

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25117003

研究課題名(和文) グリアアセンブリ動作原理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of operation principle of glial assembly

研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI, Schuichi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10280752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 118,500,000円

研究成果の概要(和文)：グリアアセンブリの動作原理を明らかとする目的から、特にアストロサイトに注目し、その動作様式及び動作メカニズムを解析するとともに、さらにそれらを制御する分子をショウジョウバエを用いた系で探索した。アストロサイトグリアアセンブリは、非侵害性刺激等を高感度で感知し、脳卒中後の虚血に対する抵抗性を獲得する虚血耐性現象の誘導に必須であること、虚血中心領域を取り巻くペナンプラ領域の神経再編に必須であること、さらに神経障害性疼痛モデルではアセンブリとして一次体性感覚野のシナプス再編を行っていることを明らかとし、それぞれの責任分子、機序を解明した。また、複数のグリアアセンブリ形成・機能制御遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate operation principle of glial assembly, we have focused on astrocytes and their assembly, their mode and mechanisms of operation were analyzed. We also used a high-throughput assay system of Drosophila. Using stroke model, we have found that astrocytes as an assembly, respond to very slight ischemic stimuli so-called preconditioning, and changed their phenotypes to neuroprotective ones, leading to induction of ischemic tolerance. Furthermore, in the neuropathic pain model, astrocytes in the primary sensory cortex become synaptogenic phenotypes, and then cross the innocuous network with nocuous neuronal networks, leading to induction of mechanical allodynia. As for a high through-put assay, we identified various genes that are essential for function or development of glial assembly. Taken together, we have found various modes and mechanisms of astrocytic assembly, which greatly affect brain functions both in physiology and pathophysiology of brain functions.

研究分野：神経化学、神経薬理学、グリア科学

キーワード：アストロサイト 脳卒中 神経障害性疼痛 リモデリング ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞が脳機能に果たす役割の重要性が次々と指摘されるようになってきている。グリア細胞は、アセンブリとしてまとまって、機能性を発揮することが明らかとなってきた。この「グリアアセンブリ」の作動様式と動作原理を明らかとするため、特にアストロサイトに注目し、その作動様式、動作メカニズム、さらに動作を駆動する新しい分子を探索することを計画した。本研究により、これまでの神経細胞に軸足を置いた脳機能ではなく、アストロサイトアセンブリの視点からの新しい脳機能制御メカニズムが明らかになることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、グリア細胞がアセンブリとして脳機能を制御する作用様式及び動作原理を明らかにするものである。特に、脳内環境が変化した際のグリアアセンブリの変化を解析することで、上記の目的を達成する。到達目標は、(1) 虚血耐性現象におけるアストロサイトアセンブリの作用様式及び動作原理、(2) 神経障害性疼痛形成の原因となる一次体性感覚野 (S1) シナプス再編におけるアストロサイトアセンブリの作用様式及び動作原理を明らかにすることである。

また、グリアアセンブリの有する根源的な機能と発生原理を理解するために、シンプルな脳構造を持つショウジョウバエをモデル系に用いて、グリアサブタイプ機能や発生を制御する分子・細胞機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 虚血耐性

虚血耐性モデルには、マウス中大脳動脈閉塞モデル (MCAO) を用いた。傷害の程度は、TTC染色による傷害部位の体積算出により行った。非侵襲的虚血 (PC; preconditioning) として 15 分間の MCAO を行い、その後 1~6 日後に侵襲的虚血 (Lethal MCAO) を行い、PC の効果を解析した。グリア細胞の変動は免疫組織学的解析により、各種グリア細胞の制御は薬理的及び分子生物学的な干渉により行った。

(2) 神経障害性疼痛

神経障害性疼痛モデルには、Seltzer モデルマウスを用いた。座骨神経を部分結紮 (PSL: Partial Sciatic nerve Ligation) により惹起されるアロディニアを、von Frey テストにより数値化して痛みの指標とした。一次体性感覚野 (S1) のシナプス再編は 2 光子励起レーザー顕微鏡を用いて Thy1-GFP マウスのスパイン形状を経日的に解析することで行った。アストロサイトの Ca²⁺変動は IP3R2KO マウスで制御した。各種生化学的、

