

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02216

研究課題名（和文）線条体の回路特異的アストロサイトーニューロン連関の役割

研究課題名（英文）Circuit-specific neuron-astrocyte cross-talk in the striatum

研究代表者

田中 光一（Tanaka, Kohichi）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80171750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：アストロサイトは、脳の情報処理にとって神経細胞に勝るとも劣らない重要な細胞である。しかし、神経細胞に比べアストロサイトの多様性がどのように脳高次機能に關与するかは不明である。本研究では、大脳基底核に着目し、直接路及び間接路と連関するアストロサイト特異的に発現するマーカー遺伝子を同定した。これらのマーカー遺伝子とゲノム編集技術を組み合わせることにより、アストロサイトのサブタイプ特異的機能の解明が加速される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、アストロサイトの各サブタイプが特定の神経回路において果たす役割の解明が促進され、アストロサイトの機能制御による脳機能制御という新しい研究分野を開拓できる。さらに、本研究は、アストロサイトの異常が示唆されているハンチントン病・アルツハイマー病・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患やうつ病・自閉症・統合失調症などの精神疾患の病態解明及び新規治療薬の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Astrocytes were thought as passive support cells, bringing nutrients to and removing wastes from the neurons. Recent studies challenged this view and demonstrated that astrocyte plays a critical role in information processing in the brain. However, it is unclear how astrocyte is involved in higher brain functions. In this study, we focused on the basal ganglia and identified specific marker genes of striatal astrocytes that are associated with direct and indirect pathways. The combination of these marker genes and genome editing techniques will accelerate the elucidation of circuit-specific functions of astrocytes.

研究分野：神経科学

キーワード：アストロサイト 線条体 直接路 間接路 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来アストロサイトは、神経細胞が機能するための脳内環境の恒常性維持という受動的な役割が強調され、脳の情報処理という表舞台での役割は無視されてきた。しかし、グリア細胞には多くの神経伝達物質受容体が発現し、シナプス伝達によりシナプス周囲のグリア細胞の機能が変化を受ける。また、グリア細胞からは、神経細胞に向けて多様なグリア伝達物質が放出され、神経細胞の興奮性・シナプスの伝達効率を変化させることがわかってきた。アストロサイトは、神経細胞と同様に、均一な細胞集団ではなく、脳部位により形態・細胞内カルシウム緩衝能力・pH感受性など異なった特徴を持つサブタイプが存在する。しかし、神経細胞に比べ、アストロサイトの多様性がどのように脳高次機能に関与するかは、不明な点が多い。

最近、Araque のグループは、大脳基底核内の主要な神経回路である直接路と間接路に特異的に連関するアストロサイトがあることをスライス標本を用いて明らかにした (Science 349:730, 2015)。直接路と間接路の投射神経細胞は、それぞれドーパミン D1 受容体(D1R)と D2 受容体(D2R)を特異的に発現する。直接路と連関するアストロサイト(D1R-As)は、D1R を発現する神経細胞から活動依存的に放出されるエンドカンナビノイド(eCB)にのみ応答し(細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇)、グルタミン酸(Glu)を放出し、周囲の D1R 陽性神経細胞へ投射しているシナプス終末に作用し、グルタミン酸の放出を抑制する。間接路と連関するアストロサイト(D2R-As)は、D2R 陽性神経細胞から放出される eCB にのみ応答し、周囲の D2R 陽性神経細胞へ投射しているシナプス終末からのグルタミン酸の放出を抑制する。D1R-As と D2R-As は、アストロサイトの異なるサブタイプだと考えられている(図1)。

しかし、D1R-As 及び D2R-As の形態学的・分子生物学的違いやそれらの活性化が大脳基底核の主要な機能である運動制御にどのような役割をはたしているか不明である。

