

## 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25年5月20日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21240034

研究課題名（和文）グリア細胞の情報発信制御メカニズムと脳の可塑性に関する研究

研究課題名（英文）Mechanisms underlying gliotransmission-mediated neuronal plasticity

研究代表者

小泉 修一（KOIZUMI SCHUICHI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：10280752

研究成果の概要（和文）：グリア細胞は、電気的には非興奮性の細胞だが、ATP等のグリア伝達物質放出能を有し、これにより脳機能を制御する。これまで、グリア伝達物質放出メカニズムが不明であったが、ニューロン等と同じ開口放出という高度な方式を用いていること、このメカニズムに小胞型ヌクレオチドトランスポーター（VNUT）が必須であることを明らかとした。特に種々脳疾患時には、グリア細胞はVNUT依存的なATP開口放出系を亢進することにより、きわめて積極的に脳機能を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Although glia are non-excitabile cells, they release gliotransmitter such as ATP, and could regulate various brain functions. However, mechanisms underlying glial ATP release had remained unknown. Here we found that glia release ATP by exocytosis, for which vesicular nucleotide transporter (VNUT) has an essential role. The VNUT-dependent exocytosis was especially important in cases of various brain diseases. Taken together, glial cells control various brain functions by the VNUT-dependent ATP exocytosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2011年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2012年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：グリア細胞

## 1. 研究開始当初の背景

グリア細胞、特にアストロサイトは、殆どのシナプスを取り囲み、ニューロンの活動に即応して『グリア伝達物質』を放出することにより、ニューロンの活動を積極的かつダイナミックに制御する。グリア細胞が放出する『グリア伝達物質』として中心的な役割を果

たす分子が『ATP』である（Koizumi et al., PNAS, 2003; Newman, J. Neurosci., 2003）。ATP放出現象そのものは、グリア細胞はもちろん、他の多くの細胞でも認められ、ほぼ認知されているものの、ATP放出のメカニズムは不明のままである。これまでグリア細胞は、各種塩素イオンチャネル、ギャップ結合分子

コネキシンが形成するヘミチャネル、マキシアニオンチャネル、及び P2X7 受容体チャネル等を介し、自由拡散により ATP を細胞外に放出すると考えられていた。しかし、グリア細胞が活動依存的にニューロンとコミュニケーションを取るためには、自由拡散でなく、より積極性及び調節性の高い『開口放出』による ATP 放出機構を備えている必要がある。開口放出は、細胞内の小胞に濃縮されていた化学物質が、小胞と形質膜との融合により細胞外に放出される現象で、細胞内非常に巧みに制御されたイベントである。これまでに各種 SNARE 蛋白質のグリア細胞における存在は確認されたものの、ATP の開口放出のために必須の役者、ATP 含有小胞及び小胞型 ATP トランスポーターの分子実態は不明のままであった。しかし、分担研究者の森山らは、液胞型 ATP トランスポーターの分子実態が『VNUT』であることを見出した (Sawada et al., PNAS, 2008)。本研究は、この VNUT を切り口として、グリア細胞の情報発信メカニズムおよび脳機能調節メカニズムを解明するものである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は VNUT の視点からグリア細胞の ATP 開口放出様式・制御機構を解明しに、脳の生理機能、病態生理機能との関連性を明らかにすることである。研究期間内の到達目標は以下である。

(1) グリア細胞に VNUT が存在し、機能していることを明らかにする。

(2) VNUT 依存的な小胞からの ATP 開口放出の様式・調節機構、発現調節機序を明らかにする。

(3) VNUT 依存的な小胞からの ATP 開口放出の調節が、シナプス伝達効率等、ニューロンの機能に与える影響を明らかにする。

(4) 疾患モデル動物のグリア細胞の VNUT 発現及び機能変化を解析し、グリア細胞の情報

発信機能変調と疾患との関連性を解明する。

## 3. 研究の方法

培養アストロサイト及びマイクログリアを用いた、luciferin-luciferase ATP 測定法、Ca<sup>2+</sup>イメージング法、RNA 干渉法、蛍光 ATP 法、VNUT-RFP 法等の細胞生物学的手法を中心に据え、VNUT の機能と ATP の開口放出との関連性を明らかとする。また VNUT 欠損動物、グリア特異的 VNUT 欠損動物を作成し、丸ごとの動物を用いた解析も視野に入れる。さらにこれら遺伝子欠損動物を用いた病態モデル (特に脳虚血モデル) 作成により、脳疾患の分子病態における ATP 開口放出の役割を明らかとする。

