

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2018～2023

課題番号：18KT0071

研究課題名（和文）活性化アストロサイトの多様性に対するデータ駆動型アプローチ

研究課題名（英文）Data-driven approach to the diversity of reactive astrocytes

研究代表者

森田 光洋（Morita, Mitsuhiro）

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：50297602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：アストロサイトはほぼ全ての神経疾患に伴って活性化されるが、その多様性と病態に与える影響については不明な点が多く残されている。我々は独自に開発された閉鎖性頭部外傷モデル「光傷害マウス」を活用し、損傷周辺の回復部位に集積する神経幹細胞マーカーであるネスチンを発現する活性化アストロサイトについて検討を行った。その結果、この細胞が創傷治癒に不可欠である一方、回復過程で最終的に除去されることが明らかとなった。また、この細胞の運命を決定する研究の過程で、損傷の表面に形成されるグリア瘢痕を形成する活性化アストロサイトは、アストロサイトではなくオリゴデンドロサイト前駆細胞由来であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭部外傷は世界的に労働年齢の男性で多く見られるため、社会的にも医療費的にも深刻な問題である。本研究では、独自に開発した動物モデルを用いることにより、特定の活性化アストロサイトが創傷治癒に関与することが明らかとなった。また、活性化アストロサイトの一部がアストロサイト以外の細胞に由来することが発見された。これらの成果は、頭部外傷の診断または治療に新しいターゲットをもたらしたという点で意義深い。また活性化アストロサイトという概念に新しい可能性を示したと言える。

研究成果の概要（英文）：Astrocytes are activated in almost all neurological disorders, but their diversity and impact on pathology remains unclear. We utilised an originally-developed closed head injury model, the 'photo injury mouse', to investigate a perilesional reactive astrocyte subpopulation expressing nestin, a neural stem cell marker. Our results showed that while these cells are essential for wound healing, they are ultimately eliminated during the recovery process. In addition, it was also found that the activated astrocytes that form the glial scar on the surface of the injury are derived from oligodendrocyte precursor cells rather than astrocytes.

研究分野：神経科学

キーワード：脳傷害 活性化アストロサイト オリゴデンドロサイト前駆細胞 創傷治癒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アストロサイトは神経細胞と血管系の間に介在するグリア細胞の一種であり、脳内の環境を維持する機能があることが知られている。また、様々な神経疾患に伴って活性化され、GFAPタンパク質の発現増加と肥大化画素の特徴として知られている。しかし、活性化の多様性と病態に与える影響については不明な点が多く残されていた。

(2) 我々は脳傷害に伴うアストロサイトの活性化を研究するモデルとして、光傷害マウスを開発した。ヒトの局所性頭部外傷は、頭蓋の破損がない場合であっても脳組織の変性が進行するが、マウスの脳はヒトの1/1000のサイズしかないので、頭蓋に対する物理的な衝撃は生命の維持に必要な脳幹を容易に破壊し、死に至らしめる。このため、従来の脳傷害モデルは頭蓋を除去し、露出した脳実質に物理的な衝撃を与えることで作成されてきた。しかし、頭蓋の除去はそれ自体がアストロサイトを活性化するため、従来のモデルは活性化アストロサイトの研究には不適切であることが指摘されてきた。我々は今問題を解決するために、頭蓋の一部を薄削し、そこから強い光を照射して大脳皮質の一部を破壊する方法を開発し、光傷害マウスと名付けた。このマウスは人為的なアストロサイトの活性化がなく、損傷部位の顕著な回復を示すため、臨床における頭部外傷と同一の病態を示す。また、損傷周辺の回復部位には、神経幹細胞のマーカーであるネスチンを発現した活性化アストロサイトが集積する。

### 2. 研究の目的

(1) 損傷の回復過程と時間的、空間的に一致するネスチン陽性活性化アストロサイトの集積が損傷の回復に果たす役割を解明する。

(2) 神経幹細胞のマーカーを発現するネスチン陽性活性化アストロサイトが、神経幹細胞と同様に神経細胞とグリア細胞を産生し、傷害で失われた細胞を補充するという仮説を立て、この可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

