

令和元年9月3日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07064

研究課題名(和文) グリア細胞のシンタキシン1による神経細胞 グリア細胞間相互作用の解明

研究課題名(英文) Role of syntaxin1 in glial cells on the interaction between neurons and glial cells

研究代表者

小藤 剛史 (Kofuji, Takefumi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：40365200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シンタキシン1(STX1AおよびSTX1B)欠損マウスを用いて、グリア細胞におけるSTX1の機能に関する因子の同定とSTX1の生理機能について検討した。STX1B欠損グリア細胞において、STX1との相互作用のあるMunc18-1やGABAの取込に関するGAT1、GAT3の発現が低下しており、GABAの取込活性も低下していた。また、STX1B欠損グリア細胞へのグリシンの取込が増加していた。これらの異常は、STX1A欠損グリア細胞では認められなかった。また、グリア細胞でのSTX1欠損は、神経細胞の形態やシナプス形成に影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが作製したSTX1遺伝子欠損マウスは様々な行動異常を示すが、STX1が神経細胞に加えてグリア細胞にも発現していることから、グリア細胞におけるSTX1の機能を明らかにすることは、高次脳機能の理解のために非常に有用である。本研究において、グリア細胞におけるSTX1がGABAトランスポーターによるGABAの取込を介して、細胞外環境の興奮性と抑制性のバランスを調整していることが明らかとなった。グリア細胞のSTX1機能の一端が明らかになったことは、STX1欠損が惹起する行動異常の基盤機構を理解する一助となり、神経疾患の解明につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：We explored some factors relating to the roles of glial STX1, and examined the physiological functions of glial STX1 using STX1A-KO or STX1B-KO mutant mice. We found that expression of Munc18-1 directly interacting with STX1 or GABA transporter, such as GAT1 or GAT3, was decreased in STX1B-KO glial cells. GABA uptake through above transporters was reduced in STX1B-KO glial cells. On the other hand, above functions in STX1A-KO glial cells were normal unlike STX1B-KO. Morphology of neurons and synaptic formation were not affected by lack of STX1 gene in glial cell

研究分野：神経科学

キーワード：シンタキシン1 グリア細胞 神経伝達物質 トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シタキシン 1 (STX1) はシナプス小胞等の開口放出の中心的役割を担う分子の一つで、多くが神経細胞の形質膜上に存在している。STX1 は神経細胞からの神経伝達物質やペプチドホルモンなどの分泌を制御し、神経修飾物質の輸送体の活性やその局在の調整などにも関与している。さらに、高次脳機能につながるシナプス可塑性への関与も示唆されている。

STX1 には異なる遺伝子から産出されるシタキシン 1A (STX1A) とシタキシン 1B (STX1B) の2種類のアイソフォームが存在する。両者は高いアミノ酸相同性を示し、脳内発現領域や細胞内分布がほぼ同一であることから、神経伝達物質の開口放出を維持するために同等の働きをしていると考えられてきた。申請者らは STX1 遺伝子欠損マウス (STX1A-KO と STX1B-KO) を作製し、神経伝達物質の放出に関する生理機能の解析を行い、以下の結果を得た。(1) STX1A-KO と違い、STX1B-KO は生後致死で痙攣を示すものが多く、中枢神経の形態的異常があることを明らかにした (Fujiwara et al. J Neurosci 2006; Kofuji et al. J Neurochem 2014)。(2) STX1A-KO と STX1B-KO\* のいずれも情動行動異常を示すが、その他の行動で異常を示すものには差があり、STX1A-KO と STX1B-KO は異なる神経疾患を模擬できることを明らかにした (Fujiwara et al. Eur J Neurosci 2010 & J Neuroendocrinol 2011, J Neurochem 2016、\*はヘテロマウスにおいて)。(3) STX1A はモノアミン性あるいはペプチド性シナプスの遅い神経伝達を制御しており、STX1B はグルタミン酸や GABA といった神経伝達物質の放出による速い神経伝達を制御していることを明らかにした (Fujiwara et al. J Neurosci 2006; Mishima et al. J Neurosci 2012 & PLoS One 2014)。(4) STX1A-KO 神経細胞と違い、STX1B-KO 神経細胞は培養下で生存に脆弱性があること、野生型 (WT) または STX1A-KO グリア細胞によって STX1B-KO 神経細胞の生存が支持されること、この生存支持効果は STX1B-KO グリア細胞では弱いことを明らかにした (Kofuji et al. J Neurochem 2014)。(5) STX1B 欠損によるグリア細胞の生存支持効果の低下は神経栄養因子の一つである BDNF の分泌が低下していることが一因であることを明らかにした (Kofuji et al. J Neurochem 2014)。(6) STX1 がグリア細胞にも発現しており、そのアイソフォームが主に STX1B であることを明らかにした (Kofuji et al. J Neurochem 2014)。また、遺伝子欠損マウスの結果に関連する結果として、(7) 自閉性障害患者において、STX1A mRNA 発現量の変動が非常に大きいこと、(8) STX1A のスプライスバリエントがグリオーマにおいてグルコース輸送体 (GLT) の膜局在を制御していること (Nakayama et al. J Biol Chem 2004) を得ていた。

