

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19425

研究課題名（和文）アストロサイトから神経細胞への分化転換を用いた神経回路の機能的再建

研究課題名（英文）Functional reconstruction of neural circuits using differentiation of astrocytes into neurons

研究代表者

田中 光一（Tanaka, Kohichi）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80171750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患を治療するためには、失われた神経細胞を補充するのみならず、補充された神経細胞が既存の神経回路と機能的な結合をする必要がある。最近アストロサイトのPtbp1遺伝子をノックダウンすると、アストロサイトがその部位の神経細胞と同じ特徴を持った細胞に分化転換し、既存の神経回路に組み込まれることが示されたが、分化転換の効率は十分ではない。本研究では、脳の全ての部位のアストロサイトからPtbp1遺伝子を欠損させ、各部位におけるアストロサイトの分化転換能を解析できるin vivoの系を開発した。しかし、Ptbp1遺伝子の欠損ではアストロサイトから神経細胞への分化転換は怒らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患を治療するためには、失われた神経細胞を補充するのみならず、補充された神経細胞が既存の神経回路と機能的な結合をする必要がある。最近アストロサイトのPtbp1遺伝子をノックダウンすると、アストロサイトがその部位の神経細胞と同じ特徴を持った細胞に分化転換し、既存の神経回路に組み込まれることが示されたが、分化転換の効率は十分ではない。本研究では、アストロサイトから神経細胞への分化転換を阻害する遺伝子を同定し、その効率化を目指した。しかし、Ptbp1遺伝子の欠損ではアストロサイトから神経細胞への分化転換が起こらないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To treat neurodegenerative diseases, it is necessary not only to replenish lost neurons, but also to allow the replenished neurons to functionally connect with existing neuronal circuits. It has recently been shown that knockdown of the Ptbp1 gene in astrocytes can cause astrocytes to differentiate into cells with the same characteristics as the neurons at that site and integrate into existing neural circuits, but the efficiency of this differentiation is not sufficient. In this study, the Ptbp1 gene was deleted from astrocytes in all regions of the brain, and an in vivo system was developed to analyze the differentiation and conversion ability of astrocytes in each region. However, it was found that deletion of the Ptbp1 gene did not result in differentiation conversion from astrocytes to neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：アストロサイト 分化転換 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患を治療するためには、失われた神経細胞を補充するのみならず、補充された神経細胞が既存の神経回路と機能的な結合をする必要がある。従来神経回路の再生は、iPS細胞から分化させた神経細胞の移植を中心に行われてきたが、この方法では、視神経、聴神経、一次求心性感覚神経、上位・下位運動ニューロン、プルキン細胞などの長く複雑な突起を持つ神経細胞が関与する神経回路の再構築は難しい。最近アストロサイトの Ptp1 遺伝子をノックダウンすると、アストロサイトがその部位の神経細胞と同じ特徴を持った細胞に分化転換し、既存の神経回路に組み込まれることが、網膜と黒質で示された(Cell 181:590, 2020; Nature 582:550, 2020)。しかし、網膜・黒質における分化転換の効率は十分ではなく、網膜・黒質以外の脳部位のアストロサイトの分化転換能は不明である。申請者は、GLASTが神経系のほとんど全てのアストロサイト・サテライト細胞に発現していることを明らかにし、それらの細胞特異的に遺伝子操作が可能な GLAST-CreERT2 マウスを作成している(Glia 54:21, 2006)。このマウスを用いることにより、神経系のほとんど全てのアストロサイト・サテライト細胞から Ptp1 を欠損させ、各部位における分化転換能を in vivo で一網打尽に解析できる系を開発でき、各部位での分化転換能を最適化できると着想し、本研究種目に応募した。

2. 研究の目的

本研究では、脳の全ての部位のアストロサイトから Ptp1 遺伝子を欠損させ、各部位におけるアストロサイトの分化転換能を解析できる in vivo の系を開発する。その系を用いて、アストロサイトから神経細胞への分化転換を阻害する遺伝子を同定する。さらに、アストロサイトから Ptp1 と分化転換阻害遺伝子の両方をノックダウンすることが、分化転換能を増強させ、神経変性疾患を治療できるかモデルマウスを用いて確かめる。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3項目を遂行することにより目的を達成する。

(1) in vivo のアストロサイトーニューロン分化転換能評価系の確立

本研究では、神経系のほぼ全てのアストロサイト・サテライト細胞(感覚神経節内に存在するアストロサイトと同様の性質を持つ細胞)から Ptp1 を欠損させたマウスを作成し、神経系の各部位でのアストロサイトから神経細胞への分化転換能をモニターできる in vivo の系を確立する。グルタミン酸輸送体 GLAST は、神経系のほとんど全てのアストロサイト・サテライト細胞に発現しており、申請者は、GLAST の遺伝子座に CreERT2 (タモキシフェンにより活性化される Cre 酵素)をノックインしたマウス(GLAST-CreERT2 マウス)を作成している(Glia 54:21)。本研究では、CRISPR/Cas9 を用い floxd-Ptp1 マウス(Ptp1 遺伝子のエクソン 1 の両側に loxP 配列をノックインしたマウス)を作成し、GLAST-CreERT2 マウスおよび ROSA-LSL-tdTomato マウス(ROSA の遺伝子座に loxP-STOP-loxP-tdTomato をノックインしたマウス)と交配する。このマウスが成熟後、タモキシフェン(Tmx)を投与し、神経系の全てのアストロサイト・サテライト細胞から Ptp1 を欠損させる。タモキシフェン投与後 6 週間したら、神経系を摘出し、各部位の切片を作成し、tdTomato 陽性細胞の中の神経細胞マーカー(NeuN など)陽性細胞の割合や tdTomato 陽性神経細胞の突起の伸長を解析し、各部位でのアストロサイトから神経細胞への分化転換能を明らかにする。解析する部位は、ラセン神経節(サテライト細胞 ラセン神経節細胞)・網膜(ミューラー細胞 網膜神経節細胞)・脊髄後根神経節(サテライト細胞 一次感覚ニューロン)・大脳皮 5 層(アストロサイト 上位運動ニューロン)・小脳(バグマングリア プルキンエ細胞)・脊髄前角(アストロサイト 下位運動ニューロン)である。

(2) アストロサイトーニューロン分化転換を阻害する遺伝子の検索・同定

小脳のバグマングリア(BG)からプルキンエ細胞(PC)への分化転換に着目し、分化転換を阻害する遺伝子を同定する。1)の系を用い、タモキシフェン投与後の分化転換過程で発現が変化する遺伝子群を、小脳プルキンエ細胞層から単離した細胞のシングルセル発現解析を経時的(投与前、投与後 2、4、6 週間)に行うことにより明らかにする。分化転換の過程で発現が減少する遺伝子群に着目し、BG に比べ PC で発現量が少ない遺伝子群を選び、絞り込みを行う。絞り込んだ遺伝子群は分化転換を阻害する因子と考えら、その発現を抑制すると分化転換が促進すると期待される。阻害遺伝子のノックダウンによる分化転換促進作用の確認は、CasRx(Cas13d)による in vivo ノックダウンを用いて行う。GFAP プロモーターの下流に CasRx、U6 プロモーターの下流に候補遺伝子に対する 2 種類の guide RNAs (gRNAs)をつないだ AAV ベクターのライブラ

リーを作成する。1)で作成したマウスの小脳表面の髄液腔に、タモキシフェン（腹腔）とともに AAV ベクターを注入し阻害遺伝子候補の発現をノックダウンさせ、6 週間後に tdTomato 陽性 BG 中のカルビンディン(PC のマーカー)陽性細胞の割合や tdTomato 陽性 PC の突起の伸長を解析し、BG から PC への分化転換の促進作用を確かめる。

(3) アストロサイトーニューロン分化転換を用いた神経変性疾患モデルの治療

脊髄小脳変性症 6 型モデルマウスは、生後 6 週から小脳失調症状を、生後 8 週にはプルキンエ細胞の変性を示す(PNAS 109:17693, 2012)。このマウスの小脳表面の髄液腔に Ptbp1 ノックダウン用 AAV ベクター（GFAP プロモーターの下流に CasRx、U6 プロモーターの下流に Ptbp1 に対する 2 種類の guide RNAs (gRNAs)をつないだベクター）と 2)で同定した分化転換阻害因子をノックダウンする AAV ベクターを注入し、小脳失調症状（rotarod 試験、歩行解析）やプルキンエ細胞数の減少が改善されるか解析する。

4. 研究成果

(1) in vivoのアストロサイトーニューロン分化転換能評価系の確立

CRISPR/Cas9 を用い floxd-Ptbp1 マウス（Ptbp1 遺伝子のエクソン 1 の両側に loxP 配列をノックインしたマウス）を作成した。このマウスを GLAST-CreERT2 マウスおよび ROSA-LSL-tdTomato マウスと交配し、in vivo でアストロサイトからニューロンへの分化転換能を評価できる系を確立した。このマウスが成熟後、タモキシフェン (Tmx)を投与し、神経系の全てのアストロサイト・サテライト細胞から Ptbp1 を欠損させたマウスを作成した。tdTomato 陽性のニューロンを全脳にわたって観察したが、数が少なく解析できなかった。