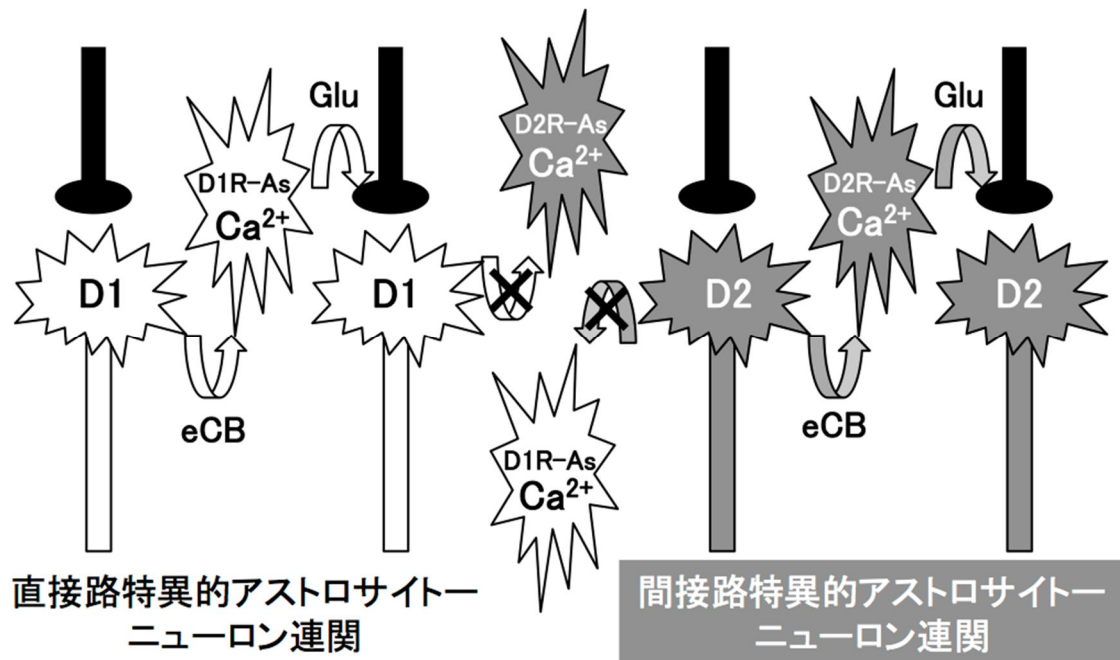


図1 直接経路・間接経路特異的アストロサイトーニューロン連関

2. 研究の目的

本研究では、以下の2点を明らかにし、直接路及び間接路特異的アストロサイトーニューロン連関の運動機能における役割を個体レベルで解明する。

- (1) D1R-As 及び D2R-As の違いを形態学的・分子生物学的に明らかにする。
- (2) D1R-As と D2R-As を特異的に活性化し、運動機能における影響を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、D1R および D2R 陽性投射ニューロンを刺激した際に活性化されるアストロサイトのみに GFP-L10(蛍光蛋白質 GFP とリボソーム蛋白質 L10 の融合蛋白質)を発現するマウスを作成し、TRAP法 (translating ribosome affinity purification)により D1R-As と D2R-As の発現遺伝子プロファイリングを行い、D1R-As と D2R-As のマーカー遺伝子を同定する。同定したマーカー遺伝子座を用い、D1R-As 及び D2R-As 特異的に蛍光タンパク質やデザイナー受容体などを発現するマウスを作成し、D1R-As 及び D2R-As の形態学的・分子生物学的違いやそれらの活性化が運動機能に及ぼす影響を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) D1R-As および D2R-As のマーカー遺伝子の検索
D1R-As あるいは D2R-As は直接路あるいは間接路の神経細胞を活性化した時にのみ活性化される。

マーカー遺伝子を同定するためには、活性化したアストロサイトにのみ発現する mRNA を精製する必要がある。アストロサイトが活性化されると c-fos が上昇することが知られている。そこで、c-fos の上昇したアストロサイトのみ mRNA 精製用の GFP-L10 (蛍光蛋白質 GFP とリボソーム蛋白質 L10 の融合蛋白質) が発現する新規アストロサイトレポーターマウスを作成した。具体的には、アストロサイト特異的に発現するグルタミン酸トランスポーター-GLT1 の polyA シグナルの下流に loxP-STOP-loxP-GFP-L10 (loxP-STOP-loxP カセットの下流に GFP-L10 の cDNA を挿入したベクター) をノックインしたマウス (GLT1-LSL-GFP-L10 マウス) を作成し、Fos-CreERT2 マウス (c-fos 遺伝子座に CreERT2 酵素をノックインしたマウス) と交配し、目的のマウスを作成した (Fos-CreERT2/GLT1-LSL-GFP-L10) (図 2)。