分子生物学的及び薬理学的的手法により、行動解析の結果を補完し、また介入実験を行った。

(3) ショウジョウバエアッセイ系

ショウジョウバエのグリアサブタイプ特異的なトランスクリプトーム解析より、サブタイプ特異的に発現する遺伝子を同定する。同定した遺伝子をグリアまたはグリア細胞系譜特異的にノックダウンして遺伝子機能を解析することで、グリアアセンブリの形成と機能に必須な遺伝的機構と細胞機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) アストロサイトアセンブリと虚血耐性

PC を経験すると、その後の侵襲的虚血に対する強い抵抗性が獲得される。この現象は、虚血耐性と呼ばれ、その非常に強い脳保護作用から、これまでも多くの研究が成されてきた。しかし、ほとんどの研究は、神経細胞に注目した研究であった。しかし、脳には、神経細胞の数倍も数の多いグリア細胞が存在し、脳内環境の変化をいち早く感知していることが知られている。最近、脳機能における神経-グリア細胞連関の重要性が強く指摘されるようになってきている。しかし、虚血耐性獲得におけるグリア細胞の役割に関してはわかっていない。

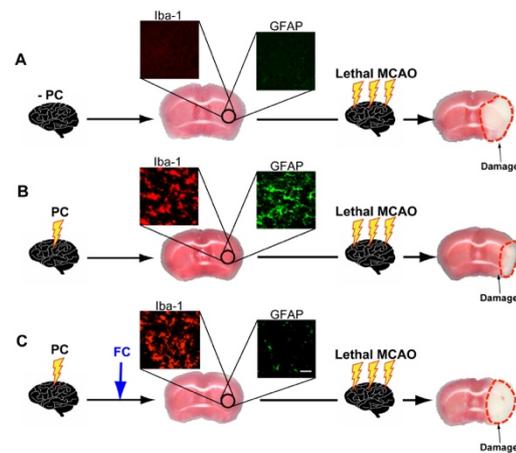


図 1 PC 後のグリアの活性化と虚血耐性

- A. コントロール(-PC)。ミクログリア(Iba-1)及びアストロサイト(GFAP)の活性化は無く、侵襲的虚血は大きな障害惹起。
- B. PC により、ミクログリアもアストロサイトも活性化し、虚血耐性が認められた。
- C. アストロサイトの活性化を FC で阻害すると、GFAP 陽性シグナルは消失し、また同時に虚血耐性も消失した。

我々は、この虚血耐性の獲得にグリア細胞の一種である、アストロサイトが非常に重要な役割を果たしていることを見出し (図 1)、その分子メカニズムの解明を行い、P2X7 受容体が中心的な役割を果たしていることを見出した。

また、P2X7 受容体の下流シグナルとして、

HIF1a がこのアストロサイト性虚血耐性に必須の役割を果たしていることを見出した。HIF1a は、酸素恒常性を制御するマスター分子であり、低酸素時に神経細胞で増加する。神経細胞での HIF1a 増加は、酸素依存的な HIF1a 分解酵素である、PHD2 が低酸素時に機能しなくなるために、HIF1a が蓄積し、これが核内に移行して種々の脳保護分子の転写を亢進する。しかし、アストロサイトには (1) PHD2 が発現しておらず、(2) 低酸素による PHD2 増加も認められなかった。脳卒中後には、アストロサイトでも HIF1a は増加する。つまりアストロサイトは、神経細胞とは全く異なるメカニズムで HIF1a を増加させ、虚血耐性を誘導していることが明らかとなった。このアストロサイトに特徴的な HIF1a 増加は、P2X7 受容体を介したシグナルにより起こっていることが明らかとなった。PC によるアストロサイトの P2X7 受容体の発現は、非常に slow-onset で持続してきた。従って、アストロサイトの HIF1a 発現も、slow-onset ではあるが、非常に持続的であり、これがアストロサイトの持続的かつ強力な虚血耐性誘導の分子基盤となっていることが示唆された (図 2)。

