

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14821

研究課題名(和文) 脊髄後角アストロサイト亜集団形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanism of generating a subpopulation of spinal dorsal horn astrocyte

研究代表者

高露 雄太 (Kohro, Yuta)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：30723861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系に最も豊富に存在する細胞種として知られるアストロサイトは分子あるいは機能レベルにおいてその多様性が示唆されているが、発達期から成体にかけてその多様性を形成するメカニズムの理解は進んでいない。本研究では、申請者が同定した脊髄アストロサイト亜集団であるHes5陽性アストロサイト(Kohro et al., Nat Neurosci, 2020)に着目し、発達に伴いHes5陽性細胞の局在が脊髄後角の表層へと限局することを明らかとした。また、一次求心性神経との相互作用を介して、成体の脊髄アストロサイトでHes5の発現が誘導される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の遺伝学的解析技術あるいは生体における細胞のイメージング技術の発達に伴い、中枢神経系においてアストロサイトの多様性が示唆されているが、それら多様性を規定しているメカニズムは未だ理解が進んでない。本研究では、脊髄後角へと投射することが知られている一次求心性神経に着目し、同神経が脊髄アストロサイト亜集団形成に寄与することを示唆した点に学術的意義がある。本研究に端を発し、生理あるいは病態時におけるアストロサイト多様性の理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes, which are the most abundant cell type in the central nervous system, are considered to exhibit molecular and functional heterogeneity. However, the mechanisms underlying astrocyte heterogeneity from development to adulthood remain unknown. In this study, we focused on a population of astrocytes in the spinal dorsal horn (SDH), which were defined by the expression of Hes5 gene (Kohro et al., Nat Neurosci, 2020) and found that the localization of Hes5+ astrocytes in the spinal cord was spatially altered during development. Furthermore, Hes5 expression in the adult SDH astrocytes was induced by the interaction with primary afferent neurons.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脊髄 アストロサイト 亜集団 一次求心性神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞の一種であるアストロサイトは、脳や脊髄など中枢神経系全体に広く存在し、シナプス形成や神経細胞の機能調節、また血液脳関門の形成など生体の恒常性維持に重要な役割を担うことが示唆されている。近年の遺伝学的解析や生体イメージング技術の急速な進歩に伴い、アストロサイトは中枢神経系の領域間あるいは同一領域内において、分子および機能レベルで非常に多様な集団であることが示唆されている。しかしながら、多様な集団を生み出すメカニズムの起源は未だ不明な点が多い。各アストロサイト集団の分子発現や機能がどのように規定されているかを明らかにすることができれば、生理あるいは病態時におけるアストロサイトの多様性の意義の理解に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

これまでの研究により代表者は世界で初めて成体における脊髄後角アストロサイトの亜集団 (Hes5 陽性アストロサイト) を同定し、末梢から侵害刺激を受容した際の痛覚過敏に重要な役割を果たしている事を明らかにしてきた(Kohro et al., Nat Neurosci., 2020)。そこで本研究では、神経-グリア間の相互作用に着目し、我々が同定したアストロサイト亜集団を特徴づけている分子基盤の解明を目指して検討を行った。

3. 研究の方法

・ 生後各時期における Hes5 陽性細胞の解析

タモキシフェンを投与した時期特異的に Cre リコンビナーゼ活性を誘導し、Hes5 陽性細胞を蛍光タンパク質の tdTomato でラベリングすることが可能なマウス (Hes5-CreERT2;ROSA-tdTomato マウス) を用いた。生後各時期 (生後 1-5, 7-11, 14-18, 28-32 あるいは 63-67 日目に投与) に Cre リコンビナーゼ活性を誘導し、成体における脳および脊髄を採取後、免疫組織染色を行った。

・ 一次求心性神経-脊髄 Hes5 陽性アストロサイトの相互作用解析

逆行性感染するセロタイプのアデノ随伴ウイルスに Cre 遺伝子を組み込み (AAV2-retro-ESYN-Cre)、同ウイルスを Cre 依存的にジフテリア毒素受容体発現するマウス (Rosa-DTR マウス) の脊髄後角へ投与した。AAV 投与 2 週間後、脊髄神経束内にジフテリア毒素を投与し、一次求心性神経を除去した際の脊髄後角における Hes5 遺伝子の発現について定量的 PCR 法を用いて検討を行った。

・ アストロサイト特異的 Notch シグナル阻害時の Hes5 遺伝子発現解析

Notch シグナルの共役分子 MAML1 のドミナントネガティブ体 (dnMAML1) を強制発現させる AAV (AAV2/5-EF1 -FLEX-dnMAML1) を成体の Hes5-CreERT2 マウス脊髄後角に投与し、Hes5 遺伝子の発現について定量的 PCR 法を用いて検討を行った。

4. 研究成果

過去の報告において、成体におけるアストロサイト亜集団の局在は胎生期における種々の前駆細胞の局在に依存することが知られている。そこで、生後各時期における Hes5 陽性細胞をラベリングし、成体脊髄における局在について解析を行ったところ、過去の報告とは異なり、Hes5 陽性細胞は発達とともにその局在が脊髄後角の表層へと限局することが明らかとなった。また、Hes5 陽性細胞種について、各種細胞マーカーを用いて共染色を行ったところ、生後直後はアストロサイト以外にも Hes5 陽性細胞が観察されたのに対し、成体脊髄においてはその殆どがアストロサイトであることが分かった。同様の検討を脳についてもおこなったところ、脊髄とは異なりいずれの時期においてもほぼすべてのアストロサイトが Hes5 陽性であることが明らかとなった。即ち、発達に伴う Hes5 陽性細胞の局在変化は脊髄独自の現象であることが示された。