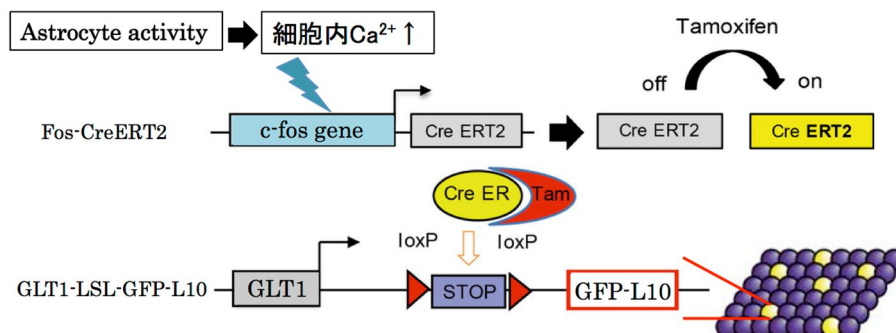


図 2 活性化したアストロサイトのレポーターマウス

Fos-CreERT2/GLT1-LSL-GFP-L10 マウスを用い、Chr2 を D1R 発現線条体神経細胞あるいは D2R 発現線条体細胞に発現させ、光刺激により直接路あるいは間接路を刺激した際に活性化されるアストロサイトに GFP-L10 を発現させた。TRAP (translating ribosome affinity purification) 法で、直接路および間接路と連関するアストロサイトのリボソームに結合している mRNA を精製し、RNAseq により発現遺伝子のプロファイリングを行い、D1R-As および D2R-As のマーカー遺伝子候補 (D1R-As に関しては 5 個、D2R-As に関しては 4 個) を同定した。候補遺伝子を、定量的 RT-PCR で確認し、発現が多く、アストロサイト特異性の高いマーカー遺伝子をそれぞれ 1 つずつ選んだ (D1R-As のマーカーとして遺伝子 X、D2R-As のマーカーとして遺伝子 Y)。

(2) D1R-As マーカー遺伝子 X および D2R-As マーカー遺伝子 Y を用いた D1R-As および D2R-As 特異的遺伝子操作ツールの開発

D1R-As 及び D2R-As の局在や形態学的特徴を明らかにするため、X 遺伝子に GFP を、Y 遺伝子に tdTomato をノックインしたマウスを作成した (D1R-AsX-GFP と D2R-AsY-tdTomato マウス)。D1R-AsX-GFP マウスおよび D2R-AsY-tdTomato マウスの線条体切片を作成し、GFP あるいは tdTomato の蛍光を観察したが、シグナルが弱くアストロサイトの局在や形態学的特徴を解析することはできなかった。

D1R-As 及び D2R-As を特異的に活性化するため、D1R-As 特異的マーカー遺伝子 X と D2R-As 特異的マーカー遺伝子 Y に Cre 酵素をノックインしたマウスを作成した (D1R-AsX-Cre と D2R-AsY-Cre マウス)。D1R-AsX-Cre と D2R-AsY-Cre マウスを、ROSA-LSL-hM3Dq マウスと交配し (図 3) 線条体からスライスを作成し、人工リガンドである clozapine-N-Oxide (CNO) 投与による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を解析したが、D1R-As 及び D2R-As 特異的に細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は観察されなかった。