## 4. 研究成果

(1) グリア細胞に VNUT が存在していた。

Western blotting 法及び免疫組織学的手法により、培養アストロサイト及びマイクログリアに VNUT が存在していることを明らかにした。免疫組織学的手法では、比較的大型 (200nm 以上) の小胞が VNUT 陽性小胞であった。また、secretogranin 及び chromogranin と共存していることも明らかとなった。

(2) グリア細胞からの ATP 放出が VNUT 依存的な開口放出であった。

Ionomycin 及び glutamate 刺激により惹起される ATP 放出は、Ca<sup>2+</sup>依存性かつ SNARE 蛋白依存的であった。従って、開口放出であることが示唆された。また bafilomycinA1 により小胞型 H<sup>+</sup>-ATPase を阻害、VNUT siRNA (siVNUT) により VNUT をノックダウンすると ATP の放出は有意に低下した。

以上アストロサイト及びマイクログリアは VNUT 依存的な開口放出のメカニズムにより ATP を化学情報として発信していることが明らかとなった。

さらに、VNUT-RFP を作成し、蛍光 ATP

MANT-ATP 及び quinacrine により VNUT 陽性小胞内の ATP を可視化した。Bafilomycin A1 及び siVNUT により ATP 小胞数は有意に減少した。さらに、quinacrine をと全反射蛍光顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングにより、ATP の開口放出をイメージングすることにも成功した。以上、アストロサイト及びミクログリアは、VNUT により ATP を小胞に蓄積・濃縮し、適切な刺激により調整性の海溝分泌メカニズムによりこれらを放出していることが明らかとなった。

(3) アストロサイトからの VNUT-依存的 ATP 開口放出がシナプス伝達の興奮性を制御していた。

アストロサイトは、VNUT 依存的に ATP を開口放出することにより、周辺興奮性神経のシナプス伝達を抑制的に制御していた。siVNUT による VNUT ノックダウン、さらにアストロサイト特異的な VNUT-KO 動物では、アストロサイトによるシナプス伝達抑制が認められなかった。さらに、アストロサイトに VNUT を過剰発現させると、シナプス伝達の ATP 依存的抑制作用は、顕著に強くなった。以上の結果は、VNUT 依存的な ATP 開口放出は、アストロサイトによるシナプス伝達制御において、必要かつ十分な条件であることが明らかとなった

(4) ミクログリアからの VNUT-依存的 ATP 開口放出が、病態時の ATP 放出亢進、炎症の亢進に関与していた。

脳虚血や LPS 等による外傷・炎症時には、ミクログリアの VNUT 発現が顕著に亢進することが明らかとなった。LPS 処理ミクログリアでは、ATP 放出能が亢進するが、これは完全に VNUT 依存的であった。また、VNUT を欠損したミクログリアでは、炎症時の ATP 放出亢進が認められなかった、以上の結果は、炎症時・脳障害時には、グリア細胞、特にミク

ログリアが VNUT の発現を亢進させることにより、ATP 放出能を亢進させ、引き続きおこる炎症性の応答のトリガーとなっていることが明らかとなった。

以上、本研究により以下のことを明らかとした。

(1) グリア細胞（アストロサイト及びミクログリア）は、機能的な VNUT を発現しており、この VNUT 依存的に ATP を細胞内小胞に蓄積・濃縮する。刺激により、グリア細胞は開口放出により、この ATP を化学情報として発信していた。

(2) アストロサイトは、VNUT 依存的な ATP 開口放出により、シナプス伝達を抑制的に制御していた。

(3) ミクログリアは、脳疾患（脳虚血、炎症）時に、VNUT 発現を亢進させ、この VNUT 依存的な ATP 開口放出亢進が、炎症応答のトリガーとなっていることが明らかとなった。

この様に、グリア細胞は、神経細胞や内分泌細胞同様に、積極性・調節性に富んだ開口放出のメカニズムを有し、ATP の化学情報を発信することで、脳の生理機能及び病態生理機能ともに制御していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (38 件)

1. Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Moriyama, Y. and Koizumi S., Microglia release ATP by exocytosis. **Glia**, in press. 査読有
2. Takata, F., Dohgu, S., Yamauchi, A., Matsumoto, J., Machida, T., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Sato, K., Kataoka, Y. and Koizumi, S. (2013)

