

令和元年5月31日現在

機関番号：63905
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：17K16133
研究課題名(和文) アストロサイトによるタウオパチーの疾患修飾

研究課題名(英文) Astrocytic modulation of tauopathy

研究代表者

竹田 育子 (Takeda, Ikuko)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：30746300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はタウオパチーの新たな治療的アプローチのため、特異的アストロサイト活性化方法と活性化による影響を検討した。アストロサイトにhM3Dq(Gq)-DREADDを発現させ、選択的にアストロサイト内にCa²⁺を放出させ活性化させる方法を用いた。アデノ随伴ウイルスにてhM3Dqをマウスに導入し、2週間後に特異的リガンドCNO (clozapine N-oxide)の腹腔内投与を行い、hM3Dqが発現しているアストロサイト特異的に長時間活性化することができた。このアストロサイト活性化の神経回路に対する効果として神経細胞のスパインを観察したところ、スパインのターンオーバーに変化を起こしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで神経疾患に対する治療ターゲットの多くは神経細胞であった。しかし今回私はアストロサイトを新たにターゲットとなり得るかどうかにについて検討を行っている。アストロサイトを活性化させることにより特に神経回路への影響を示しており、神経疾患だけでなく異常形態シナプスの多い他の中枢神経系への新たなアプローチ方法にもなりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study is to find a new tool to specifically activate astrocytes for a novel therapeutic target of tauopathy. To induce astrocyte activation, I used hM3Dq(Gq)-DREADD under GFAP promoter. Astrocytes expressed hM3Dq(Gq)-DREADD showed the increase of long-term Ca²⁺ transients via G protein signaling following CNO intraperitoneal injection. Activated astrocytes increased spine turnover rates in long-term spine imaging during CNO injection, possibly rewiring neural circuits.

研究分野：神経内科

キーワード：アストロサイト DREADDシステム

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

1. 研究開始当初の背景

タウタンパク質は中枢神経系に多く発現する微小管タンパク質の一種で、微小管の重合および安定化に働くタンパク質である。しかしこのタウは細胞内で不溶性の凝集体を形成することで、細胞死を引き起こすことが知られている。このタウの蓄積が原因となる疾患はタウオパチーと呼ばれており、神経変性疾患の中でも認知症をきたす疾患群である。タウオパチーのひとつに globularglial tauopathy (GGT) という概念がある。この一群の疾患は皮質の神経細胞のみならずアストロサイトやオリゴデンドロサイトに 4-リピータウが蓄積する。グリア細胞におけるタウ蓄積は生理的なグリア細胞の作用を阻害し、脳機能の低下をまねく可能性が示唆されている。アストロサイトの生理的機能として血流の調節、シナプス機能の維持が知られているが、神経細胞の代謝や神経伝達物質の合成やシナプスの形成や除去にも関与している。つまり神経細胞周囲の環境維持や神経細胞そのものの維持に関して重要な役割を果たしている。これらを障害するためタウの蓄積によるアストロサイトに関連してシナプスの機能維持障害、血液脳関門に対する障害、神経細胞の細胞死誘導が報告されている。以上よりアストロサイトの機能低下は神経細胞の機能維持に影響していることが予想される。アストロサイト同士はギャップジャンクションにより細胞間の連絡をとっているだけでなく、アストロサイトと神経細胞間にもギャップジャンクションは存在しており、神経傷害時にアストロサイトはこのギャップジャンクションを介して神経保護的に作用すると考えられている。以上よりタウオパチーにおける機能低下を起こしたアストロサイトは疾患の進行に大きく寄与していることが考えられ、アストロサイトの活動調節がタウオパチーに重要であることが示唆されている。

2. 研究の目的

アストロサイトの活性化を起こしアストロサイトの機能亢進を誘発する方法を確立し、新たな治療ターゲットとなるかを検討する。

具体的には以下(1)(2)をあきらかにする。

(1) DREADD システムを用いてアストロサイトの活性化が可能か検討する。

(2) 活性化アストロサイトの活動と神経回路との関連をスパインイメージングにてアストロサイトの活性化による神経回路への変化をあきらかにする。

3. 研究の方法

本研究はアストロサイトの機能に注目し、アストロサイトの活動調節により神経細胞への影響を検討する。

(1) アストロサイト活性化と神経細胞への影響

アストロサイトの活性化を誘導するため、DREADD システムを用いた。GFAP-hM3Dq-DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) は選択的にアストロサイトの G タンパク質共役受容体のシグナル伝達カスケードを刺激し、Ca²⁺を放出する。hM3Dq-DREADD はムスカリン様アセチルコリン受容体に変異を加えた人工の受容体であるが、体内のアセチルコリンなどに反応せず、人工的リガンドである clozapine-N-oxide (CNO) のみに反応を示すようにデザインされている。

hM3Dq-DREADD をアストロサイトに発現させ、特異的リガンドである CNO を投与しアストロサイトを活性化させた。アストロサイトの活動はカルシウムイメージングにより確認した。アストロサイトと神経細胞のスパインとの関連については経時的にスパインイメージングを行い、CNO 投与前後も比較し、シナプス形成・除去による回路編成の有無を確認した。

