

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32684

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790257

研究課題名(和文) グリア細胞の活動が調節するシナプス形成機構の解明

研究課題名(英文) The involvement of astrocytes in the synaptic formation

研究代表者

小川 泰弘 (OGAWA, YASUHIRO)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00531948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体内でのシナプス形成機構におけるアストロサイトの関与について解析することを目的とした。その研究目的の中で、生体内でのシナプス形成を視覚化すること、さらに標的とする細胞のみから mRNA を回収する技術を確立することに成功した。また、モデルマウス由来アストロサイトのマイクロアレイを用いた網羅的解析により、神経系では初となる Foxh1 遺伝子による SMAD シグナルへの遺伝子発現制御機構とその標的タンパク質を発見した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the involvement of astrocytes in the synaptic formation in brain. We established with success a visualization of synaptic formation and a mRNA collection from the target cells in vivo. Using analysis of microarray gene expression data, it was also found that Foxh1 gene, which interacts with SMAD signaling, and its target molecules were over-expressed in the astrocytes derived from the model mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分子・細胞生理学 ニューロン グリア相互作用 神経科学 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳や脊髄により構成される中枢神経系は、神経伝達を行うニューロンだけではなく、アストロサイトやオリゴデンドロサイト、ミクログリアといったグリア細胞からなる。この本研究課題では、このグリア細胞が神経系においてどのような役割を担っているかを解明することを目的とした。

(2) 上述のグリア細胞は、古くはニューロンの隙間を埋める糊として考えられてきたために神経膠細胞と呼ばれてきた。このうちアストロサイトは星状膠細胞とよばれ、基本的にはニューロンに対して栄養を供給する細胞であると考えられてきた。しかしながら、近年、アストロサイトとニューロン同士で作られるシナプス-シナプス間に積極的に影響を与えることが解明されてきており、これを三者間シナプス (Tripartite synapse; ニューロン-ニューロン-アストロサイト間) と呼んでいる。

(3) 申請者は、米国多発性硬化症協会及び上原財団研究助成より助成を受け、ランビエ絞輪におけるジャクスタパラノード領域において、膜一回貫通型タンパク質である ADAM22 依存的に PSD-93/95 が局在できることを示してきた。シナプスにおいては、PSD-95 は AMPA 型受容体数の調節を担っている。近年、ニューロンより分泌される Lgi1 がシナプス後膜において ADAM22 と結合し PSD-95 を介して AMPA 型受容体数を増加させることが明らかになった (Fukata et al., *Science* 313, 1792-5, 2006)。これらより、シナプスにおいても ADAM22 依存的な PSD-95 の局在変化によって AMPA 型受容体数の変化を引き起こし、その結果シナプスの成熟化を引き起こすことが考えられる。さらに申請者は研究業績 1 において、ADAM22 の免疫沈降物の中に Lgi4 が含まれることから ADAM22-Lgi4 相互作用の存在を明らかにした。この Lgi4 はアストロサイトより分泌されるタンパク質であること、さらに小児欠神てんかんのなかには Lgi4 遺伝子座に変異が観察される (Gu et al., *Neurogenetics*, 5, 41-4, 2004) ことから、アストロサイトからの分泌物である Lgi4 がシナプスの成熟化の一端を担うことを強く示唆した。

(4) アルツハイマー病や脳腫瘍、また Tay-Sachs 及び Sandhoff 等リソソーム病などの中枢神経系の疾患において、Thrombospondin、Tenascin-C、SPARC などの発現の増強が解明されている。これらは幼弱なアストロサイトから分泌されるタンパク質であり、シナプス形成やニューロンの成熟に影響を与えることが考えられる (Eroglu et al., *J. Cell Commun. Signal*, 3, 167-176, 2009)。

(5) アストロサイト上に発現する膜一回貫通型タンパク質 ephrin-A3 はニューロン側での受容体である EphA4 と相互作用していることが報告されている。具体的には、それぞれのノックアウトマウスの解析により、スパイン形成やグルタミン酸トランスポーター GLAST 及び GLT-1 の発現量の変化により long-term potentiation に影響を与えることが明らかになり、分泌タンパク質だけではなくアストロサイト側からの接着分子関連の重要性が示された (Filosa et al., *Nat Neurosci*, 12, 1285-92, 2009; Carmona et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 12524-9, 2009)。

2. 研究の目的

アストロサイトは分泌タンパク質や細胞接着因子により複合的にシナプス形成及び成熟化にかかわっていること、精神神経疾患薬のターゲットになりうるということが明らかにされてきた。脳腫瘍時において、てんかん発作が起こることが知られているが、これに対し詳細な原因解明になるだけでなく、精神神経疾患など高次脳機能を含む中枢神経系の疾患においてアストロサイトが薬理的ターゲットになり得ることを示す。そこで申請者はニューロン-アストロサイト相互作用について着目し、*in vivo* においてアストロサイトの活動を抑制的に制御することで、アストロサイトに由来するニューロンへの影響とアストロサイトにおいてどのような変化が起こるかを検討し、その新規ターゲット分子を見だしその機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 組換えアデノウイルスベクターの作製
常法を用いて以下の組換えアデノウイルスベクターの構築を行い、その発現を確認した。
① optGluCl α/β ; 生細胞の活動を制御する目的で、線虫の改変型グルタミン酸受容体を利用する。このチャネルは、イベルメクチンにより、制御することができ、塩化物イオンを通過させるイオンチャネルである。これにより、チャネルが開くと、マイナスイオンである塩化物イオンが細胞内に入ることによって、細胞をマイナスに制御することができる。また、同様のシステムとしてイベルメクチン感受性改変型ヒトグリシン受容体を発現するアデノウイルスの構築を行った。
② 膜移行性 GFP; ニューロンやアストロサイトなど細胞の形態変化を詳細に観察する目的で、GFP 遺伝子に膜移行性シグナルを融合した膜移行性 GFP を構築し、アデノウイルスによる発現ベクターを構築した。
③ PSD95-GFP; ニューロン上での情報伝達の場合であるシナプスの形態や数、シナプス上のタンパク質を回収する目的で、シナプス後膜で足場として機能するタンパク質である PSD95 遺伝子をクローニングし、これに GFP 遺伝子を融合することでシナプス後膜選択

的に局在する GFP タンパク質を発現するアデノウイルスベクターを構築した。

④L10A-GFP；ニューロンやアストロサイトのそれぞれの mRNA を回収する目的で、mRNA に結合するタンパク質である L10A 遺伝子をクローニングし、これと GFP 遺伝子を融合し、細胞特異的に mRNA を回収する L10A-GFP 発現アデノウイルスベクターを構築した。

(2) トランスジェニックマウスの作製

動物個体内でのアストロサイトの活動を制御する目的で、改変型ヒトグリシン受容体遺伝子を LoxP 配列下にもつトランスジェニックマウスの構築を行った。これは、上述と同様に、イベルメクチン存在下においてグリシン受容体が開くことにより塩化物イオンの流入により細胞がマイナスに制御されることを目的としている。すなわち、このマウスは Cre-LoxP システムにより、その発現を細胞特異的に制御することを目的としている。

(3) グリア細胞に異常が観察されるノックアウトマウスの解析

上記の実験を補足する目的で、グリア細胞に異常が観察されるノックアウトマウスを解析した。このマウスは、基本的には 3~4 か月齢にかけてニューロン特異的に変性し脱落することで死亡が観察されるマウスであるが、それより以前の発生期より、申請者は異常があることを発見している。この時期においては、ニューロンの変性は観察されておらず、グリア細胞の異常による神経系への異常を解析する目的に極めて良いモデルとなり得ると考えられる。このマウスを組織学的に解析すると同時に、モデルマウスに由来する培養グリア細胞を調整し、その異常を解析する目的で遺伝子発現の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 子宮内マウス胎仔脳への遺伝子の導入時期と導入されるニューロンの検討