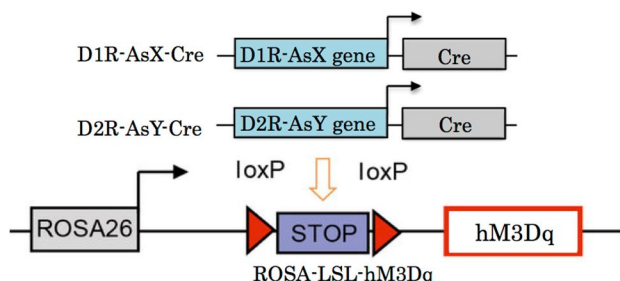


図 3 直接路・間接路連関アストロサイトの特異的活性化

新しい D1R-As および D2R-As のマーカー遺伝子を用いた解析
 絞り込んだマーカー遺伝子 X と Y は、発現量が低く D1R-As および D2R-As の解析のためには使うことができなかった。そこで、マーカー候補遺伝子の中から、他の遺伝子を用い、その遺伝子座に GFP をノックインしたマウスを作成している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakade Shota, Mochida Keiji, Kunii Atsushi, Nakamae Kazuki, Aida Tomomi, Tanaka Kohichi, Sakamoto Naoaki, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05773-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Perkins Emma M, Clarkson Yvonne L, Suminaite Daumante, Lyndon Alastair R, Tanaka Kohichi, Rothstein Jeffrey D, Skehel Paul A, Wyllie David J A, Jackson Mandy	4. 巻 27
2. 論文標題 Loss of cerebellar glutamate transporters EAAT4 and GLAST differentially affects the spontaneous firing pattern and survival of Purkinje cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 2614 ~ 2627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhao Zhuoyang, Hiraoka Yuichi, Ogawa Hiroshi, Tanaka Kohichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Region-specific deletions of the glutamate transporter GLT1 differentially affect nerve injury-induced neuropathic pain in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1988 ~ 1998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Reichenbach Bettina, Classon Johanna, Aida Tomomi, Tanaka Kohichi, Genander Maria, Gritz Christian	4. 巻 37
2. 論文標題 Glutamate transporter Slc1a3 mediates inter niche stem cell activation during skin growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e98280 ~ e98280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201798280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sugiyama Kaori, Tanaka Kohichi	4. 巻 497
2. 論文標題 Spinal cord-specific deletion of the glutamate transporter GLT1 causes motor neuron death in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 689 ~ 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto Junya, Tanaka Moeko, Sugiyama Kaori, Ito Yukiko, Aizawa Hidenori, Soma Miho, Shimizu Tomoko, Mitani Akira, Tanaka Kohichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Region-specific deletions of the glutamate transporter GLT1 differentially affect seizure activity and neurodegeneration in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 777 ~ 788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Kaori, Aida Tomomi, Nomura Masatoshi, Takayanagi Ryoichi, Zeilhofer Hanns U., Tanaka Kohichi	4. 巻 37
2. 論文標題 Calpain-Dependent Degradation of Nucleoporins Contributes to Motor Neuron Death in a Mouse Model of Chronic Excitotoxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8830 ~ 8844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0730-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Taisuke, Yamasaki Miwako, Hashimoto Kouichi, Kohda Kazuhisa, Yuzaki Michisuke, Shimamoto Keiko, Tanaka Kohichi, Kano Masanobu, Watanabe Masahiko	4. 巻 114
2. 論文標題 Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7438 ~ 7443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1617330114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Mizuki, Hida Hirotake, Mori Kentaro, Yoshimi Akira, Kitagaki Shinji, Yamada Kiyofumi, Hiraoka Yuichi, Aida Tomomi, Tanaka Kohichi, Ozaki Norio, Noda Yukihiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Functional roles of the glial glutamate transporter (GLAST) in emotional and cognitive abnormalities of mice after repeated phencyclidine administration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 914 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.euroneuro.2019.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takao Tomoka, Hiraoka Yuichi, Kawabe Kenji, Yamada Daisuke, Ming Lu, Tanaka Kohichi, Sato Moritoshi, Takarada Takeshi	4. 巻 526
2. 論文標題 Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 213 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子神経科学分野 http://www.tmd.ac.jp/mri/aud/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	平岡 優一 (Hiraoka Yuichi) (00778681)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教 (12602)	