

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07344

研究課題名(和文) グルタミン酸による神経伝達とペリニューロナルネット

研究課題名(英文) Glutamatergic neurotransmission and perineuronal nets

研究代表者

林 真理子 (Mariko, Hayashi)

国際医療福祉大学・医学部・講師

研究者番号：30525811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸は中枢神経系における主要な興奮性伝達物質であり、その過剰な作用は神経細胞死をひきおこす。グルタミン酸トランスポーターは興奮性シナプスに放出されたグルタミン酸を回収することによってシナプス伝達を終結させるとともに、過剰な興奮から神経細胞を守っている。神経細胞の近傍には、ヒアルロン酸を骨格とする細胞外マトリクス構造のペリニューロナルネットがあり、神経系の成熟に関わっている。このヒアルロン酸の活発な合成が、グルタミン酸トランスポーターの活性を支え、神経伝達を適切に終了させ、過剰な興奮から神経細胞を保護していることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペリニューロナルネットは神経細胞の興奮と抑制のバランスに関わる。その異常は、集中力の発揮など多くの神経疾患で障害される高次機能に関わるとされるが、神経伝達においてどのような役割を果たしているかは不明であった。ペリニューロナルネットの骨格をなすヒアルロン酸の合成が、グルタミン酸による伝達をピンポイントに絞ったものにするを明らかにできたことで、組織病理的に観察される現象と、病態とをつなぐ知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronan is synthesized, secreted, and anchored by hyaluronan synthases (HAS) at the plasma membrane and comprises the backbone of perineuronal nets around neuronal soma and dendrites. However, the molecular targets of hyaluronan to regulate synaptic transmission in the central nervous system have not been fully identified. We found that hyaluronan is a negative regulator of excitatory signals. Hyaluronan synthesized by HAS supports the activity of glial glutamate transporter 1 (GLT1). GLT1 also retracted from cellular processes of cultured astrocytes after hyaluronidase treatment and hyaluronan synthesis inhibition. A serial knockout study showed that all three HAS subtypes recruit GLT1 to cellular processes. Furthermore, hyaluronidase treatment activated neurons in a dissociated rat hippocampal culture and caused neuronal damage due to excitotoxicity. Our findings reveal that hyaluronan helps to turn off excitatory signals by supporting glutamate clearance.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経伝達 グルタミン酸 アストロサイト ペリニューロナルネット ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

我々は成長に伴い、言語などを新規に習得する能力に代表される神経可塑性を失っていく。それと並行して脳組織内にヒアルロン酸を骨格とする細胞外マトリクス構造であるペリニューロナルネットがあらわれる。ペリニューロナルネットの正常な発達、成熟期における神経可塑性の減弱のみならず、自制心や社会性の獲得に関わっていることが明らかになりつつある一方で、これがシナプス伝達をどのように制御するかについては不明であった。

興奮性伝達物質であるグルタミン酸は、シナプス伝達に加えて記憶の形成にも関わっている。グルタミン酸を回収しシナプス伝達を終結させるグルタミン酸トランスポーターの場合、膜貫通領域であるグルタミン酸輸送ドメインが細胞突起の先端に対する局在因子としての機能を併せ持つ。このグルタミン酸トランスポーターの細胞突起への局在とグルタミン酸取り込みの双方にヒアルロン酸合成が関与しているという予備的な結果があった。ヒアルロン酸は、膜貫通型の合成酵素により直鎖として合成され、細胞外へ分泌されるという異色の生合成機構をもつ。そこで、興奮性シナプス伝達と興奮毒性の抑制にヒアルロン酸がどう関わるかを調べようと考えた。

2. 研究の目的

ヒアルロン酸はペリニューロナルネットの骨格をなすため、これまでの予備的結果はペリニューロナルネットのシナプスにおける役割の一つはグルタミン酸の回収機構を整えることであることを示唆している。

そこでまず、ヒアルロン酸がグルタミン酸トランスポーターの活性を維持することでシナプスを超えた興奮性伝達の広がりを抑え、過剰な興奮から神経細胞を保護する働きがあるのではないか、という仮説を検証する。ヒアルロン酸を用いてグルタミン酸の興奮毒性から神経細胞を保護することは可能か、そのために必要な条件は何かを検討する。

さらに、ヒアルロン酸の分解が神経細胞とアストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーターの発現や細胞内局在に与える影響を明らかにする。短期的にはヒアルロン酸の分解は細胞膜突起への局在を失わせるが、この処理が継続した場合、グルタミン酸トランスポーターの分解や、神経細胞およびアストロサイトの形態変化に繋がる可能性がある。神経細胞とアストロサイトの混合培養により、アストロサイトが分岐構造を形成し、神経シナプスにアプローチする系を構築できたので、これを利用してヒアルロン酸分解の影響を評価する。