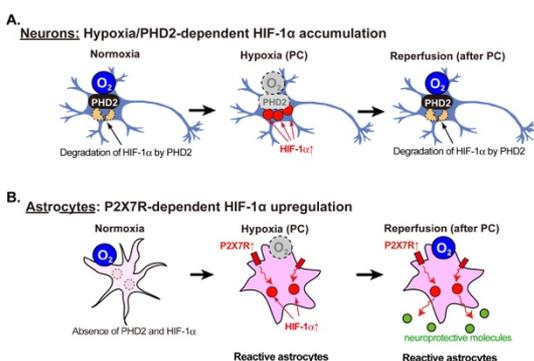


図 2 神経とアストロサイトの HIF1a 誘導機序
 A. 神経細胞の HIF1a は低酸素依存的であり、虚血により蓄積する。
 B. アストロサイトの HIF1a は、低酸素に依存せず、PC により惹起される P2X7 受容体依存して発現する。

(2) アストロサイトによるシナプス再編

神経障害性疼痛は、交通事故や手術等の物理的損傷、帯状疱疹ウイルス等により、神経細胞が損傷することが原因で誘発される難治性の疼痛である。麻薬性鎮痛薬を含む種々の薬物に抵抗性を示すことが多く、治療に難渋する疾患である。神経障害性疼痛の症状には、自発痛、熱痛覚過敏に加えて、アロディニア (異痛症) がある。本研究では特にアロディニアに注目してその発症メカニズムを S1 アストロサイトに注目して解析を行った。座骨神経部分結紮術 (PSL) 後のアロディニア発現のタイムコースを観察すると、術後一

週間程度までの徐々に疼痛が進行する「形成期」と強い疼痛が安定して認められる「慢性期」に分けられることが明らかとなった。各時期における S1 のシナプスの様子を解析すると、S1 におけるシナプス新生及び刈り込み (シナプス再編) は、形成期に特徴的に認められる現象であることが明らかとなった (図 3)。同様に各時期におけるアストロサイトの活動性を解析すると、形成期でのみ強いアストロサイトアセンブリの Ca²⁺興奮性が認められた (図 3)。

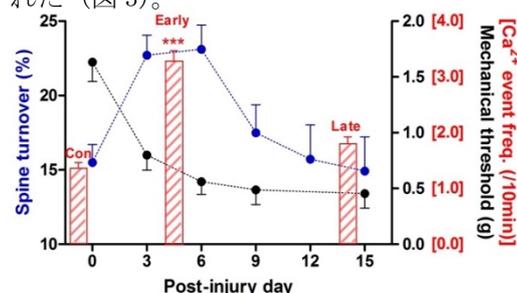


図 3 PSL 後のアロディニアのタイムコース (黒丸) と、S1 におけるシナプス再編 (青丸) 及びアストロサイト Ca²⁺興奮性 (赤) の相関

アストロサイトの Ca²⁺興奮性とアロディニアの因果関係を明らかにするため、各種分子生物学的及び薬理学的手法で Ca²⁺興奮性を阻害すると、アロディニアが抑制された。またこの Ca²⁺興奮性が IP3R2 依存的であったことから、IP3R2KO 動物を用いて PSL 術を行うと、欠損動物ではシナプス再編もアロディニアも惹起されなかった。従って、アストロサイトアセンブリの IP3R2 を介した Ca²⁺興奮性の亢進が、シナプス再編及びメカニカルアロディニアの原因であることが明らかとなった。また、このアストロサイト性シナプス再編により、本来は独立しているはずの触覚回路と痛覚回路が混線してしまうことが示唆された (図 4)。

アストロサイトアセンブリの Ca²⁺興奮性から、シナプス再編に至る分子メカニズムの検討を行った。PSL 後の Ca²⁺興奮性を亢進させた S1 アストロサイトアセンブリは、thrombospondin-1 (TSP1) を産生すること、この TSP1 が $\alpha 2 \delta 1$ 受容体に作用してシナプス再編を惹起することが明らかとなった。ナイーブマウスに TSP1 を惹起するだけで、シナプス再編と 4 週間以上持続するアロディニアも惹起されたことから、TSP1 の産生が十分条件であることが明らかとなった。

さらにアストロサイトアセンブリの Ca²⁺興奮性の引き金となる分子として、代謝型 glutamate 受容体 5 (mGluR5) を見いだした。mGluR5 は通常アダルトの成熟型アストロサイトには発現していないが、PSL により S1 アストロサイト特異的に発現した。アストロサ

イト特異的 mGluR5 欠損マウスでは、PSL によるシナプス再編もアロディニアも起きなかった (図 4)。

このようにアストロサイトの 1 種類の分子を制御することで、シナプス再編さらにアロディニア表出という、重要な脳機能が制御されることが明らかとなった。これは、脳機能制御におけるアストロサイトアセンブリの重要性を強く示唆するものである。

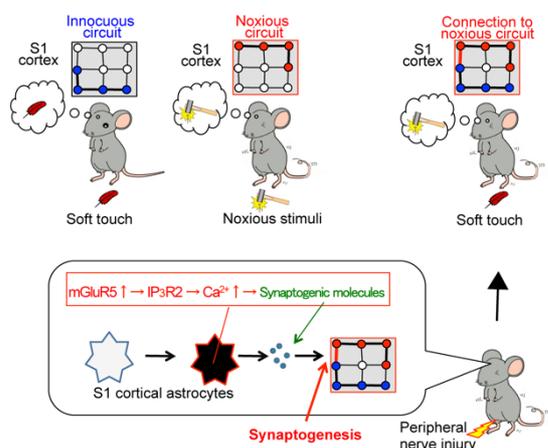


図 4 S1 アストロサイト性シナプス再編によるメカニカルアロディニア誘導の模式図

(4) グリアサブタイプ特異的に発現する遺伝子の同定と遺伝子機能の解析

ショウジョウバエ脳に存在するグリアサブタイプを特異的にラベルして遺伝子操作を行うため、従来に加えて極めて特異性の高いエンハンサーラインを新たに同定した。このエンハンサーラインを利用して、MACS 磁気細胞分離法によりシナプス領域に存在する 2 つのグリアサブタイプ、アストロサイト様グリア (ALG: astrocyte-like glia) と、被覆グリア (EG: ensheathing glia) を効率的に単離回収するシステムの構築を行った。成熟過程の脳と成熟した脳より、それぞれ ALG と EG を単離し、トランスクリプトーム解析を行い、成熟過程と成熟後の ALG と EG でそれぞれ特異的に発現する遺伝子を同定した。

(5) グリアアセンブリ形成・機能を制御する遺伝子の同定

細胞種特異的に RNAi を発現させる実験系を利用して、上記で同定した遺伝子のうち 180 遺伝子を選び、グリア細胞ならびにグリアサブタイプ特異的にノックダウンを行った。個体の発生ならびに行動 (負の重力走性) に対する影響を調べることで、グリアアセンブリの形成に必須と考えられる 20 個の候補遺伝子とグリアによる個体の行動制御に関与すると考えられる 3 個の候補遺伝子を同定した。同定した遺伝子群の中には、これまでにグリア細胞における働きが全く報告されていない、シグナル関連分子、ECM 分子、ク

ロマチン構成分子、転写因子等をコードするものが含まれており、新規性の高い研究成果をあげることができた。

(6) グリアサブタイプアセンブリ解析
成虫脳シナプス領域におけるグリアアセンブリを構成する、成虫 ALG と EG の発生過程に注目して解析を行ったところ、これらのグリア細胞が複数の異なる細胞系譜から生み出されることがわかった。遺伝学的な細胞系譜トレース実験により、特定の細胞系譜に由来するグリアは、特定の脳領域のグリアとなることが示された。その一方で、細胞系譜特異的な遺伝子操作実験により、特定の空間支配には可塑性があることがわかった。以上より、脳内のシナプス領域を支配するグリアアセンブリには可塑的な発生補償システムがあり、これによりグリアアセンブリは頑健に構築されることが示唆された。

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 16 件)

- ① Saito K, Shigetomi E, Yasuda R, Sato R, Nakano M, Tashiro K, Tanaka KF, Ikenaka K, Mikoshiba K, Mizuta I, Yoshida T, Nakagawa M, Mizuno T, Koizumi S. Aberrant astrocyte Ca²⁺ signals “AxCa signals” exacerbate pathological alterations in an alexander disease model. *Glia*. 66(5):1053-1067. (査読有) 2018, doi: 10.1002/glia.23300
- ② Koizumi S, Hirayama Y, Morizawa YM. New roles of reactive astrocytes in the brain: an organizer of cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* in press. (査読有) 2018, doi: 10.1016/j.neuint.2018.01.007
- ③ Shigetomi E, Hirayama Y, Ikenaka K, Tanaka K.F. *Koizumi S. Role of Purinergic Receptor P2Y1 in spatiotemporal Ca²⁺ dynamics in astrocytes. *J Neurosci*. 38(6):1383-1395. (査読有) 2018, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2625-17.2017
- ④ Hirayama Y, *Koizumi S. Astrocytes and ischemic tolerance. *Neurosci Res*. 126, 53-59. (査読有) 2018, doi: 10.1016/j.neures.2017.11.013.
- ⑤ Kim SK, *Nabekura J, *Koizumi S. Astrocyte-mediated synapse remodeling in the pathological brain. *GLIA*. 65(11):1719-1727. (査読有) 2017, doi: 10.1002/glia.23169
- ⑥ Shinozaki Y, Kashiwagi K, Namekata K,

- Takeda A, Ohno N, Robaye B, Harada T, Iwata T, *Koizumi S. Purinergic dysregulation causes hypertensive glaucoma-like optic neuropathy. *JCI Insight*. 2(19). e93456. (査読有) 2017, doi: 10.1172/jci.insight.93456.
- ⑦ Morizawa Y, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H, *Koizumi S. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun* 8. Article number:28. (査読有) 2017, doi:10.1038/s41467-017-00037-1
- ⑧ Shinozaki Y, Shibata K, Gachet C, Ikenaka K, Tanaka KF, *Koizumi, S. Transformation of neuroprotective astrocytes by microglia via P2Y1 receptor down-regulation. *Cell Rep*. 19 (6) 1151-1164. (査読有) 2017, doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.047
- ⑨ Hirayama Y, *Koizumi S. Hypoxia-independent mechanisms of HIF-1 α expression in astrocytes after ischemic preconditioning. *Glia*. 65(3):523-530. (査読有) 2017, doi: 10.1002/glia.23109.
- ⑩ Awasaki T, Kei Ito. Regeneration switch is a gas. *Nature*. 531:182-183. NEWS&VIEWS (査読無) 2016, doi.org/10.1038/nature17308
- ⑪ Ren Q, Awasaki T, Huang YF, Liu Z, Lee T. Cell Class-Lineage Analysis Reveals Sexually Dimorphic Lineage Compositions in the *Drosophila* Brain. *Curr Biol*. 26:2583-2593. (査読有) 2016, doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.086
- ⑫ Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, *Koizumi S. and *Nabekura J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *J Clin Invest*. 126(5):1983-1997. *Co-correspondence author. (査読有) 2016, doi: 10.1172/JCI82859.
- ⑬ Hirayama Y, Ikeda-Matsuo Y, Notomi S, Enaida H, Kinouchi H, *Koizumi S. Astrocyte-Mediated Ischemic Tolerance. *Journal of Neuroscience*. 35(9), 3794-3805. (査読有) 2015, doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4218-14.
- ⑭ Awasaki T, Kao CF, Lee YJ, Yang CP, Huang Y, Pfeiffer BD, Luan H, Jing X, Huang YF, He Y, Schroeder MD, Kuzin A, Brody T, Zugates CT, Odenwald WF, Lee T. Making *Drosophila* lineage-restricted drivers via patterned recombination in neuroblasts. *Nat Neurosci*. 17:631-637. (査読有) 2014, doi:10.1038/nn.3654
- ⑮ Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki K, Moriyama Y, Gachet C, *Koizumi S. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Scientific Reports* 4. Article number:4329. (査読有) 2014, doi:10.1038/srep04329
- ⑯ Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, Shibata K, Shinozaki Y, Kasai H, Moriishi K, Moriyama Y, *Koizumi S. Microglia release ATP by exocytosis. *Glia*. 61(8):1320-1330. (査読有) 2013, doi: 10.1002/glia.22517.
- [学会発表] (計 26 件)
- ① Koizumi, S. A network remodeling by reactive astrocytes. The Glia Section of The Korean Society for Brain and Neural Sciences. 2018 年
- ② Koizumi, S. Rewiring of Neuronal Networks by Astrocytic Ca^{2+} in the Somatosensory Cortex. CaBP20 2017 年
- ③ Morizawa, Y., Koizumi, S. Phagocytic astrocytes after brain ischemia. 第 60 回日本神経化学学会大会、2017 年
- ④ Hirayama, Y., Koizumi, S. Glia-mediated ischemic tolerance. 第 60 回日本神経化学学会大会、2017 年
- ⑤ 栗崎健、Glial cell biology in *Drosophila* brain. 第 40 回日本神経科学学会大会、2017 年
- ⑥ Koizumi, S., Kim, S, K., Nabekura, J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. X III EUROPEAN Meeting on Glial Cells in Health and Disease、2017 年
- ⑦ Kato, K., Tomura, M., Awasai, T. Adult glial architectures are established by a plastic and robust developmental strategy in *drosophila*. 第 50 回日本発生生物学会、2017 年
- ⑧ Koizumi, S. Glia-Mediated Epileptogenicity. The 5th congress of AsCNP. 2017 年
- ⑨ Awasaki, T., Umeki, Y., Tomura, M., Kato, K. Replacement of the glial architecture in *Drosophila* central brain during metamorphosis 12th,

- Japanese *Drosophila* Research conference 2016 年
- ⑩ Koizumi, S. Ischemic tolerance mediated by microglia-astrocytes communications. ASPN2016, 2016 年
- ⑪ Kato, K., Awasaki, T. Replacement of the glial architecture in *Drosophila* central brain during metamorphosis, 57th Annual *Drosophila* Research Conference, 2016 年
- ⑫ Awasaki, T. Remodeling of glial assembly in *Drosophila* brain during metamorphosis, Tohoku University セミナー、2015 年
- ⑬ Awasaki, T., Umeki, Y., Tomura, M., Kato, K. Remodeling of glial assembly in *Drosophila* brain during metamorphosis. The 38th Annual meeting of the Japan neuroscience society, 2015 年
- ⑭ Koizumi, S., Manipulation and visualization of physiological and pathophysiological functions of Glia., XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. 2015 年
- ⑮ Koizumi, S. Gliotransmission by ATP and its pathophysiological consequences. Fifth Brazilian Purine Club Meeting- II International Congress of Purinergic Signalling in South America. 2015 年
- ⑯ Kato, K., Awasaki, T. Remodeling of Glial Assembly in *Drosophila* Brain During Metamorphosis, The 62nd NIBB Conference "Force in Development, 2014 年
- ⑰ Koizumi, S. Astrocytic phagocytosis after brain ischemia. KIST 国際シンポジウム 2014 年
- ⑱ 栗崎健、グリア細胞による神経軸索の貪食・助教を介した脳神経ネットワークのリモデリング、第 87 回日本生化学会大会、2014 年
- ⑲ Koizumi, S. Astrocytes and Ischemic tolerance. Conference on Glial Biology in Medicine. 2014 年
- ⑳ 伊藤啓、栗崎健、もう一つのグリアアセンブリ：ショウジョウバエのグリア細胞種と機能分類、第 57 回日本神経化学会大会・第 36 回日本生物学的精神医学会合同大会、2014 年
- ㉑ Kato, K., Umeki, Y., Awasaki, T. Scrap and rebuild glial assembly in *Drosophila* brain during metamorphosis, The 37th Annual meeting of the Japan neuroscience society, 2014 年
- ㉒ Koizumi, S. Astrocytic ATP and

ischemic tolerance. The 12th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry、2014 年

- ㉓ Koizumi, S. Ischemic tolerance mediated by the glia purinergic system. Purine2014, 2014 年
- ㉔ 梅木優子、栗崎健、ショウジョウバエ脳における変態期のグリア細胞組織網のリモデリング、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年
- ㉕ Koizumi S. Glia-mediated ischemic tolerance. The 17th International Conference on Korean Medicine. 2013 年
- ㉖ 小泉修一、Microglial ATP exocytosis and its pathophysiological consequences. XI European Meeting on glial cells in Health and Disease (第 11 回欧州グリア学会) 2013 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：緑内障モデル非ヒト哺乳動物
 発明者：柏木賢治、篠崎陽一、小泉修一
 権利者：国立大学法人山梨大学
 種類：特許
 番号：未定
 出願年月日：未定
 国内外の別：国内
 ○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pharmaco/1-Japanese/home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 修一 (KOIZUMI, Schuichi)
 山梨大学・大学院総合研究部・教授
 研究者番号：10280752

(2) 研究分担者

伊藤 啓 (ITO, Kei)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
 研究者番号：00311192
 栗崎 健 (AWASAKI, Takeshi)
 杏林大学・医学部・教授
 研究者番号：60359669

(3) 連携研究者

繁富 英治 (SHIGETOMI, Eiji)
 山梨大学・大学院総合研究部・助教
 研究者番号：00631061