 田中 謙二, 飯野 正光: Functions of astrocytes studied using in vivo Ca²⁺ imaging in

non-anaesthetized mice. 第20回グリア研究会, 2015

10. 金丸 和典, 関谷 敬, 北島 奈美, 高木 美貴, 田中 謙二, 飯野 正光: 生体内アストロサイトの微細で局所的なカルシウム活動を捉えるイメージング技術. 第58回日本神経化学学会大会, 2015

11. Kazunori Kanemaru, Hiroshi Sekiya, Junji Suzuki, Kenji F. Tanaka, Masamitsu Iino: New Calcium Imaging Methods for the Visualization of Local Activities of Astrocytes in vivo. 19th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function In Health and Disease, 2015

12. 金丸 和典: New calcium imaging method for the visualization of subtle and local activity of astrocytes in vivo. 第38回日本神経科学大会, 2015

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

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

飯野 正光 (IINO, Masamitsu)

日本大学・医学部・特任教授

研究者番号: 50133939

大久保 洋平 (OKUBO, Yohei)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 40422282

関谷 敬 (SEKIYA, Hiroshi)

東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40511374

田中 謙二 (TANAKA, Kenji)
慶應義塾大学, 医学部, 准教授
研究者番号：30329700

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)
東北大学, 大学院薬学研究科, 准教授
研究者番号：00401810

(4)研究協力者

北島 奈美 (KITAJIMA, Nami)
東京大学・大学院医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし