

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17042

研究課題名（和文）難治性疾患モデルのニューロングリア動態のin vivoイメージング解析

研究課題名（英文）In vivo imaging analysis of neuron-glia dynamics in neurological disease models

研究代表者

齋藤 光象（Saito, Kozo）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：60516079

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アレキサンダー病(AxD)モデル病態にตอบสนองするミクログリア活性化におけるグリア間相互作用解明のため、ミクログリア機能イメージング解析、シングルセル遺伝子発現解析を実行した。AxDモデルのアストロサイトでは病態の影響によりATP分解酵素(NTPDase2)発現が低下し、細胞外ATP濃度が上昇する。この細胞外ATP濃度上昇を病態シグナルとして感知したミクログリアが活性化する。活性化ミクログリアは病的アストロサイト周囲に集積し、AxD病態進行を抑制する。すなわちAxDミクログリアはアストロサイト病態を監視・保護することが判明した。グリア細胞間相互作用が関連するAxD病態機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果においては、世界で初めてミクログリアがアレキサンダー病(AxD)の進行抑制に関与することを明らかにした。AxDは一次性アストロサイト病であるため、これまでの多くの研究ではアストロサイトに対して関心が向けられていた。しかし本研究は、ミクログリアがAxD病態を監視して制御するという、これまでにない全く新しい病態形成概念を提起するに至った。この発見はミクログリア機能状態がAxD病状と密接に関係することを示唆する。今回知見が臨床研究にも活用されることにより、本研究の意義がさらに高まるものと期待できる。根本治療法が未確立である現状においてミクログリアを治療標的とした新たな治療開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Alexander disease is a neurological disorder caused by mutations in the astrocyte-specific gene GFAP, also known as primary astrocyte disease. This study focused on microglia, another type of glial cell, and showed that microglia are actively involved in the pathogenesis of Alexander disease. Our studies using a mouse model suggested that microglia sense the elevated extracellular ATP produced by astrocytic pathology in model mice as a pathological signal via the P2Y12 receptor and suppress astrocyte pathology. Microglia were found to have important disease-modifying effects on Alexander disease, the primary astrocytic disease. The study can be expected to contribute to the development of future therapies based on microglial manipulation.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：アレキサンダー病 アストロサイト ミクログリア 2光子イメージング シングルセル解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレキサンダー病は病理学的にアストロサイト細胞質内に GFAP を主成分とするローゼンタル線維を認めることを特徴とする稀な難治性神経変性疾患であり、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 遺伝子変異を認める。病態機序として、変異 GFAP 発現から GFAP 凝集過程で生じるアストロサイトの機能異常が推定される。アストロサイト機能として栄養、代謝輸送、シナプス機能、血流制御を支持することが知られている。アストロサイトは電気生理学的には非興奮性であるが、Ca²⁺シグナル興奮性を有する。その動態は時間的空間的に多様であり、細胞内や細胞同士の重要な情報伝達を担うと考えられ、生理機能および病態に関与する。近年は、外傷、脳虚血、てんかん、神経変性疾患などの病態モデルにおいてアストロサイト Ca²⁺シグナルの変調が報告されている。以上より変異 GFAP が広範な中枢神経異常をもたらす病態機序として、中枢神経系のシグナル伝達を担う Ca²⁺シグナルに着目した。本病で頻度の多いヒト GFAP R239H 変異を導入したモデルマウス(Tanaka et al. *Glia* 2007)を用いて病態研究を行った。モデルマウスの海馬アストロサイトのトランスクリプトーム解析において、アストロサイト活性化マーカーである GFAP の発現上昇を認め、また病的関連マーカーかつ神経毒性因子として *Lcn2*、*C3* の活性化を同定した。さらに、Ca²⁺シグナル制御関連遺伝子の発現変化を認めたことから、アストロサイト Ca²⁺シグナル動態変化がアレキサンダー病の病態と強く関連するとの仮説を立て、Ca²⁺イメージングを用いて病態解析を行った。アストロサイト選択的な Ca²⁺シグナル動態の可視化による、2光子 Ca²⁺イメージングを用いて、モデルマウス特有の著明に拡大する特徴的な異常 Ca²⁺シグナル現象を同定した。また、異常 Ca²⁺シグナル活動性は、病勢マーカーの GFAP 発現量と強い相関があることを示した。さらに Ca²⁺小胞体膜上の IP3 受容体遺伝子 *Ip3r2* をノックアウトする方法により、本病モデルマウスのアストロサイト異常 Ca²⁺シグナル発生を抑制したところ、病的な GFAP 発現が減少し、病態関連マーカー遺伝子 (*Lcn2*、*C3* など) 活性化も抑制された(Saito et al. *Glia* 2018)。以上より、アストロサイト Ca²⁺シグナル異常が、アレキサンダー病の病態を促進する重要な機序であることを明らかにした。本研究ではさらにこの異常なアストロサイト内の Ca²⁺シグナル機構がニューロン活動および中枢神経機能全体にどのような影響を及ぼすのか、てんかん性機序やニューロン病的過剰興奮との関連性を有するか、そしてさらにそれが有効な治療標的となりうるのか、という問いに対して課題を設定し、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