(2) アストロサイトーニューロン分化転換を阻害する遺伝子の検索・同定

Ptbp1 遺伝子をアストロサイトから欠損させても、全脳において神経細胞への分化転換が起こらなかったため、分化転換を阻害する遺伝子の検索をできなかった。

(3)アストロサイトーニューロン分化転換を用いた神経変性疾患モデルの治療

アストロサイトからニューロンへの分化転換は、神経変性により促進することが報告されている。脊髄小脳変性症 6 型モデルマウスは、生後 6 週から小脳失調症状を、生後 8 週にはプルキンエ細胞の変性を示す(PNAS 109:17693, 2012)。脊髄小脳変性症 6 型モデルマウスと上記のアストロサイトーニューロン分化転換能評価系マウスを交配し、バーグマングリアからプルキンエ細胞への分化転換が見られるか解析したが、tdTomato 陽性のプルキンエ細胞は数が少なく、解析できなかった。

5. 考察

本研究では、アストロサイトの Ptbp1 遺伝子をノックダウンすると、アストロサイトがその部位の神経細胞と同じ特徴を持った細胞に分化転換し、既存の神経回路に組み込まれることの報告を元に、アストロサイトから神経細胞への分化転換を増強させ、神経変性疾患を治療できるかを確かめることを目標にした。しかし、アストロサイトから Ptbp1 遺伝子を欠損させても、全脳において、アストロサイトから神経細胞への分化転換を観察することはできなかった。同様の結果は、我々の研究室以外のいくつかの研究室から報告された。これらの結果は、Ptbp1 の遺伝子欠損のみではアストロサイトから神経細胞への分化転換は起こらないことを示している。アストロサイトは神経細胞に比べ、様々なストレスに耐性を持っており、神経細胞へ分化転換できれば、新しい神経変性疾患の治療法として期待できる。そのためには、アストロサイトから神経細胞への分化転換に重要な役割を果たす遺伝子群の同定が必須である。

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 4件）

1. 著者名 Morizawa Yosuke M., Matsumoto Mami, Nakashima Yuka, Endo Narumi, Aida Tomomi, Ishikane Hiroshi, Beppu Kaoru, Moritoh Satoru, Inada Hitoshi, Osumi Noriko, Shigetomi Eiji, Koizumi Schuichi, Yang Guang, Hirai Hirokazu, Tanaka Kohichi, Tanaka Kenji F., Ohno Nobuhiko, Fukazawa Yugo, Matsui Ko	4. 巻 25
2. 論文標題 Synaptic pruning through glial synapse engulfment upon motor learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1458 ~ 1469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-022-01184-5	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 Ishida Saeko, Zhao Di, Sawada Yuta, Hiraoka Yuichi, Mashimo Tomoji, Tanaka Kohichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Dorsal telencephalon-specific <i>Nprl2</i> - and <i>Nprl3</i> -knockout mice: novel mouse models for GATORopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	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) 10.1093/hmg/ddab337	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 Ito Takahiro, Yoshida Mikio, Aida Tomomi, Kushima Itaru, Hiramatsu Yuka, Ono Maiko, Yoshimi Akira, Tanaka Kohichi, Ozaki Norio, Noda Yukihiro	4. 巻 165
2. 論文標題 Astrotactin 2 (<i>ASTN2</i>) regulates emotional and cognitive functions by affecting neuronal morphogenesis and monoaminergic systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 211 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15790	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 Kanaya Teppei, Ito Ryo, Morizawa Yosuke M., Sasaki Daichi, Yamao Hiroki, Ishikane Hiroshi, Hiraoka Yuichi, Tanaka Kohichi, Matsui Ko	4. 巻 71
2. 論文標題 Glial modulation of the parallel memory formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2401 ~ 2417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24431	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 Xing Lei, Gkini Vasiliki, Nieminen Anni I., Zhou Hui-Chao, Aquilino Matilde, Naumann Ronald, Reppe Katrin, Tanaka Kohichi, Carmeliet Peter, Heikinheimo Oskari, P??bo Svante, Huttner Wieland B., Namba Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Functional synergy of a human-specific and an ape-specific metabolic regulator in human neocortex development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-024-47437-8	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

〔学会発表〕 計0件

〔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			
ドイツ	Max Planck Institute			
フィンランド	University of Helsinki			