

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500416

研究課題名(和文) 視床下核におけるグリア細胞の機能解析ーパーキンソン病新規治療法の開発を目指してー

研究課題名(英文) The role of olig2-derived astrocytes in subthalamic nucleus of adult mouse

研究代表者

辰巳 晃子 (Tatsumi, Kouko)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90208033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：視床下核はパーキンソン病の外科治療として広く行われている脳深部刺激療法のターゲット部位である。この部位特異的にbasic helix-loop-helix (bHLH)型転写因子であるOlig2を発現するアストロサイトが存在することを見出した。Olig2遺伝子をターゲットとしたトランスジェニックマウス(Olig2cre-GFP)を用いて片側パーキンソン病モデルマウスを作成すると、損傷側の視床下核の神経が過剰興奮し、それに応じてOlig-アストロサイトの形態がダイナミックに変化することが明らかになった。このことからパーキンソン病態下においてアストロサイトが神経活動を制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that Olig2 positive cells constitute a subpopulation of astrocytes in the adult mouse forebrain and distribute specifically in the basal ganglia including subthalamic nucleus (STN) and the globus pallidus. It is well known that these two nuclei are target areas for deep brain stimulation (DBS) in Parkinson's disease. To know the property of Olig2-astrocyte in the area, we made a hemi-Parkinson's disease model using Olig2CreER: ROSA-GAP43-EGFP double transgenic mouse. Upon apomorphine injection, the mice exhibited rotation behaviors that reflected imbalance of dopaminergic activities. In this experimental paradigm, we found that Olig2-astrocyte had more complex bushy morphologies in the activated side of the basal ganglia, especially in the STN than in the contralateral side. These findings suggest that morphologies of astrocytes are closely related to neuronal activities in the basal ganglionic nuclei.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：アストロサイト Olig2 大脳基底核 視床下核 パーキンソン氏病

1. 研究開始当初の背景

大脳基底核は、大脳皮質と視床、脳幹を結びつけている神経核の集まりであり、運動調節、認知機能、感情、動機づけや学習など様々な機能を担うとされている。大脳基底核の変性疾患の代表であるパーキンソン病は、無動、寡動、安静時振戦、などの運動症状がよく知られる。その他にハンチントン舞踏病やジストニアも、大脳基底核の異常が症状を作り出していると考えられている。これら大脳基底核の異常が多くの場合に不随意運動を示すことは、大脳基底核が随意運動の実行に重要な役割を果たすことを示している。現在パーキンソン病の外科治療として日本を含め世界中でもっとも広く行われている治療法は、大脳基底核のひとつである視床下核を標的にした脳深部刺激療法(DBS)である。これはドーパミンが不足したことで起こる脳の中の神経の働きの異常を微細な電流によって調節するものであるが、現在でもこの領域を電気刺激することで症状が軽減する理由についてはまだ不明の点が多い。また近年では、DBSが行動や情動、気分、認知機能に有害な影響を与える事が明らかになってきた。

2. 研究の目的

私達は視床下核に存在する非神経系細胞であるアストロサイトが helix-loop-helix 型の転写因子である Olig2 を発現している事を見出していた。このタイプのアストロサイトは視床下核に局在しており、部位特異的に存在している。近年アストロサイトが神経伝達と深く関与する事が云われており、視床下核特異的に存在するアストロサイトのサブタイプが視床下核における神経伝達に何らかの関与をしている事が予想できる。視床下核は現在パーキンソン病の外科治療として日本を含め世界中でもっとも広く行われている脳深部刺激療法のターゲット部位であるが、その外科治療の効果に対して不明な点も残されている。又情動などに重要な影響を与える可能性も明らかになってきている。そこで視床下核に局在する非神経系細胞アストロサイトの神経活動への制御機構を明らかにし、

アストロサイトを標的とした新しい見地からパーキンソン病の新たな治療法の開発に迫ることを目的とした。

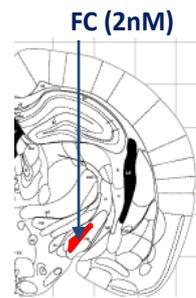
3. 研究の方法

(1) 視床下核のアストロサイトと神経細胞活動の関係解明

視床下核は随意運動に深く関与する神経核である。そこでマウスに自発的に輪回し運動を促し、運動下に於ける視床下核の神経活動とアストロサイトの関係を明らかにする。



この部位のアストロサイトが Olig2 遺伝子を発現する事から、Olig2^{CreER}: ROSA-GAP43-EGFP ダブルトランスジェニック



マウスを用いる。マウスの自発運動時における olig2-アストロサイトの活性化(又は不活性化)について、GFPを指標に免疫組織化学的に解析する。同時に、アストロサイトの機能低下が神経活動に与える影響について解析するために視床下核局所的にアストロサイトを枯渇させる。これにはアストロサイト毒である Fluorocitric acid(FC)を用いる。その後マウスの自発運動量他、行動評価を行う。