アストロサイト異常 Ca²⁺シグナル活動に着目し、その病態意義を明らかにしたこれまでの研究成果はアレキサンダー病研究において独特の視点である。アストロサイトはトリパータイトシナプスを介してニューロン活動に反応し、シナプス機能の調整制御に能動的に関与すると推定されている。ニューロン異常興奮やてんかん性機序を解明する上で、アストロサイトの機能異常の観点からのグリア・ニューロン間、グリア間の相互作用・情報伝達の変化に注目することは意義がある。一次性にアストロサイトが障害されるアレキサンダー病の病態研究においてそれに着目した本研究は独自性を有する。

本研究ではこれまで研究を進展させ、アストロサイト異常活動がニューロン・他のグリア細胞にどのような病的変化をもたらすかを検証する。Ca²⁺シグナル機構がニューロン機能に及ぼす影響を明らかにできれば、新たな治療標的に発展させることが可能となる。本研究は、Ca²⁺シグナル異常によって惹起しうる、ニューロン・ミクログリア・アストロサイトの相互作用に関連する生理的現象の病的変化、それに関連した分子機構解明を解明することにより、本病の中枢神経病態の解明、治療標的の同定、治療候補薬剤発見につながることを期待できる。さらに、希少難病である本病だけでなく、アストロサイトが病態に関与するアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の病態解明および治療開発に貢献すると考える。

3. 研究の方法

アレキサンダー病(AxD)モデル病態におけるグリア間相互作用を解明するため、まずはミクログリアに着目し、ミクログリア機能イメージング解析(二光子 Ca²⁺イメージング)、シングルセル遺伝子発現解析(scRNA-seq)を実行した。Iba1 プロモータ下に Ca²⁺指示タンパクを発現する遺伝子改変動物(Iba1-tTA; tetO-GCaMP6)と AxD モデルマウスの交配によってミクログリア Ca²⁺イメージング用の AxD モデルを作成し、二光子 Ca²⁺イメージングを行った。得られた結果に対してその分子メカニズムの検証する目的で scRNA-seq によって補完的データを得た(Saito et al. *Brain* 2024)。

4. 研究成果

(1) AxD 疾患モデルとして GFAP 遺伝子変異マウスを用いた。AxD マウス脳において病的異常アストロサイトの密集した部位には、高度に活性化したミクログリアも集積していた。このようなミクログリアは、異常アストロサイトのシグナルを感知して強く応答し、機能的にも活性化状態にあると考えられた。2光子 Ca²⁺イメージングにより観察したところ、AxD モデル(Iba1-GCaMP6-

60TM) ミクログリアの活動性の高い Ca^{2+} シグナルを同定した。さらに行った薬理学実験により、この Ca^{2+} シグナル活性化はミクログリアに特異的な P2Y12 受容体を介していることが判明した (Saito et al. *Brain* 2024)。

(2) このミクログリア活性化 Ca^{2+} シグナルの分子メカニズムを明らかにするため、scRNA-seq により、海馬における全細胞トランスクリプトーム解析を行った。AxD モデルでは、ミクログリアの P2Y12 受容体の発現量自体は増加していなかった。したがってミクログリアの Ca^{2+} シグナル活性化には、この受容体のリガンドである ATP 及び ADP の細胞外濃度上昇が関係している可能性が考えられた。そこで ATP の放出、分解、取り込みに関連する遺伝子の発現状態を調べたところ、アストロサイト特異的な ATP 分解酵素遺伝子 *Entpd2* (タンパク質名: NTPDase2) の発現が低下していた。したがって AxD マウス脳では、アストロサイトの NTPDase2 発現が低下していることにより、ATP 及び ADP が分解されずに高濃度で存在するようになると考えられ、ミクログリアは、これらを病態シグナルとして P2Y12 受容体によって感知し、 Ca^{2+} シグナル上昇、形態変化等の活性化状態を呈することが示唆された (Saito et al. *Brain* 2024)。

