

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430003

研究課題名(和文) 神経-グリア相互作用におけるグリアATP受容体の役割

研究課題名(英文) Functional roles of glial ATP receptors in neuron-glia interaction

研究代表者

細井 延武 (HOSOI, Nobutake)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90543570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：グリア細胞は、神経細胞と同様にATP受容体を持ち、神経系の情報処理に能動的に関与する可能性がある。当初、小脳グリアATP受容体の機能的役割を調べるため、microRNAを利用したグリアATP受容体遺伝子の特異的発現抑制を試みたがうまく行かなかった。しかしながら、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて小脳グリア特異的に遺伝子を導入する実験を行う中、通常AAVベクターで導入できる遺伝子サイズを実質上増やしてグリアに発現させることが可能な方法を開発することができた。この方法の長所と短所を実験的に明らかにし、その成果を学術誌に論文投稿する準備を行っている。

研究成果の概要(英文)：Similarly to neurons, glial cells have ATP receptors and may play an active role in neuronal information processing. Originally, in order to examine functional roles of cerebellar glial ATP receptors, I tried to knockdown glial ATP receptors using microRNA-mediated gene silencing technique and it did not work. However, while I tried to express transgenes selectively in cerebellar glial cells with adeno-associated virus (AAV) vectors, I managed to develop a method in which larger transgenes can be expressed in glial cells, compared to the usual usage of AAV vectors. The pros and cons of this method were examined experimentally, and I am preparing for publishing the results.

研究分野：神経科学

キーワード：AAV 小脳 グリア 二重感染

1. 研究開始当初の背景

神経系において、グリア細胞は活動電位を発生せず電気的にはほぼ不活性であるため、従来、グリアは神経系の高速度で多様な演算処理には直接的に関与せず、単なる物理的な支持や脳内代謝の調節などの裏方的役割しか果たしてないと考えられてきた(工藤ほか, 2007;小泉, 2007)。

しかしながら、グリアには、神経細胞と同じように、さまざまな神経伝達物質の受容体が存在することが次第に明らかになり、それらの受容体が、神経細胞から放出された伝達物質に反応して、ニューロン-グリア相互作用によって、神経回路の情報処理に積極的にかかわりうる可能性が出てきた。実際、小脳グリアには ATP 受容体が存在し、細胞外の ATP に対して小脳グリアの細胞内 Ca が上昇する現象(Ca 応答)が見ついている(図 1; 細井 未発表データ)。しかしながら、グリア細胞の ATP 受容体の機能的役割はいまだ明らかになっていない。

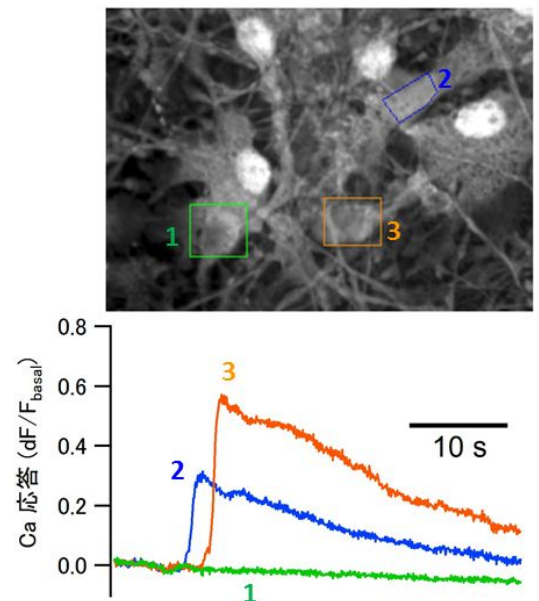


図1 培養小脳グリア細胞に ATP (100 μ M)を投与したときのCa応答

2. 研究の目的

小脳では、ほぼすべての細胞に ATP 受容体が発現しているため(Burnstock, 2007)、阻害剤を用いた薬理的な方法では小脳グリアに存在する ATP 受容体のみを選択的にブロックすることは不可能である。そのため、本研究では、小脳グリアに存在する ATP 受容体の機能的役割を明らかにするため、グリア特異的な遺伝子発現を誘導するウイルスベクターの技術と人工的 microRNA (miRNA) を利用した遺伝子発現抑制の技術

(Boudreau et al., 2011)を組み合わせ、小脳グリア特異的に ATP 受容体の発現を抑制する方法を開発し、実験を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ATP 受容体をターゲットとする miRNA のコンストラクトを用意し、グリア特異的 GFAP プロモーターを用いたウイルスベクターによって、グリア特異的に miRNA を発現し、グリア特異的な ATP 受容体遺伝子の発現抑制を試みる。発現抑制の程度は、培養小脳グリアの Ca 応答(図 1)や免疫染色などで評価する。