下(FC 2nM)が神経活動に与える影響について解析するために視床下核局所的にアストロサイトを枯渇させる。これにはアストロサイト毒である

Fluorocitric acid(FC)を用いる。その後マウスの自発運動量他、行動評価を行う。

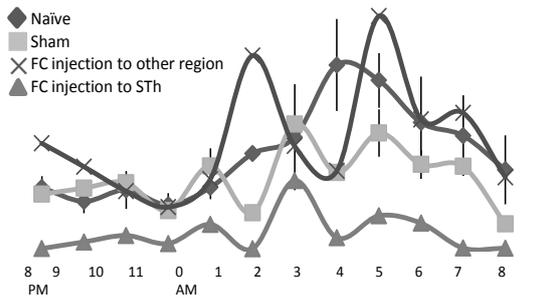
(2) 片側パーキンソン病モデルマウスの作成
上記の Olig2-GFP マウスを用いて、パーキンソン病モデルマウスを作成する。カテコールアミン神経毒である 6-hydroxydopamine (6-OHDA)を、片側の内側前脳束(MFB)又は中脳黒質部(SNc)へ微量注入する方法を用いる。注入側のドーパミン神経が脱落する事で、左右の視床下核の神経活動に左右差ができる事を利用し、左右のアストロサイトの動態を GFP を指標に精査する。

(3) (1、2)の結果を踏まえて、アストロサイトの活性亢進あるいは低下を促すことにより、パーキンソン病の運動症状を改善できるかどうか、自発運動量により評価する。また視床下核のアストロ

サイト活性操作が脳組織にどのような影響を与えたか、視床下核の神経細胞、黒質ドーパミン細胞について免疫組織化学的に評価を行う。

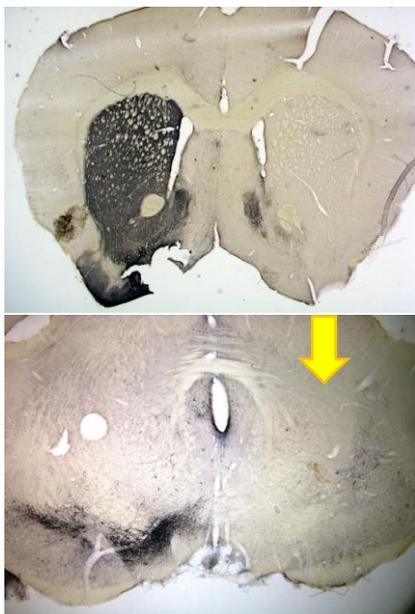
4. 研究成果

1) 視床下核のアストロサイトを枯渇する事で一部の個体で運動機能の低下が見られたが再現性に乏しい結果となった。(下グラフは、暗期のマウスの自発運動量を示す)

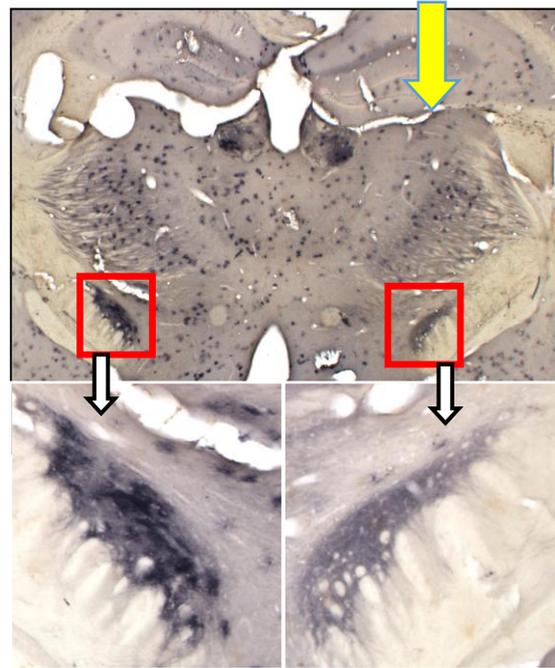


また、アストロサイト毒を注入後の神経活動を電気生理的に解析したが、有意差は見られなかった。この結果から、正常状態でのアストロサイトの枯渇の効果は個体の行動には影響されず、何らかに代償作用があると考えられた。