また、ヒアルロン酸合成を亢進させ、グルタミン酸トランスポーターの発現を向上させる化合物があれば、興奮毒性から神経細胞を保護する作用を持つ薬となりうる。そのため、多数の化合物の評価に耐えるアッセイ系を構築し、スクリーニングを行う。

3. 研究の方法

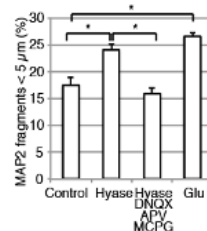
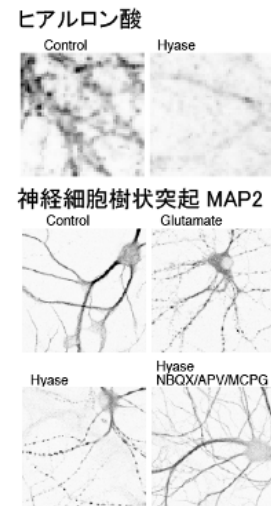
(1) ヒアルロン酸のグルタミン酸トランスポーター安定化を介した神経保護作用の評価

細胞内カルシウムイメージングのため Fura-2 を導入した神経細胞をヒアルロニダーゼ処理すると、グルタミン酸処理時にみられるような神経細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり、グルタミン酸受容体アンタゴニストで抑えられる。このとき樹状突起を標識する MAP2 の断片化がみられるので、神経細胞に対する興奮毒性の指標とした。この系でヒアルロン酸添加による神経保護作用を検討した(図1)。

(2) ヒアルロン酸によるグルタミン酸トランスポーターの制御

ラット海馬より調製した神経細胞とアストロサイトの混合培養に対し、ヒアルロニダーゼ処理を行い、ヒアルロン酸を標識する HABP、グルタミン酸トランスポーター GLAST や GLT-1、神経細胞樹状突起マーカー MAP2 による免疫染色を行う。これにより、ヒアルロン酸の合成、神経細胞とアストロサイトの形態と、グルタミン酸トランスポーターの発現を同時に評価することができる。濃度や処理時間を変えてヒアルロニダーゼ処理を行い、影響を調べた。

図1 ヒアルロン酸の分解は興奮毒性につながる



(3) ヒアルロン酸合成の亢進やグルタミン酸トランスポーターの発現上昇により神経保護作用を發揮する化合物のスクリーニング

東京大学創薬機構のコンサルテーションを受け、化合物スクリーニングの条件を満たすことができるよう、評価の条件を検討した。上記の HABP、GLT-1、MAP2 による免疫染色とその画像解析により、ヒアルロン酸合成、グルタミン酸トランスポーターの発現、神経細胞の生存、アストロサイトの分岐構造の維持を評価する。S/N 比や Z 因子など、基準となる統計指標が条件を満たせるように、処理時間や画像解析アルゴリズムを工夫した。

4. 研究成果

(1) ヒアルロン酸による神経保護作用の評価

神経細胞に対し、ヒアルロニダーゼ処理を行うと、樹状突起の周囲を取り巻くヒアルロン酸の喪失とともに樹状突起 MAP2 の断片化がみられ、ヒアルロン酸の喪失は神経損傷作用を持つことを示した。この際に、0.2%ヒアルロン酸を添加することで、神経損傷を抑えることができた。

(2) ヒアルロン酸によるグルタミン酸トランスポーターの制御と化合物スクリーニング

神経細胞とアストロサイトの混合培養に対し、グルタミン酸処理を行うと神経細胞が興奮毒性による細胞死で失われ、アストロサイトは突起構造が乏しくなり、タイリングが部分的に破綻した。一方、グルタミン酸トランスポーターの発現は増加した。これらの現象は、NMDA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストによって抑えることができた。ヒアルロニダーゼ処理によっても同じような現象が認められた。

この系をネガティブコントロール、正常な培養系をポジティブコントロールとし、化合物スクリーニングに向けて、ヒアルロン酸の発現量、神経細胞の損傷と細胞死、アストロサイトの突起構造を指標とした評価が可能か検討を行なった。ヒアルロニダーゼ処理の有無でこれらの指標は有意差を示したが、化合物スクリーニングに必要な条件を満たすことはできていない。

(3) 神経細胞が誘導するアストロサイトの分岐とタイリング現象

アストロサイトは数千数万に複雑に分岐した微細な突起構造で神経シナプスにアプローチすることで、血管と神経細胞間の物質輸送、神経栄養因子の分泌、神経伝達物質の回収を行い、神経細胞の活動と成熟を支えている。