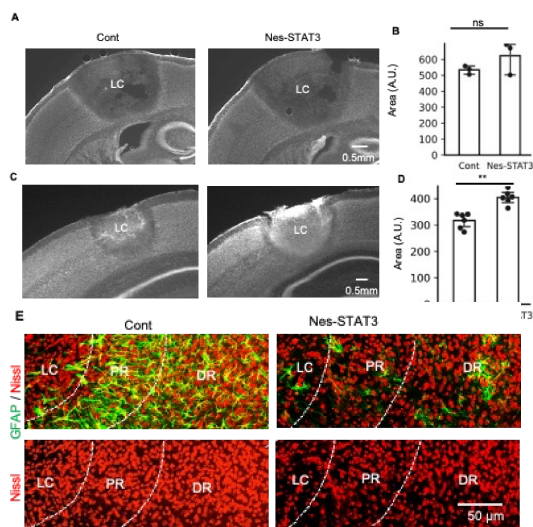
(1) ネスチン陽性活性化アストロサイトを除去することができる遺伝子改変マウスに光傷害を作製し、このマウスの創傷治癒過程を野生型マウスと比較することにより、この細胞が脳傷害の病態に果たす役割を解明する。

(2) ネスチン陽性活性化アストロサイトを Cre/loxP システムなどによる不可逆的な GFP 発現などを用いて標識し、運命を決定することにより、この細胞が神経幹細胞として創傷治癒に関与するという仮説を検証する。

### 4. 研究成果

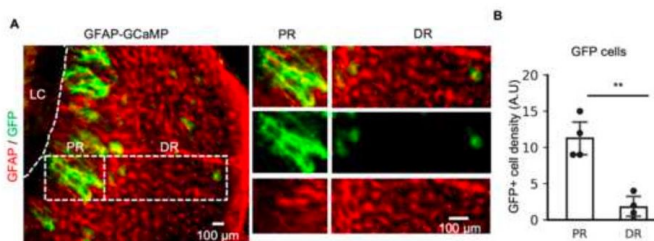
(1) ネスチンプロモーターを用いたネスチン陽性活性化アストロサイトの除去に伴う創傷治癒の悪化。ネスチンプロモーターの下流で Cre を発現し、アストロサイトの活性化に必要であることが知られている STAT3 遺伝子をコンディショナルノックアウトした。ネスチンプロモーターはネスチン陽性活性化アストロサイトで活性化されるだけでなく、発生段階の神経幹細胞においても活性化されるため、このマウスでは神経細胞とグリア細胞の大部分で STAT3 遺伝子が除去されていた。その結果、アストロサイトの活性化が全体的に抑制され、回復に伴う損傷部位の縮小と、損傷近傍における神経細胞の生存の両方が悪化した(図1)。光傷害では活性化アストロサイトにおいてのみ、STAT3 が活性化されることから、この実験は活性化アストロサイトの集積の障害が、創傷治癒の悪化を引き起こしたと考えられ、活性化アストロサイトの重要性が示唆された。

(2) GFAP プロモーターを用いたネスチン陽性活性化アストロサイトの除去に伴う創傷治癒の悪化。ネスチン陽性活性化アストロサイト特異的な Cre/loxP システムの利用を実現するために、いくつかのドライバーマウス系を検討したところ、GFAP-CreERT2 遺伝子を利用し、光傷害後にタモキシフェンを投与した場合、ネスチ