上記のように STX1 の機能に関する知見の多くは神経細胞におけるものである。一方で、申請者らは (4) (5) (6) において STX1 がグリア細胞にも発現していること、その STX1 がグリア細胞からの BDNF 分泌を制御することで、神経細胞の生存に直接関与することを報告した。しかし、グリア細胞における STX1 の機能はほとんど明らかになっていない。グリア細胞は、栄養・成長因子の供給や構造的な支持などといった主に脳環境の維持をしていると考えられてきた。しかし近年、グリア細胞は神経細胞の活性やシナプス形成の制御など、脳の活動に積極的に関与することが明らかになってきている。そこで、STX1 のグリア細胞における新規の機能を明らかにすることを旨とする。

### 2. 研究の目的

シタキシン 1 (STX1) には STX1A と STX1B の2つのアイソフォームがあり、両者ともに多くが神経細胞の形質膜上に発現していることから、開口放出において同等の機能を有すると考えられてきた。申請者らは両アイソフォームの遺伝子欠損マウス (STX1A-KO と STX1B-KO) を作製し、その機能解析を行ったところ、STX1A がモノアミン性あるいはペプチド性シナプスの遅い神経伝達を制御しており、STX1B はグルタミン酸や GABA といった神経伝達物質の放出による速い神経伝達を制御することを確認した。また、STX1A あるいは STX1B の遺伝子欠損は、個体レベルでも異なる学習や情動行動の異常を惹起することがわかった。一方で、STX1 がグリア細胞にも発現しており、神経細胞の生存に関わる神経栄養因子の一つである BDNF のグリア細胞からの分泌に STX1 が直接関与することを明らかにした。近年グリア細胞は、栄養・成長因子の供給や構造的な支持などの脳環境の維持に加えて、神経細胞の活性やシナプス形成の制御などといった積極的脳活動に関与することが明らかになってきた。したがって、両遺伝子欠損マウスが示した行動異常は、神経細胞での STX1 欠損だけでなく、グリア細胞での STX1 欠損も関与していると考えられる。しかし、グリア細胞における STX1 の機能はほとんどわかっていない。そこで本研究では、グリア細胞における STX1 の機能を明らかにすることを目的に以下を検討する。(1) グリア細胞で STX1 が機能するために同時必須となる関連因子の同定を行う。(2) グリア細胞の STX1 が分泌および回収に関与している因子群の同定を行う。(3) グリア細胞による神経細胞の形態やシナプス形成制御に対して STX1 が関与するかを検討する。

### 3. 研究の方法

グリア細胞における STX1 の機能解析を行うにあたり、各遺伝子型 (WT および STX1A-KO、STX1B-KO) グリア細胞が必要である。生後 0-2 日齢の各遺伝子型マウスの海馬および皮質からグリア細胞 (アストロサイト) を分散培養し、一度継代したものを解析に用いた。GFAP の発現を指標に 97% 以上がアストロサイトであることを確認した。また、円滑な研究推進のために、凍結保存を行った細胞も用いた。

(1) グリア細胞における STX1 の機能と関連する因子の同定

STX1 との機能の関連が考えられる因子は STX1 欠損により発現が影響される可能性がある。そこで、各遺伝子型グリア細胞からの抽出液を用いて候補因子の発現をウェスタンブロットティング(WB)で解析する。また、培養グリア細胞に対する細胞免疫染色(ICC)による検討も行う。候補因子として、開口放出に関わる因子や神経伝達物質等の回収に関わる因子、栄養供給に関わる因子等について検討し、グリア細胞における STX1 の機能に関連する因子を同定する。

(2) グリア細胞における STX1 が分泌および回収に関わる因子群の同定

グリア細胞が神経細胞の活性やシナプス形成の制御に関与する手段の一つとして、栄養因子群の分泌が考えられる。栄養因子群のひとつである BDNF の分泌は STX1 欠損により傷害され、その結果 BDNF が細胞内に蓄積することが WB および ICC により確認できる。そこで、各遺伝子型グリア細胞からの抽出液を用いて候補因子の発現を WB で解析する。また、培養グリア細胞に対する ICC による検討を行う。mRNA 発現量自体が変動している可能性もあるため、各因子の mRNA 量も RT-PCR により検討する。さらに、培養液中への候補因子の分泌量やグリア細胞内への回収量などを ELISA や EIA、放射性標識因子の挙動によって推定する。分泌の候補因子として、神経栄養因子や成長因子、オピオイドペプチド、回収の候補因子として前者に加えて ATP や神経伝達物質、神経修飾物質等について検討し、グリア細胞における STX1 が分泌および回収に関わる因子を同定する。

(3) グリア細胞によるシナプス形成制御に対する STX1 の関与の検討

グリア細胞上で神経細胞を培養すると生存効果を発揮し、グリア細胞なしの培養と比較して神経突起が発達し、神経細胞間の結合が増加する。そこで、STX1 欠損による神経細胞の形態やシナプス形成への影響を検討する。各遺伝子型グリア細胞上で WT 神経細胞を低密度で培養し、神経細胞の形態への影響を調べる。MAP2 および Tau に対する抗体を用いた神経突起の ICC により神経突起数、突起の分岐、長さなどを解析する。また、シナプスマーカーであるシナプトフィジンに対する抗体を用いた ICC によりシナプス数等を検討する。

#### 4. 研究成果

各遺伝子型のグリア細胞を用い、グリア細胞における STX1 の機能と関連する因子の同定を試みた。STX1 と相互作用することが知られている開口放出に関わる因子の多くで発現量の変化はなかったが、STX1B-KO グリア細胞において Munc18-1 の発現の低下が認められた。ヒト遺伝子解析により Munc18-1 と難治性のがんとの関連が示唆されているが、これは神経細胞での Munc18-1 機能によると思われる。しかし、グリア細胞における Munc18-1 機能も重要である可能性が示唆された。また、グリア細胞から分泌される栄養因子群に関して、STX1B-KO グリア細胞において BDNF と neurotrophin-3 (NT-3)の細胞内での発現の増加、すなわち蓄積が見られた。そこで、グリア細胞からの分泌量を測定したところ、NT-3 の分泌量に各遺伝子型での顕著な違いは認められなかった。これは、NT-3 によって STX1B-KO 神経細胞の生存脆弱性が改善されることと矛盾するが、生存効果としては BDNF の方がより高いことを推測させる結果であった。さらに、グリア細胞への回収や取込に関わる因子としては、GABA の取込に関わる GAT1 と GAT3 の発現が STX1B-KO グリア細胞で低下していた。両者の発現はグリア細胞全体で低下しており、顕著な局在の変化は認められなかった。グリア細胞への GABA の取込を測定したところ、STX1B-KO グリア細胞で WT と比較して 70%ほどに低下していた(図 1)。この GABA の取込は GAT1 阻害薬である NNC-711、GAT3 阻害薬である SNAP-5114 の両者で阻害された。また、GABA 再取込

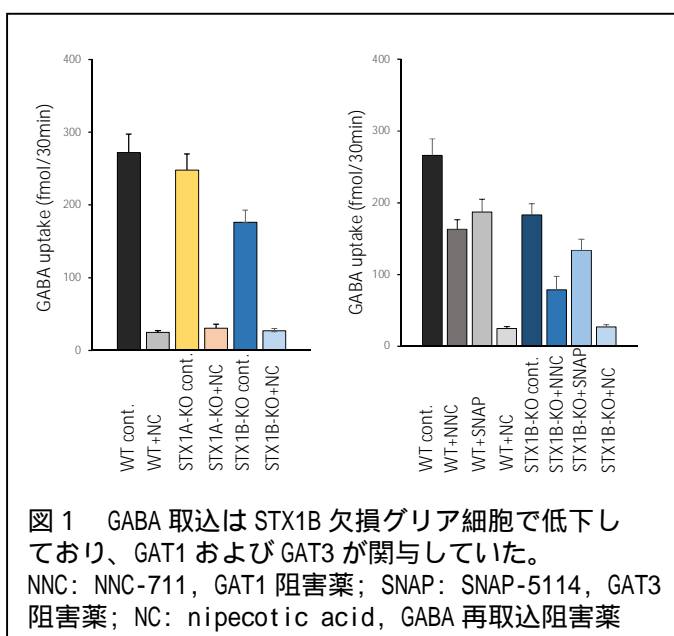


図 1 GABA 取込は STX1B 欠損グリア細胞で低下しており、GAT1 および GAT3 が関与していた。NNC: NNC-711, GAT1 阻害薬; SNAP: SNAP-5114, GAT3 阻害薬; NC: nipecotic acid, GABA 再取込阻害薬

阻害薬であるニペコチン酸がより大きな阻害効果を示すことから、他のトランスポーターが関与している可能性がある。STX1B-KO は痙攣症状をきたすが、STX1B-KO グリア細胞で GABA 取込が低下することは、細胞外の GABA 濃度の上昇につながり、興奮過多による痙攣の表現型とは矛盾する。しかし、グリシンの取込を検討したところ、STX1B 欠損グリア細胞において取込が増加していた。一方、グルタミン酸の取込に差は認められず、GLT1、GLAST の発現にも差はなかった。したがって、STX1B-KO の痙攣症状は、興奮性と抑制性のバランスが崩れることで引き起こされていると考えられる。さらに、グリア細胞上で培養した WT 神経細胞の形態を検討したところ、主要な神経突起数への STX1 の関与は見られなかった。また、プレシナ

プスマーカーであるシナプトフィジンの斑文数を解析したが、各遺伝子型で顕著な差はなく、シナプス形成への影響はなかった。

以上の結果から、グリア細胞における STX1A と STX1B はいずれも神経細胞の形態やシナプス形成に関与していなかった。一方、STX1B が GABA やグリシンといった抑制性神経伝達物質の取込を制御しており、細胞外環境の興奮性と抑制性のバランスを調整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〕(計3件)

Fujiwara T, Kofuji T, Mishima T, Akagawa K. Syntaxin1B contributes to regulation of the dopaminergic system through GABA transmission in the CNS. *Eur J Neurosci* 46 (2017) 2867-74 査読有

Kofuji T, Hayashi Y, Fujiwara T, Sanada M, Tamaru M, Akagawa K. A part of patients with autism spectrum disorder has haploidy of HPC-1/syntaxin1A gene that possibly caused behavioral disturbance as in experimentally gene ablated mice. *Neurosci letters* 644 (2017) 5-9 査読有

Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Akagawa K. Unusual social behavior in HPC-1/syntaxin1A knockout mice is caused by disruption of the oxytocinergic neural system. *J Neurochem* 138 (2016) 117-23 査読有

### 〔学会発表〕(計16件)

Fujiwara T, Kofuji T, Mishima T, Akagawa K. Synxtain1B contributes to regulation of the dopaminergic system through GABA transmission in the CNS. FENS2018, July 7-11 2018, Berlin

Kofuji T, Fujiwara T, Mishima T, Akagawa K. Role of syntaxin1 in glial cells on providing supportive functions for neurons through trophic support and transmitter uptake. FENS2018, July 7-11 2018, Berlin