胎生期での神経発生は、ラジアルグリア細胞からニューロンが産生されるが、胎生時期に依存して大脳皮質では特定のニューロンが産生される。層構造を構築するそれぞれのニューロンの産生時期を確認し、遺伝子導入される細胞を確定する目的で、アデノウイルスによる GFP 遺伝子の導入を、各胎仔期において行い、生後 21 日齢において GFP シグナルを免疫染色により確認した。

その結果、胎生期 15.5 日齢にアデノウイルスにより遺伝子導入されたニューロンは、第二/三層のニューロンに GFP 陽性シグナルが観察された。また、これらが、アデノウイルスにより障害を持たないことを確認する目的で電位依存性ナトリウムイオンチャネルである Nav1.6、さらに電位依存性カリウムイオンチャネル Kv2.1 により確認した (Fig. 1A-C)。また、各胎生期においてアデノウイ

ルスベクターにより遺伝子を導入したところ、胎生期 12.5 日齢においては第五層内錐体細胞を、14.5 日齢においては、第四層内顆粒層、13.5~14.5 日齢においては第二/三層外顆粒層及び外錐体細胞において GFP シグナルが観察された (Fig. 1D)。

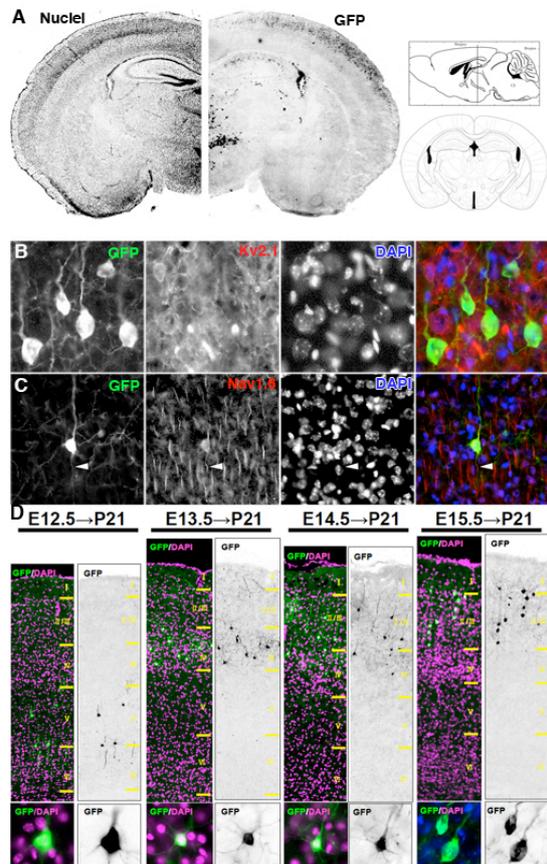


Fig. 1 子宮内マウス胎仔脳への遺伝子の導入時期と導入されるニューロンの検討

(2) 各種アデノウイルスベクターによる GFP 融合タンパク質の in vivo での発現確認

GFP 融合タンパク質が、アデノウイルスによって in vivo において適切に発現し機能的なタンパク質として有用であるかを検討する目的で、胎生期 15.5 日齢において子宮内マウス胎仔脳へアデノウイルスベクターにより、各種目的遺伝子の導入を行い、生後 21 日齢において染色により確認を行った。

膜移行性 GFP を発現させると、第三層錐体細胞の形態を、軸索の投射まで確認することができた (Fig. 2A)。さらに、シナプス後膜タンパク質である PSD95 に GFP を融合した PSD95-GFP 遺伝子を発現させると、樹状突起上に顆粒状に並んだシナプスにのみ GFP シグナルが観察された (Fig. 2B)。この顆粒状のシグナルは軸索上には観察されなかったため、正確にシナプス後膜に局在することが示された。また、mRNA 結合タンパク質である L10A に GFP を融合した L10A-GFP 遺伝子を発現させると、導入されたニューロンの核内において粒子状の GFP シグナルが観察され、