(図1) ネスチンプロモーターを用いたSTAT3遺伝子コンディショナルノックアウトに伴う創傷治癒の悪化。

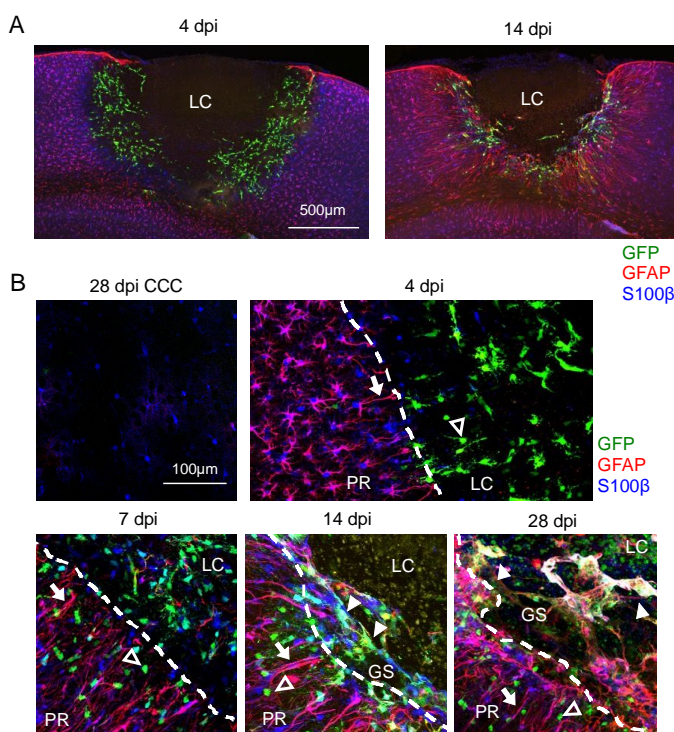
ン陽性活性化アストロサイト特異的なレポータージーンの活性化が確認された(図2)。この方法をSTAT3遺伝子の破壊と組み合わせたところ、ネスチンプロモーターと同様の結果が得られたため、ネスチン陽性活性化アストロサイトが創傷治癒に不可欠であることが最終的に示された。



(図2) GFAPプロモーターを用いたネスチン陽性活性化アストロサイト特異的なCre/loxPシステムの利用

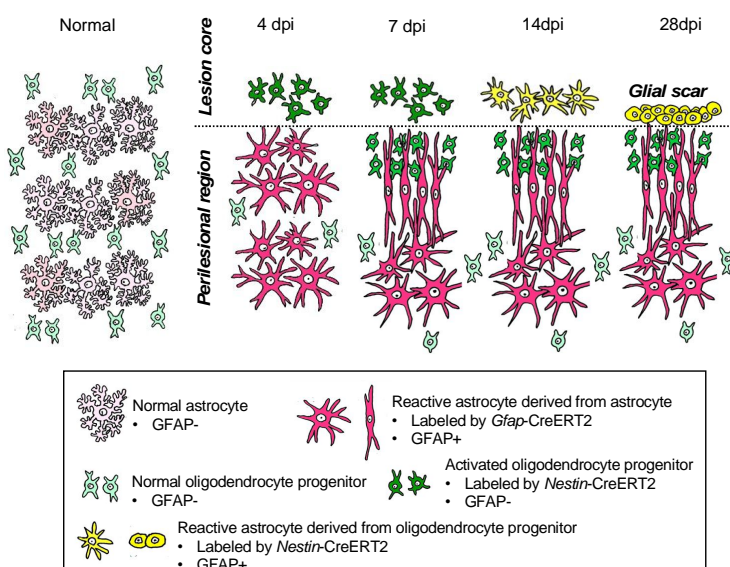
(3)ネスチンプロモーターを用いた活性化アストロサイトの不可逆的標識によるネスチン陽性活性化アストロサイトの運命決定。Nestin-CreERT2/Rosa-GFPマウスを用いてネスチン陽性活性化アストロサイトを不可逆的にGFP標識し、運命決定を試みたところ、予想に反して傷害4日目にアストロサイトではない細胞集団がGFP標識され、創傷治癒に伴い活性化アストロサイトになることが明らかになった(図3)

この細胞を各種マーカーにより解析したところ、NG2グリアとして知られるオリゴデンドロサイト前駆細胞であることが分かった。また、最終的にはこれらの細胞がグリア癬痕を形成するアストロサイトになることが明らかとなった(図4)。実際に、Nestinプロモーターを利用してSTAT3遺伝子を破壊した場合、グリア癬痕を形成する活性化アストロサイトの減少が見られた。これらの結果は、活性化アストロサイトが単にアストロサイトの活性化だけではなく、非アストロサイト細胞が一時的に脱分化し、アストロサイトに分化した後に活性化アストロサイトとして集積することを示している。



(図3) Nestinプロモーターを用いた活性化アストロサイトのGFP標識により明らかになった、非アストロサイト細胞による活性化アストロサイトの産生。

(4)ネスチン陽性活性化アストロサイトの最終的な運命。GFAPプロモーターを用いてネスチン陽性活性化アストロサイトを不可逆的に標識し、損傷回復後の運命を解析したところ、全て活性化アストロサイトのマーカーであるGFAP陽性細胞であった。しかし、特筆すべき点として、損傷の回復過程でこれら標識された細胞は劇的に減少したため、活性化アストロサイトは創傷治癒過程で除去されることが明らかとなった。