本研究で使用した神経細胞とアストロサイトの混合培養では、単独では分岐構造をとらないアストロサイトが数十回にわたって分岐することを見出した。さらに、他のアストロサイトと重ならず排他的な領域を形成する、タイリング現象を示していた。ここでは、アストロサイト同士だけが互いを避け、神経細胞同士や神経細胞とアストロサイトは容易に互いを乗り越えて突起を伸ばしていた。

まず、神経突起伸長とアストロサイトの分岐形成のタイムコースを比較するため、神経細胞とアストロサイトの混合培養系に対し蛍光蛋白質を導入して継時観察を行った(図2)。高度な分岐をもち、タイリング現象を示すアストロサイトは培養4-5日目にあられる。これはマイクログリアによる死細胞除去がほぼ終了し神経突起の伸長が始まる頃と一致していた。これを観察するにあたって、遺伝子導入操作によるダメージが神経細胞やアストロサイトの成熟を阻害することが多いため、様々な手法を検討した。アデノ随伴ウイルスをアストロサイトへの効率的な遺伝子導入に用いることができ、突起形成を妨げないことを確認した。

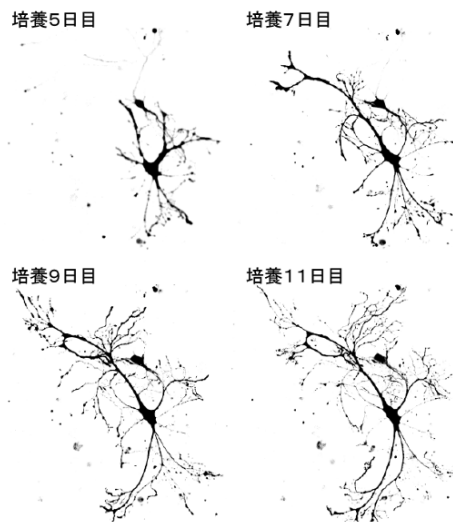


図2 アストロサイトに対するGFP遺伝子導入による継時観察

(4) アストロサイト突起を誘導する神経細胞とのクロストーク分子の同定に向けて

神経細胞とアストロサイト間のシグナル分子は複数同定されているが、多くはアストロサイトが神経細胞に作用するもので、神経細胞による高度な分岐の誘導やタイリング現象を説明できるものはまだない。アストロサイトの高度な成熟を誘導する神経細胞由来の分子や、アストロサイトの突起が互いを避ける現象を説明できる分子を同定し、アストロサイトの機能的、形態的成熟に至るシグナル経路を明らかにしたいと考えた。そのため、神経細胞存在下でアストロサイト特異的に発現し、神経細胞からのシグナル入力を受けて分岐形成を促す分子の候補を選定した。そして、高度に分岐したアストロサイトを含む神経細胞との混合培養系に対し、アデノ随伴ウイルスを用いて CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊を行い、どの分子が関与しているかを評価しようとしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi MK, Nishioka T, Shimizu H, Takahashi K, Kakegawa W, Mikami T, Hirayama Y, Koizumi S, Yoshida S, Yuzaki M, Tammi M, Sekino Y, Kaibuchi K, Shigemoto-Mogami Y, Yasui M, Sato K.	4. 巻 150
2. 論文標題 Hyaluronan synthesis supports glutamate transporter activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 249-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14791	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 Hayashi MK	4. 巻 19
2. 論文標題 Structure-Function Relationship of Transporters in the Glutamate-Glutamine Cycle of the Central Nervous System.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19041177	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林真理子、関野祐子、佐藤薫
2. 発表標題 神経細胞に誘導されたアストロサイトタイリングの動的性質
3. 学会等名 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林真理子、関野祐子、佐藤薫
2. 発表標題 Neurons induce astrocytes tiling by self-avoidance
3. 学会等名 Neuro2019（日本神経科学会、日本神経化学会合同年会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林真理子
2. 発表標題 神経細胞はアストロサイトのself-avoidanceを誘導する
3. 学会等名 日本神経科学会、日本神経化学会合同年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林真理子
2. 発表標題 神経細胞によるアストロサイトタイリングの誘導
3. 学会等名 日本神経化学会、日本生物精神医学会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林真理子, 佐藤薫
2. 発表標題 ペリニューロナルネットによる神経制御
3. 学会等名 日本神経化学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林真理子
2. 発表標題 ヒアルロン酸を利用したグルタミン酸興奮毒性からの神経細胞保護
3. 学会等名 国際医療福祉学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林真理子, 佐藤薫
2. 発表標題 Hyaluronan, the backbone of perineuronal nets, supports glutamate transporter activity
3. 学会等名 World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関