脊髄後角表層は、末梢から感覚情報を伝える一次求心性神経や、脳から脊髄へとシグナルを伝達する下行性神経の入力がある。中でも、一次求心性神経は同領域に多くの神経線維を投射しており、脊髄アストロサイトの Hes5 発現獲得に関与する可能性を考えた。そこで Hes5-CreERT2/Rosa-tdTomato マウスに後根神経切除術 (一次求心性神経が脊髄へ投射している神経束

を切断)を行ったところ、tdTomato 陽性細胞数の減少が確認された。さらに一次求心性神経を除去したマウスを用いて脊髄後角の Hes5 遺伝子発現について定量的 PCR を用いて解析したところ、Hes5 遺伝子の発現が有意に低下した。次に、一次求心性神経の特定のサブタイプがアストロサイト Hes5 の発現に重要であると考え、主に Hes5 陽性アストロサイトが局在する領域に投射することが知られている IB4 陽性神経に着目した。同細胞を特異的に除去することが可能な IB4-サポリンを Hes5 陽性細胞可視化マウス(Hes5-Venus マウス)の脊髄神経束内に投与した所、Hes5 陽性細胞が減少した。

次に、神経幹細胞において Hes5 は Notch シグナルの下流因子であることが知られているため、アストロサイトでも同シグナルが Hes5 の発現に参与する可能性を考えた。そこで、Hes5 陽性アストロサイト特異的に Notch シグナルを阻害するため、AAV を用いて Hes5 陽性アストロサイト特異的に Notch シグナルの共役分子 MAML1 のドミナントネガティブ体を発現させ、脊髄後角における Hes5 遺伝子の発現について定量的 PCR 用いて解析したところ、Hes5 遺伝子の発現低下が確認された。また、Notch シグナルの各種リガンド分子の発現について定量的 PCR 解析を行ったところ、脊髄に比べて後根神経節で発現が高い分子として、Jag1 と Jag2 を見出した。さらにそれぞれの局在について RNAscope を用いた解析を行ったところ、特に Jag2 の発現が一次求心性神経に認められた。

以上の結果より、一次求心性神経との相互作用を介して、Notch シグナル依存的に Hes5 の発現が脊髄アストロサイトで誘導される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Teruaki, Yamashita Tomohiro, Kano Ryota, Inoue Mariko, Okada Shota, Kano Koki, Koizumi Schuichi, Iwabuchi Kazuhisa, Hirabayashi Yoshio, Matsuo Ichiro, Nakashima Yasuharu, Kamiguchi Hiroyuki, Kohro Yuta, Tsuda Makoto	4. 巻 110
2. 論文標題 GPR55 contributes to neutrophil recruitment and mechanical pain induction after spinal cord compression in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 276 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2023.03.008	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 Kohro Yuta, Matsuda Tsuyoshi, Yoshihara Kohei, Kohno Keita, Koga Keisuke, Katsuragi Ryuichi...Tsuda Makoto	4. 巻 23
2. 論文標題 Spinal astrocytes in superficial laminae gate brainstem descending control of mechanosensory hypersensitivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1376 ~ 1387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-020-00713-4	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 Ono Teruaki, Kohro Yuta, Kohno Keita, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Nakashima Yasuharu, Tsuda Makoto	4. 巻 89
2. 論文標題 Mechanical pain of the lower extremity after compression of the upper spinal cord involves signal transducer and activator of transcription 3-dependent reactive astrocytes and interleukin-6	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 389 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2020.07.025	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 Kohno Keita, Kitano Junko, Kohro Yuta, Tozaki-Saitoh Hidetoshi, Inoue Kazuhide, Tsuda Makoto	4. 巻 41
2. 論文標題 Temporal Kinetics of Microgliosis in the Spinal Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury in Rodents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00278	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 Yoshihara Kohei、Matsuda Tsuyoshi、Kohro Yuta、Tozaki-Saitoh Hidetoshi、Inoue Kazuhide、Tsuda Makoto	4. 巻 137
2. 論文標題 Astrocytic Ca ²⁺ responses in the spinal dorsal horn by noxious stimuli to the skin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 101 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2018.04.007	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高露雄太、松田烈士、吉原康平、津田誠
2. 発表標題 脊髄アストロサイトから紐解く感覚情報伝達の調節メカニズム
3. 学会等名 第100回生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高露雄太、松田烈士、吉原康平、津田誠
2. 発表標題 脊髄後角における非細胞自律的な体性感覚情報処理
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Kohro, Tsuyoshi Matsuda, Kohei Yoshihara, Ryuichi Katsuragi, Takaaki Oka, Ryoichi Tashima, Sho Muneta, Takuya Yamane, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Katsuhiko Mikoshiba, Verdon Taylor, Kazuhide Inoue, Makoto Tsuda
2. 発表標題 Sensitizing mechanosensory information by a population of spinal dorsal horn astrocytes
3. 学会等名 17th International Association for the Study of Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高露雄太, 松田烈士, 吉原康平, 桂木龍一, 岡嵩晃, 田島諒一, 棟田翔, 山根拓也, 齊藤秀俊, 御子柴克彦, Verdon Taylor, 井上和秀, 津田誠
2. 発表標題 感覚情報伝達における脊髄後角アストロサイト亜集団の役割
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院薬学研究院薬理学分野 http://life-innov.phar.kyushu-u.ac.jp/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

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
---------	---------