- In vitro blood-brain barrier models using brain microvascular endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related phenotypes in the barrier properties. **PLoS One**, in press. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0055166.
3. Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K. and Kohsaka, S. (2013) Purinergic receptors in microglia -Functional modal shift of microglia mediated by P1 and P2 receptors-. *Glia*, 61, 47-54. 査読有doi: 10.1002/glia.22358.
  4. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K. and Koizumi, S. (2013) Secretion of matrix metalloproteinase-9 by inhibition of tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). **Cellular and Molecular Neurobiology**, 33, 47-58. 査読有 doi: 10.1007/s10571-012-9869-4.
  5. Sasaki, H., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y., Koyama, S. (2013) Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. **PROS ONE**, 8, e59778. doi:10.1371/journal.pone.0059778 査読有
  6. Sesma, JI., Kreda, SM., Okada, SF., van Heusden, C., Moussa, L, Jones, LC., O'Neal, WK., Togawa, N., Hiasa, M., Moriyama, Y., Lazarowski, ER. (2013) The vesicular nucleotide transporter (VNUT) regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. **Am J Physiol Cell Physiol**. in press. 査読有
  7. Omote, H., Moriyama, Y., (2013) Vesicular neurotransmitter transporters: an approach for studying transporters with purified proteins. **Physiology** .28, 39-50. DOI: 10.1152/physiol.00033.2012 査読有
  8. Suyama, S., Sunabori, T., Kanki, H., Sawamoto, K., Gachet, C., Koizumi, S. and Okano, H. (2012) Purinergic signaling promotes proliferation of the adult mouse subventricular zone cells. **J. Neurosci.**, 32, 9238-9247. 査読有 doi: 10.1523/JNEUROSCI.4001-11
  9. Terada, N., Saitoh, Y., Saitoh, S., Ohno, N., Fujishita, K., Koizumi, S. and Ohno, S. (2012) Microscopic visualization of ATP with luciferin-luciferase reaction in mouse skeletal muscles using "in vivo cryotechnique". **Microscopy and Microanalysis**, 15, 1030-1036. 査読有 doi: 10.1017/S1431927612001316
  10. Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S. and Koizumi, S. (2012) Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 32, 953-956. 査読有 doi:10.1007/s10571-012-9829-z.
  11. Kawamura, T., Ogawa, Y., Nakamura, Y., Nakamizo, S., Izumi, A., Nakano, H., Kabashima, K., Katayama, I., Koizumi, S., Kodama, T., Nakao, A. and Shinji Shimada. (2012) Severe irritant dermatitis with loss of Langerhans cells in a mouse model of acrodermatitis enteropathica. **J. Clin. Invest.**, 122, 722- 732. 査読有 doi: 10.1172/JCI58618.
  12. Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., Sawada, K., Moriyama, Y., Kojima, S.

- (2012) Autocrine regulation of TGF- $\beta$ 1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. **J Cell Sci.** 125, 5051-60. DOI: 10.1242/jcs.104976. 査読有
13. Shibata, K., Sugawara, T., Fujishita, K., Shinozaki, Y., Matsukawa, T., Suzuki, T. and Koizumi, S. (2011) The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice. **PLoS One**, 6, e23510. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0023510.
14. Miyaji, T., Sawada, K., Omote, H., Moriyama, Y. (2011) Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. **J Biol Chem.** 286:42881-42887. doi: 10.1074/jbc.M111.277269. 査読有
15. Moriyama, Y. (2011) Riboflavin transporter is finally identified. **J Biochem.** 150: 341-343 doi: 10.1093/jb/mvr095. 査読有
16. Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y., Gundersen, V. (2011) Functional and Anatomical Identification of a Vesicular Transporter Mediating Neuronal ATP Release. **Cereb Cortex.** electric version doi: 10.1093/cercor/bhr203. 査読有
17. Mihara, H., Boudaka, A., Sugiyama, T., Moriyama, Y., Tominaga, M. (2011) Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)-dependent calcium influx and ATP release in mouse esophageal keratinocytes. **J Physiol.** 589(Pt 14):3471-82. doi: 10.1113/jphysiol.2011.207829. 査読有
18. Koizumi, S. (2010) Synchronized Ca<sup>2+</sup> oscillations in astrocytes. **FEBS J.** 277, 286-292. 査読有 DOI: 10.1111/j.
19. Mochizuki, T., Tokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, S., Takeda, M. and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. **J. Bio. Chem.**, 284, 21257-21264. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M109.020206.
20. Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K. and Torimitsu, K. (2009) Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X<sub>4</sub> receptors. **PLoS Biology**, 7, e103. 査読有 doi: 10.1371/journal.pbio.1000103.
- 他 18 件
- [学会発表] (21 件)
1. 小泉修一、シナプス再編とグリア-ニューロン連関、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日～23 日、福岡国際会議場 (福岡市)
  2. 森山芳則、Clean biochemical approach により解明された小胞型神経伝達物質トランスポーターの新機能 (Structural and functional studies on the vesicular neurotransmitter transporters by clean biochemical approach) 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡市)
  3. 小泉修一、Effects of glial out-put signals on brain function. GCOE ニューロサイエンス、2012 年 10 月 11 日、名古屋
  4. 小泉修一、グリア細胞の情報発信と脳機能、第 6 回 Brain Science Conference、2012 年 10 月 06 日、京都ブライトンホテル (京都市)
  5. 森山芳則 Synaptic Effects of Ketones. (Third International Symposium: Dietary Therapy for Epilepsy & Other Neurological Disorders) 2012 年 9 月 20 日、Hilton Chicago Indian Lakes Resort (シカゴ アメリカ)
  6. 小泉修一、Functional modal shift of microglia mediated by astrocytes. 8th