(図4) NG2陽性グリア細胞によるグリア癬痕を形成する活性化アストロサイトの産生。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Morita Mitsuhiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Modern Microscopic Approaches to Astrocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5883 ~ 5883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24065883	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 Kato Daisuke, Quan Xiangyu, Tanisumi Yuta, Guo Zhongtian, Morita Mitsuhiro, Takiguchi Tetsuya, Matoba Osamu, Wake Hiroaki	4. 巻 187
2. 論文標題 Evaluation and Manipulation of Neural Activity using Two-Photon Holographic Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/64205	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 Kumar Manoj, Matoba Osamu, Quan Xiangyu, Rajput Sudheesh K, Morita Mitsuhiro, Awatsuji Yasuhiro	4. 巻 151
2. 論文標題 Quantitative dynamic evolution of physiological parameters of RBC by highly stable digital holographic microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics and Lasers in Engineering	6. 最初と最後の頁 106887 ~ 106887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.optlaseng.2021.106887	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 Nambu Yuri, Ohira Koji, Morita Mitsuhiro, Yasumoto Hiroki, Kurganov Erkin, Miyata Seiji	4. 巻 173
2. 論文標題 Effects of leptin on proliferation of astrocyte- and tancyte-like neural stem cells in the adult mouse medulla oblongata	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 44 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.05.012	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 Kumar Manoj, Matoba Osamu, Quan Xiangyu, Rajput Sudheesh K, Morita Mitsuhiro, Awatsuji Yasuhiro	4. 巻 151
2. 論文標題 Quantitative dynamic evolution of physiological parameters of RBC by highly stable digital holographic microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics and Lasers in Engineering	6. 最初と最後の頁 106887 ~ 106887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.optlaseng.2021.106887	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 森田光洋, 安井正人	4. 巻 39
2. 論文標題 Glymphatic system研究の現状から見たアクアポリンとアルツハイマー病の関連	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学 (増刊号) 「神経免疫 メカニズムと疾患」	6. 最初と最後の頁 2399-2402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Potokar Maja, Morita Mitsuhiro, Wiche Gerhard, Jorga?evski Jernej	4. 巻 9
2. 論文標題 The Diversity of Intermediate Filaments in Astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1604 ~ 1604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9071604	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 Takagi Shohei, Furube Eriko, Nakano Yousuke, Morita Mitsuhiro, Miyata Seiji	4. 巻 331
2. 論文標題 Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 74 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2017.10.008	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 Furube Eriko, Ishii Haruna, Nambu Yuri, Kurganov Erkin, Nagaoka Sumiharu, Morita Mitsuhiro, Miyata Seiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Neural stem cell phenotype of tanycyte-like ependymal cells in the circumventricular organs and central canal of adult mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59629-5	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 Hiratsuka Daishi, Kurganov Erkin, Furube Eriko, Morita Mitsuhiro, Miyata Seiji	4. 巻 332
2. 論文標題 VEGF- and PDGF-dependent proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the medulla oblongata after LPC-induced focal demyelination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 176~186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2019.04.016	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 Rajput Sudheesh K., Kumar Manoj, Quan Xiangyu, Morita Mitsuhiro, Furuyashiki Tomoyuki, Awatsuji Yasuhiro, Tajahuerce Enrique, Matoba Osamu	4. 巻 25
2. 論文標題 Three-dimensional fluorescence imaging using the transport of intensity equation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.25.3.032004	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 Maruyama Yoko, Ueno Satoko, Morita Mitsuhiro, Hayashi Fumio, Maekawa Shohei	4. 巻 673
2. 論文標題 Inhibitory effect of several sphingolipid metabolites on calcineurin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 132~135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.03.010	査読の有無 無
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 Ueno Satoko, Miyoshi Hiroshi, Maruyama Yoko, Morita Mitsuhiro, Maekawa Shohei	4. 巻 675
2. 論文標題 Interaction of dynamin I with NAP-22, a neuronal protein enriched in the presynaptic region	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 59 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.03.061	査読の有無 無
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 Hiratsuka Daishi, Furube Eriko, Taguchi Katsutoshi, Tanaka Masaki, Morita Mitsuhiro, Miyata Seiji	4. 巻 319
2. 論文標題 Remyelination in the medulla oblongata of adult mouse brain during experimental autoimmune encephalomyelitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2018.03.014	査読の有無 無
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 Morita Mitsuhiro, Ikeshima-Kataoka Hiroko, Kreft Marko, Vardjan Nina, Zorec Robert, Noda Mami	4. 巻 20
2. 論文標題 Metabolic Plasticity of Astrocytes and Aging of the Brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 941 ~ 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040941	査読の有無 無
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15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 森田光洋
2. 発表標題 脳における水システムと神経情報処理のクロストーク
3. 学会等名 第96回日本薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihito Saito, Yuma Osako, Maya Odagawa, Yasuhiro Oisi, Chie Matsubara, Mitsuhiro Morita, Masanori Murayama
2. 発表標題 Emotional arousal enhances perceptual memory through amygdalo-cortical input during NREM sleep
3. 学会等名 第45回日本神経科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Lee, H, Azuma, M, Shinzaki, K, Yamane, R, Morita, M
2. 発表標題 Cortical-wide impairment of " the Glymphatic System " after focal brain injury
3. 学会等名 第45回日本神経科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sawant, N, Okazaki, N, Morita, M
2. 発表標題 Effects of fingolimod on vasculature and glial scar formation after closed-head injury
3. 学会等名 第45回日本神経科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Morita, M., Okada, S. and Kobayashi, M.
2. 発表標題 Crosstalk between AQP4-dependent ATP/Adenosine release and dopamine system in cocaine-induced depressive behavior
3. 学会等名 第44回日本神経科学会
4. 発表年 2021年