(2) in vivo イメージング

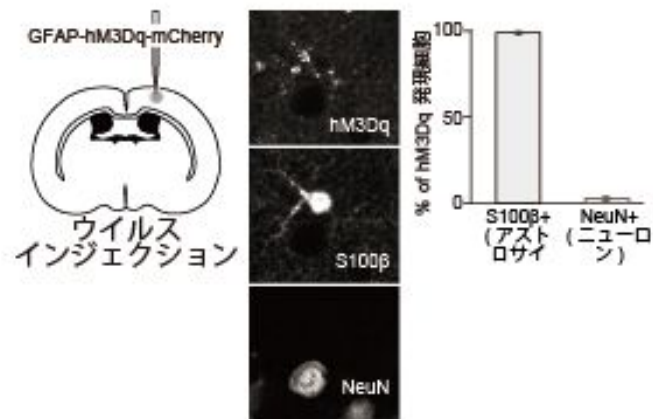
オープンスカル法にてマウスの頭蓋骨を一部除去した後、AAV-GFAP-hM3Dq-DREADD を脳内にインジェクションを行い、頭蓋骨はカバーガラスにて置換した。アストロサイトのカルシウム活動を確認するため、同時にカルシウムインジケータである AAV-GFAP-GCaMP6f をインジェクションし、アストロサイトに発現させた。In vivo イメージングには2光子レーザー顕微鏡を用い、マウスは麻酔下で観察を行った。

4. 研究成果

(1) DREADD システムによるアストロサイトの活性化

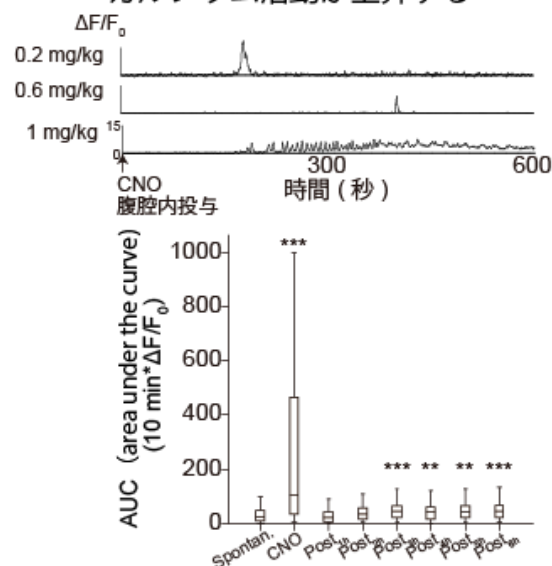
アストロサイトを特異的に活性化させるため、まず AAV-GFAP-hM3Dq-DREADD をマウスの脳にインジェクションし、免疫組織染色にて発現プロファイルを検討した。その結果アストロサイト特異的な発現を確認した。

図1 DREADD はアストロサイト特異的に発現



(図1) DREADD システムによるアストロサイトの活性化の有無を確認するため、アストロサイトの in vivo カルシウムイメージングを行った。CNO の濃度を変え検討を行い、CNO が 0.2 mg/kg や 0.6 mg/kg では短時間のカルシウム活動の上昇が認められるのみであったが、1 mg/kg まで増量すると 10 時間以上のアストロサイトのカルシウム活動が増加していた。(図2) hM3Dq-DREADD が発現していない部位ではアストロサイトの細胞内カルシウム濃度の上昇は確認できなかった。以上により DREADD システムを用いた部位

図2 DREADD システムによるアストロサイトのカルシウム活動が上昇する

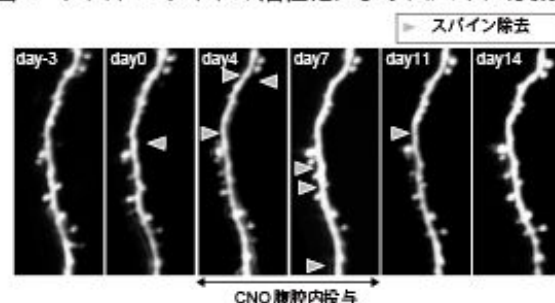


特異的な長時間のアストロサイトの活性化に成功した。

(2) アストロサイト活性化によるスパイン除去

活性化アストロサイトの神経細胞への影響、特に神経回路への影響についてスパインイメージングを用いて検討を行った。CNO 投与による 1 週間のアストロサイトの活性化中にはスパイン除去率が上昇しており(図3) コントロールの生食投与群ではこの傾向は認められなかった。hM3Dq-DREADD が発現している脳の部位を

図3 アストロサイトの活性化によりスパインは減少



切り取り、mRNA を解析したところ、シナプス形成にかかわる因子には変化が認められず、シナプス除去にかかわるアストロサイト関連因子の増加がコントロール群と比較して認められた。これまでの報告ではアストロサイトの活性化によりシナプス形成を起こすものはあるが、今回用いた DREADD システムによるアストロサイトの活性化ではシナプス除去を起こすという新たな知見が得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tatsuya Ishikawa, Kei Eto, Sun Kwang Kim, Hiroaki Wake, Ikuko Takeda, Hiroshi Horiuchi, Andrew Moorhouse, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain. PAIN (査読あり) 159, 2018 doi: 10.1097/j.pain.0000000000001248

〔学会発表〕(計2件)

Ikuko Takeda. Astrocytes are a novel target for treatment of the chronic pain, FAOPS2019, 2019

Ikuko Takeda. The Roles of Cortical Astrocytes in Neuropathic Pain, 第9回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム, 2019

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。