L10A タンパク質の性質を有することが確認できた (Fig. 2C)。

以上のことから、膜移行性 GFP 融合タンパク質、PSD95-GFP、L10A-GFP の各遺伝子発現系を確認することができた。一方で、optGluCL α / β あるいは、改変型ヒトグリシン受容体を発現するアデノウイルスは、その遺伝子の持つ特性により構築することができなかったため、次のトランスジェニックマウスの構築を行った。

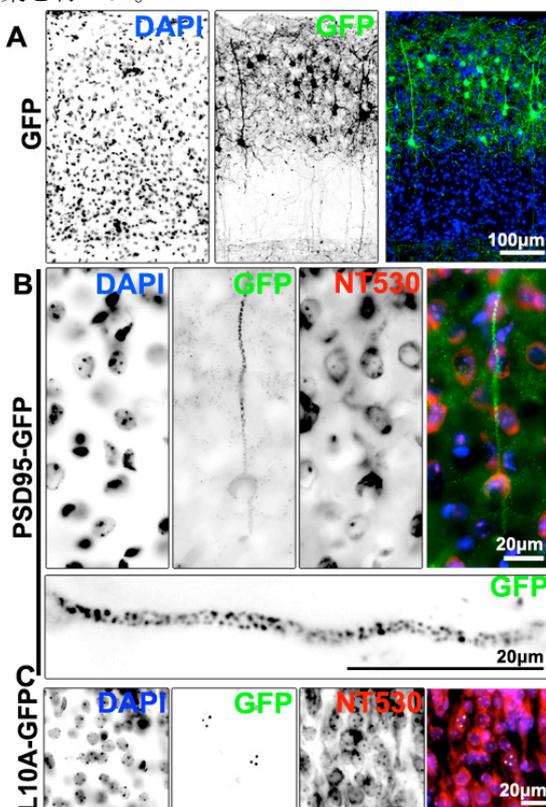


Fig. 2 各種アデノウイルスベクターによる GFP 融合タンパク質の in vivo での発現確認

(3) 改変型ヒトグリシン受容体を発現するトランスジェニックマウスの構築

in vivo において、アストロサイトの活動を制御する目的で、Cre-LoxP システムによりイベルメクチン感受性改変型ヒトグリシン受容体を発現するトランスジェニックマウスの樹立を行った。

導入遺伝子は、CAG プロモーター下に LoxP 配列で挟まれた赤色蛍光タンパク質 RFP あるいは Stuffer 配列と、LoxP 配列下に改変型ヒトグリシン受容体を持ち、両サイドをニワトリ HS4 インシュレーターで挟んだものを作製し、受精卵に導入することで構築した (Fig. 3)。個体化した後、導入遺伝子の発現を PCR により確認したところ、それぞれ 2 系統及び 3 系統のラインが存在した。しかしながら、全脳に目的遺伝子を発現しうるマウスの構築には至らなかった。この実験系に対しては、Mlc1-tTA マウスを利用した Tet システムを利用することで、アストロサイトの長期的な制御を行うこととした。そこで、グリア細胞の

異常が検出されるマウスの、グリア細胞に由来する異常の検出を併せて行った。

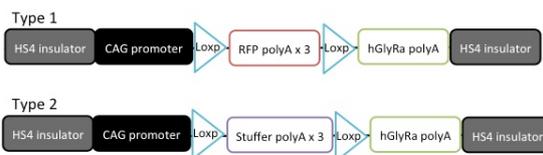


Fig. 3 トランスジェニックマウス作成のための導入遺伝子

(4) グリア細胞に由来する異常の検出

グリア細胞から神経系への影響を検討する目的で、グリア細胞に異常が検出されるノックアウトマウスの解析を行った。

このマウスでは、グリア細胞の顕著な異常が観察され、これによる中枢神経系への多大な影響を与えることが申請者等の解析により明らかとなりつつある。そこで、アストロサイト単独での異常を検出する目的で、培養アストロサイトを調整し、これを 1 か月間培養し、マイクロアレイ解析により、遺伝子の発現変化を解析した。その結果、1.2 倍以上の発現変化で、有意に異常の観察される遺伝子群が検出された (Table)。