(2) トランスジェニックマウスを用いた片側パーキンソン氏病モデルマウスの作成は中脳黒質緻密部への6-OHDAの注入により、MFBへの注入より成功率が高かった(下図矢印が注入部の黒質緻密部)。抗Throsine hydroxylase(TH)抗体の染色により、6-OHDA注入から2週間後、黒質線条体路のドーパミン神経が片側に脱落しているのが確認できた。(上: 線条体、下: 黒質緻密部のドーパミン神経の脱落が片側のみ脱落している)



(3) 片側パーキンソン氏病モデルマウスの作成法が確立できたので、Olig2-GFPマウスを用いてモデルマウスを作成した。そして片側の黒質線条体路の脱落が完成する2週間後を目処にタモキシフェンを腹腔内に投与し、Olig2細胞に遺伝子組換えを誘導し、Olig2アストロサイトの活性化(不活性化)をGFPの発現により観察した。(下図はGFP抗体による免疫染色像。6-OHDAを注入した側(矢印)の視床下核でGFPのは発現は有為に低い)



視床下核のGFPの発現には左右差が見られた。しかし予想に反して神経の過剰興奮が起こっていると考えられる注入側でのアストロサイトに大きな変化は見られず、再現性も乏しかった。そこで神経活動の指標としてcFosによる染色を行ったが、左右の視床下核において有意差にも個体差が多く、有為な差は再現できなかった。以上の結果より、マウスの片側パーキンソン氏病モデルにおいて片側の黒質線条体路の脱落は生じるものの、その病態を擬似する神経活動の異常は生じていない事が予想できた。何らかの代償機構が働くものと考えられる。残念ながら今回の研究期間内にパーキンソン氏病モデルマウスを用いた行動評価には至らなかったが、大脳基底核に存在するアストロサイトが部位特異的なサブタイプであること、その形態変化から自発運動に関与する神経活動に関与する可能性を強く示唆できた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 2 件)

①Okuda H, Tatsumi K, Horii-Hayashi N, Morita S, Okuda-Yamamoto A, Imaizumi K, Wanaka A. OASIS regulates chondroitin 6-O-sulfotransferase 1 gene transcription in the injured adult mouse cerebral cortex. J Neurochem. 査読有り 2014、DOI: 10.1111/jnc.12736

②Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Shibukawa Y, Korekane H, Horii-Hayashi N, Wada Y, Taniguchi N, Wanaka A. The chondroitin sulfate proteoglycan tenascin-R regulates glutamate uptake by adult brain astrocytes. J Biol Chem. 査読有り 31;289(5):2620-31.2014 doi: 10.1074/jbc.M113.504787 (In Press)

(〔学会発表〕 (計 6 件、内シンポジウム 1 件)

①辰巳晃子: Voluntary exercise promotes astrogliogenesis from Olig2 cells in the subthalamic nucleus of adult mouse: 第 116 回日本解剖学会総会第 88 回日本生理学会合同(震災により誌上開催) 2011,3/28~/30、パシフィコ横浜

②辰巳晃子: Voluntary exercise promotes astrogliogenesis from Olig2 cells in some nuclei of the basal ganglia of adult mouse: 第 54 回日本神経化学会 2011,9/26~/28、加賀山代

③辰巳晃子: Voluntary exercise promotes astrogliogenesis from Olig2 cells in some nuclei of the basal ganglia of adult mouse: 第 117 回日本解剖学会総会 ~2012,3/26~/28、山梨大学

④辰巳晃子: Inhibition of astrocyte metabolisms in the basal ganglionic nuclei lowers voluntary motor activities in adult mice: 第 118 回日本解剖学会総会

2013,3/28~/30、香川国際会議場(高松)

⑤辰巳晃子: Astrocytic morphologies in the basal ganglionic nuclei are closely related to motor activities in adult mice. 第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学会大会、第 23

回日本神経回路学会 合同学会 2013,6/20~/23、京都国際会議場

⑥辰巳晃子: 神経活動にともなうアストロサイトの形態変化. 第 119 回日本解剖学会総会・シンポジウム(グリア細胞研究の最前線)2014,3/27~/30、自治医科大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

辰巳晃子 (TATSUMI,kouko)
奈良県立医科大学・医・第2解剖学講座・准教授
研究者番号:90208033

(2)研究分担者

和中明生 (WANAKA akio)
奈良県立医科大学・医・第2解剖学講座・教授
研究者番号:90210989