Mishima T, Fujiwara T, Kofuji T, Terao Y, Akagawa K. Involvement of syntaxin 1B in the fever-associated epilepsy syndromes: Behavioral and neuronal phenotype of syntaxin 1B gene-ablated mice. FENS2018, July 7-11 2018, Berlin

三嶋竜弥、藤原智徳、小藤剛史、寺尾安生、赤川公朗：シntaxin 1B の熱性けいれんへの関与、第95回日本生理学会大会、平成30年3月28日 - 30日、高松

藤原智徳、小藤剛史、三嶋竜弥、寺尾安生、赤川公朗：HPC-1/syntaxin 1A 欠損マウスにおける社会行動障害の解析、第95回日本生理学会大会、平成30年3月28日 - 30日、高松

Fujiwara T, Kofuji T, Mishima T, Terao Y, Akagawa K, HPC-1/syntaxin1A regulates reciprocal feedforward interactions between DA and OXT systems, which, in turn, affect social behavior. *Neuroscience2017*, November 11-15 2017, Washington D.C.

Kofuji T, Fujiwara T, Mishima T, Sanada M, Hayashi Y, Tamaru M, Terao Y, Akagawa K, Disturbance of HPC-1/syntaxin1A gene expression and variation of its gene number are highly associated with autism spectrum disorder. *Neuroscience2017*, November 11-15 2017, Washington D.C.

Mishima T, Fujiwara T, Kofuji T, Terao Y, Akagawa K, A study on the behavioral and neuronal phenotype of syntaxin 1B gene-ablated mice: Involvement of syntaxin 1B in the feve-associated epilepsy syndromes. *Neuroscience2017*, November 11-15 2017, Washington D.C.

小藤剛史、藤原智徳、三嶋竜弥、赤川公朗：Seizure phenotype in syntaxin1B gene ablated mice was associated with GABAergic system. 第60回日本神経化学会、平成29年9月7日 - 9日、仙台

三嶋竜弥、藤原智徳、小藤剛史、寺尾安生、赤川公朗：シntaxin 1 B 遺伝子欠損マウスの行動・神経機能の表現型解析：シntaxin 1 B の熱性けいれんへの関与、第40回日本神経科学大会、平成29年7月20日 - 23日、千葉

Kofuji T, Hayashi Y, Fujiwara T, Tamaru M, Akagawa K, Five cases of autism spectrum disorder with syntaxin1A gene haploid. 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, May 11-14 2017, Fukuoka

Tanaka S, Kato E, Kofuji T, Fukushima T, Hori Y, NMDA receptor 2B subunit and BK channel may affect mechanical allodynia by regulating the activity of enkepalinergic neurons in the spinal dorsal horn. *Experimental Biology* 2017, April 22-26 2017, Chicago

三嶋竜弥、藤原智徳、小藤剛史、寺尾安生、赤川公朗：シntaxin 1B 遺伝子欠損マウスのけいれん表現型の解析、第94回日本生理学会大会、平成29年3月28日 - 30日、浜松

小藤剛史、藤原智徳、真田ますみ、三嶋竜弥、林優子、田丸政男、赤川公朗：Disturbance of HPC-1/syntaxin1A gene expression and its CNV cause autistic spectrum disorder, 第59回日本神経化学会、平成28年9月8日 - 10日、福岡

Fujiwara T, Kofuji T, Mishima T, Hayashi Y, Tamaru M, Akagawa K, HPC-1/syntaxin1A is one of causing gene for autistic spectrum disorder. 第39回日本神経科学大会、平成28年7月20日 - 22日、横浜  
林優子、小藤剛史、田丸政男、赤川公朗：Syntaxin1A遺伝子の欠損を認めた自閉症スペクトラムの5症例、第58回日本小児神経学会学術集会、平成28年6月3日 - 5日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

三嶋 竜弥 (MISHIMA, Tatsuya)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：40317095

斎藤 綾子 (SAITO, Ayako)

杏林大学・医学部・実験助手

研究者番号：80424109