中でも、興味深いことに、SMAD タンパク質と結合することで直接遺伝子発現を調節する *Foxh1* 遺伝子の発現の増強が観察された。SMAD シグナルは、TGF β や BMP シグナルの活性化により、アストロサイト内で遺伝子発現を制御する因子であり、これに対して *Foxh1* タンパク質が結合することで、さらに発現する遺伝子の種類や発現量などを調節するものと考えられる。例えば、増強してくる遺伝子の中に *Aldh3b2* 遺伝子があるが、これの遺伝子発現調節領域に *Foxh1*/SMAD が結合する領域が存在し、その発現を制御すると予想される。

また、*Il-12a* 遺伝子の発現増強が観察されるが、これは、脳内の免疫担当細胞であるミクログリアからだけではなく、アストロサイトからも分泌されることが報告されており、これにより免疫系細胞の活性化及び増殖を制御することが示唆される。

近年、ミクログリア細胞においても、シナプス形成へ直接的また、積極的に関与していることが報告されているために、今後、アストロサイト-ミクログリア-シナプス間の 4 者間でのシナプス形成機構の解明が重要である。以上のことから、アストロサイト内での新規遺伝子発現調節因子が発見され、この新規標的タンパク質のアストロサイト内での機能の解析、さらに、ミクログリアを含めたグリア細胞-シナプス間での制御機構解析の重要性が認められたことから、今後更なる検討が必要である。

Up-regulated genes		
Gene accession No.	Gene symbol	Fold Change
NR_004412.1	<i>Rnu1b1</i>	1.35
AB267093.2	<i>GS14</i>	1.31
NM_146271.2	<i>Olf1511</i>	1.31
NM_001177438.1	<i>Aldh3b2</i>	1.30
NM_007703.2	<i>Elovl3</i>	1.30
NM_008295.2	<i>Hsd3b5</i>	1.30
NM_007989.4	<i>Foxh1</i>	1.29
NM_181529.4	<i>Syt15</i>	1.29
AY374994.1	<i>Olf95</i>	1.28
NM_010640.1	<i>Klk1b11</i>	1.27
NM_153133.2	<i>Rdh9</i>	1.27
NM_174877.3	<i>Zar1</i>	1.25
NM_030614.2	<i>Fgf16</i>	1.25
XM_006524123.1	<i>H2-M10.4</i>	1.24
XM_006508612.1	<i>Ppfia1</i>	1.24
NM_009218.3	<i>SSTR3</i>	1.23
NM_001159424.1	<i>IL12a</i>	1.23
NM_001033904.1	<i>Khdc1c</i>	1.22
NM_013903.2	<i>Mmp20</i>	1.22
NM_009426.3	<i>Trh</i>	1.22
NM_008382.2	<i>INHbE</i>	1.22
NM_010114.1	<i>Klk1b22</i>	1.21
NM_172802.4	<i>Fscn2</i>	1.21
XM_006503496.1	<i>Tmem61</i>	1.21
AY318457.1	<i>Olf1256</i>	1.21
NM_015745.2	<i>Rbp3</i>	1.21
AY317570.1	<i>Olf462</i>	1.21
NM_133351.3	<i>Prss8</i>	1.20
NM_001040426.3	<i>Thsd4</i>	1.20
NM_175520.4	<i>Hcar1/Gpr81</i>	1.20
NM_199222.3	<i>Lman1l</i>	1.20
NM_009885.1	<i>Cel</i>	1.20
NM_011731.3	<i>Slc6a20b</i>	1.20