1 . 発表者名 Ueda, H and Morita, M.
2 . 発表標題 Upregulated glutamate response and oscillation of [Ca2+]i increases of perilesional reactive astrocyte after closed-head injury
3 . 学会等名 第43回日本神経科学会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Sunhwa, G., Saito, Y. and Morita, M.
2 . 発表標題 Mesenchymal stem cell promotes sphere-formation and de-differentiation of astrocytes
3 . 学会等名 第43回日本神経科学会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Morita, M., Okada, S. and Kobayashi, M.
2 . 発表標題 ATP/Adenosine release and dopamine system in cocaine-induced depressive behavior
3 . 学会等名 第43回日本神経科学会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Matsuda, H., Ueda, H., Tsuji, E. and Morita, M.
2 . 発表標題 Glial scar formation by reactive astrocytes derived from oligodendrocyte progenitor cells
3 . 学会等名 NEURO2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Okada, S., Kobayashi, M. and Morita, M.
2 . 発表標題 AQP4-dependent increase of extracellular ATP/Adenosine regulates dopaminergic neurotransmission in the striatum
3 . 学会等名 NEURO2019
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Morita, M., Kobayashi, M. and Okada, S.
2 . 発表標題 AQP4-dependent increase of extracellular ATP/Adenosine derived from astrocytes regulates dopaminergic neurotransmission in the striatum
3 . 学会等名 XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Morita, M. and Azuma, M.
2 . 発表標題 Widespread impairment of cerebrospinal fluid flow in a focal closed-head injury model, photo-injury mouse
3 . 学会等名 Cold Spring Harber Asia (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Morita, M.
2 . 発表標題 Multiple pathways for ATP/adenosine release in the brain
3 . 学会等名 NEUROGLIJA V NORMALNIH IN PATOLOSKIH RAZMERAH (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Azuma, M. and Morita, M.
2. 発表標題 Widespread impairment of glymphatic flow in a focal closed head injury model, photo-injury mouse
3. 学会等名 日本神経科会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Morita, M., and Masae, A.
2. 発表標題 Widespread impairment of glymphatic flow in a focal closed-head injury model, photo-injury mouse
3. 学会等名 FENS Meeting
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 的場 修,全 香玉,米田 成,森田 光洋	4. 発行年 2022年
2. 出版社 レーザー研究第 50 巻第 11 号(2022 年 11 月)「多彩な発展を遂げるホログラフィ」特集号	5. 総ページ数 643
3. 書名 2 光子励起ホログラフィック顕微鏡による高度光遺伝学応用	

〔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