(3) アストロサイト異常によって細胞外 ATP 濃度が増加し、これをミクログリアが感知して活性化することが判明した。この活性化したミクログリアは AxD 病態に対してどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、P2Y12 受容体阻害薬であるクロピドグレルを AxD モデルマウスに投与し、疾患病態への影響を調べた。クロピドグレルは、海馬において AxD 病態マーカーであるローゼンタル線維を増加させ、さらに神経細胞障害を起こすこと、つまり AxD 病態を増悪させることが明らかになった。クロピドグレルを野生型マウスに投与しても、このような変化は認められなかった。また siRNA を用いて、P2Y12 受容体遺伝子の発現を低下させた場合にも、上記クロピドグレルと同様、疾患の増悪作用が認められた。つまり、ミクログリアは P2Y12 受容体によりアストロサイトの異常を感知して活性化した後、AxD 病態進行の抑制に関与することが強く示唆された (Saito et al. *Brain* 2024)。このような知見より、一次性にアストロサイトに原因を有する疾患であっても、ミクログリアが大きく病態を修飾する役割があることが明らかとなった。本疾患の根本的治療法が確立されていない現状において、ミクログリアを治療標的とした新たな治療開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 齋藤光象 小泉修一	4. 巻 58
2. 論文標題 ミクログリアによる全身監視・制御システムの解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 853-857
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 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 Koizumi Schuichi, Shigetomi Eiji, Sano Fumikazu, Saito Kozo, Kim Sun Kwang, Nabekura Junichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Abnormal Ca ²⁺ Signals in Reactive Astrocytes as a Common Cause of Brain Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23010149	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 齋藤光象、繁富英治、小泉修一	4. 巻 -
2. 論文標題 アレキサンダー病モデルのCa ²⁺ シグナル現象およびニューロン - グリア間の多様性相互作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Saito Kozo, Shigetomi Eiji, Shinozaki Youichi, Kobayashi Kenji, Parajuli Bijay, Kubota Yuto, Sakai Kent, Miyakawa Miho, Horiuchi Hiroshi, Nabekura Junichi, Koizumi Schuichi	4. 巻 147
2. 論文標題 Microglia sense astrocyte dysfunction and prevent disease progression in an Alexander disease model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 698 ~ 716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awad358	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 Le Yen-Phung, Saito Kozo, Parajuli Bijay, Sakai Kent, Kubota Yuto, Miyakawa Miho, Shinozaki Youichi, Shigetomi Eiji, Koizumi Schuichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Severity of Peripheral Infection Differentially Affects Brain Functions in Mice via Microglia-Dependent and -Independent Mechanisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17597 ~ 17597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242417597	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9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤光象
2. 発表標題 Microglia sense dysfunction of astrocytes by P2Y12 receptors and prevent disease progression of Alexander disease model mice.
3. 学会等名 第26回グリア研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤光象、繁富 英治、篠崎陽一、パラジュリ ビージェイ、小泉 修一
2. 発表標題 The mechanisms of which microglia are related to the pathology in the "primary astrocytic disease" Alexander disease
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 齋藤光象、繁富 英治、篠崎陽一、パラジュリ ビージェイ、小泉 修一
2. 発表標題 "一次性的アストロサイト病" アレキサンダー病モデルのミクログリア機能解析
3. 学会等名 文部科学省科学研究費補助金 学術変革領域研究(A)「グリアデコーディング:脳-身体連関を規定するグリア情報の読み出しと理解」第4回グリアデコード領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤光象、繁富 英治、篠崎陽一、パラジュリ ピージェイ、小泉 修一
2. 発表標題 Microglia Ca2+ signals in Alexander disease model
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤光象、繁富 英治、篠崎陽一、パラジュリ ピージェイ、小泉 修一
2. 発表標題 Microglia Ca2+ signals in Alexander disease model
3. 学会等名 文部科学省科学研究費補助金学術変革領域研究「グリアデコーディング：脳-身体連関を規定するグリア情報の読み出しと理解」第2回・第3回班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 憲司、繁富 英治、パラジュリ ピージェイ、久保田 友人、齋藤光象、田中 謙二、池中 一裕、小泉 修一
2. 発表標題 ミクログリアの自己再生によるアレキサンダー病の抑制
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤光象
2. 発表標題 シンポジウム「中枢性超稀少疾患の薬理」一次性アストロサイト病「アレキサンダー病」の分子病態の薬理学的研究
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤光象
2. 発表標題 アレキサンダー病におけるグリア細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 「遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患の診断・治療・研究システム構築班
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤光象、小泉修一
2. 発表標題 一次性的アストロサイト病 アレキサンダー病におけるミクログリアの関連性機序
3. 学会等名 第66回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024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