Down-regulated genes		
Gene accession No.	Gene symbol	Fold Change
NR_002840.2	<i>Gas5</i>	1.53
NM_001037987.3	<i>EDIL3/Del-1</i>	1.32
NM_173870.3	<i>Mgat4a</i>	1.28
XM_006542916.1	<i>RNF213</i>	1.27
NM_025647.3	<i>CMPK1</i>	1.26
NM_001112798.2	<i>Slc8a1</i>	1.26
NM_001277149.1	<i>CHD7</i>	1.25
NM_144946.4	<i>Neto1</i>	1.25
BC038937.1	<i>TRIM5</i>	1.22
NM_178202.2	<i>Hist1h2bp</i>	1.22
NM_153564.2	<i>GBP5</i>	1.21
NM_001033367.3	<i>Nlrc4</i>	1.21

Table グリア細胞に異常の検出されるマウス由来培養アストロサイトの遺伝子発現の差次的解析

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Susuki K, Chang KJ, Zollinger DR, Liu Y, Ogawa Y, Eshed-Eisenbach Y, Dours-Zimmermann MT, Oses-Prieto JA, Burlingame AL, Seidenbecher CI, Zimmermann DR, Oohashi T, Peles E, Rasband MN. Three mechanisms assemble central nervous system nodes of Ranvier. *Neuron* (査読有) 78, 2013, 469-482.
- ② Ogawa Y, Tanaka M, Tanabe M, Suzuki T, Togawa T, Fukushima T, Kanekura T, Sakuraba H, Oishi K. Impaired neural differentiation of induced pluripotent stem cells generated from a mouse model of Sandhoff disease. *PLoS ONE* (査読有) 8, 2013, e55856
- ③ Galiano MR, Jha S, Ho TS, Zhang C, Ogawa Y, Chang KJ, Stankewich MC, Mohler PJ, Rasband MN. A distal axonal cytoskeleton forms an intra-axonal boundary that controls axon initial segment assembly. *Cell* (査読有) 149, 2012, 1125-1139.
- ④ Susuki K, Raphael AR, Ogawa Y, Stankewich MC, Peles E, Talbot WS, Rasband MN. Schwann cell spectrins modulate peripheral nerve myelination. *Proc Natl Acad Sci USA*. (査読有) 108, 2011, 8009-8014.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 江東 洗、小川 泰弘、大石 一彦 P0-Cre x Z/EG トランスジェニックマウスから作製した iPS 細胞 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日～3 月 21 日 仙台国際センター
- ② 佐野 貴文、小川 泰弘、櫻庭 均、大石 一彦 ザンドホッフ病モデルマウスにおいてグリオーシスが発症前に起きている 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日～3 月 21 日 仙台国際センター
- ③ 小川 泰弘、大石 一彦 ザンドホッフ病モデルマウス脳の早期異常を見つけました 臨床遺伝学公開シンポジウム 2014 年 3 月 14 日 明治薬科大学 総合教育研究棟 フロネシス
- ④ 高田 昂、小川 泰弘、大石 一彦 ザンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞はニューロンに分化しにくいことを見つけました 臨床遺伝学公開シンポジウム 2013 年 3 月 5 日 明治薬科大学 総合教育研究棟 フロネシス
- ⑤ 田中 真、小川 泰弘、鈴木俊宏、兎川

忠靖、櫻庭 均、大石 一彦 ザンドホッフ病モデルマウスから作製した iPS 細胞 第 85 回日本薬理学会年会 2012 年 3 月 14 日～3 月 16 日 国立京都国際会館

- ⑥ 小川 泰弘、大石 一彦 ザンドホッフ病モデルマウス由来 iPS 細胞から神経系細胞を作りました 2012 年 3 月 10 日 明治薬科大学 総合教育研究棟 フロネシス

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 泰弘 (OGAWA, YASUHIRO)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00531948