FENS Forum of Neuroscience, 2012年7月14日～18日、International Convention Center (バルセロナ スペイン)

7. 小泉修一、Exocytosis ATP and Cellular Functions、Purine2012、2012年05月31日～2012年06月02日、福岡
  8. 森山芳則 "Mechanism and Function of Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT)" Purine 2012、2012年5月31日-6月2日、九州大学(福岡市)
  9. Koizumi, S. Mechanisms underlying gliotransmitter ATP and their dysfunctions. The 23rd bennial meeting of international society for Neurochemistry、2011年8月28日-9月2日、Megaron Athens International Conference Centre、(Athens, Greece)
  10. 森山芳則、Highlighting the Molecular Basis of Purinergic Transmission. ISN-ESN-2011 2011年8月29日、Megaron Athens International Conference Centre (アテネ ギリシャ)
  11. Koizumi, S. Mechanisms underlying upregulation of microglial P2Y6 receptors. Society for Neuroscience Meeting. San Diego Convention Center 2010. 11.14-17, (San Diego, USA)
  12. 森山芳則、Role of vesicular neurotransmitter transpoters in the metabolic reglation. 第36回国際生理学会生会大会、2009年7月29日、京都国際会館(京都市)
  13. Koizumi, S. Cell-to-cell communication mediated by extracellular nucleotides in the CNS. A lecture in commemoration of receiving prize "Japan Academy Medal" Fukuoka Purine 2009, 2009.7.23-25, ホテル・ザ・ルイガンズ福岡(福岡市)
- 他8件

[図書] (計1件)

1. リッピンコットシリーズ  
イラストレイテッド細胞分子生物学(丸善出版) ISBN978-4-621-08503-5  
訳者 森山芳則 監訳者 水島 昇  
第三章: 膜輸送 P141-168 2012年

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

1. 名称: グリア細胞の活性化抑制組成物  
発明者: 小泉修一、松川隆、藤下加代子、菅原健、柴田圭輔  
権利者: 国立大学法人山梨大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-267902  
出願年月日: 平成 24年 11月 26日

国内外の別: 国内

2. 名称: ポリアミンの化学伝達を司るトランスポーターの同定とその利用  
発明者: 森山芳則・表弘志・宮地孝明・日浅未来

権利者: 国立大学法人岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-243730

出願年月日: 平成 24年 11月 5日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI SCHUICHI)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 10280752

(2) 研究分担者

森山 芳則 (MORIYAMA YOSHINORI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号: 10150658

直野(藤下) 加代子 (NAONO KAYOKO)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 10443102

片岡 泰文 (KATAOKA YASUFUMI)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号: 70136513

篠崎 陽一 (SHINOZAKI YOUICHI)

山梨大学・医学工学総合研究部・講師

研究者番号: 10443772

繁富 英治 (SHIGETOMI EIJI)

山梨大学・医学工学総合研究部・特任助教

研究者番号: 00631061

柴田 圭輔 (SHIBATA KEISUKE)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 50580411

(3) 連携研究者

なし