4. 研究成果

残念ながら研究期間内に小脳グリアの ATP 受容体の発現をうまく抑制する方法を確立することが出来なかった。その原因として、今回用いた培養小脳グリアの系では、すべてのグリアが ATP 投与によって応答するわけではなく(図 1、緑 1)、むしろ ATP に応答するグリアのほうが少ないことがほとんどであり、培養ロットによって応答がかなりばらついており、コントロール条件でも ATP 応答が見られない場合もあった。そのため、安定して ATP 応答を評価できなかったことが挙げられる。また、免疫染色などによっても ATP 受容体発現の程度をうまく評価できなかった。

その一方で、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いてグリア特異的に外来遺伝子を発現させる実験を行う中、Tet off システムと AAV 二重感染法の技術を組み合わせ、通常 AAV に搭載できる遺伝子サイズが約 4kb 程度に限定されているところを、そのサイズを実質上増やしてグリアに発現させることが可能な方法を開発することが出来た。この方法では、どの細胞でその遺伝子が発現するかを決定するプロモーター部分と発現したい遺伝子(発現遺伝子)の部分を分離し、それぞれ別の AAV ベクターに搭載して二重感染を行い、Tet off システムを利用して両方の AAV ベクターが同じ細胞に感染した時のみに、その発現遺伝子が発現されるようにする方法である。具体的には、以下のような 2 種類の AAV ベクターを用意した。

- (1) AAV-mGFAP-mtTA (プロモーター-AAV)
- (2) AAV-TRE-GFP (発現遺伝子 AAV)

(1)をプロモーター-AAV ベクターとよび、(2)を発現遺伝子 AAV ベクターと呼ぶことにする。mGFAPは、マウス GFAP のプロモーターであり、グリア特異的プロモーターである。mtTA は、哺乳類での発現に最適化されたテトラサイクリン調節性トランス活性化因子(tTA)で

あり(Inamura et al., 2012)、TRE 配列はテトラサイクリン応答因子である。プロモーター-AAV ベクターと発現遺伝子 AAV ベクターが同じ細胞に感染し、その細胞がグリアであれば mGFAP プロモーターによってグリア特異的に mtTA が発現し、その mtTA が TRE 配列に結合して GFP を発現させる。

この方法では、プロモーター部分と発現遺伝子部分を分けることによって、その分より大きなサイズのプロモーターあるいは発現遺伝子を AAV ベクターに搭載できる利点がある。その一方、理論的には、上述の(1)(2)の AAV ベクターを同時に用いた二重感染法の場合でも mGFAP プロモーターを用いているためグリア特異性が保たれるはずであるが、マウス小脳に接種したところ、プロモーター-AAV ベクターの titer(力価)をあげるほど、発現のグリア特異性が低下し、プルキンエ細胞などのグリア以外の神経細胞で GFP が発現する

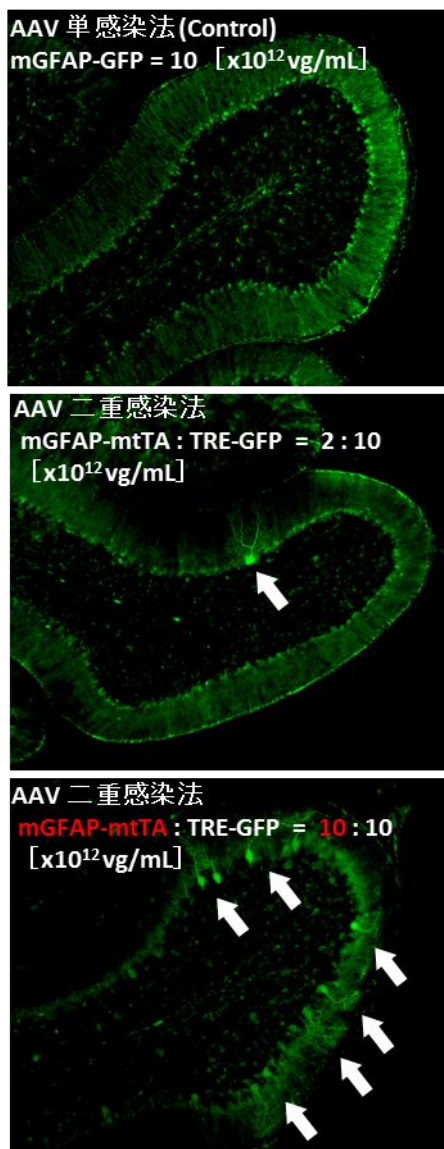


図2 AAV単感染法とAAV二重感染法によるグリア感染特異性の違い (白矢印はプルキンエ細胞を示す)

ことが多くなる現象を見出した(図2、中段と下段、白矢印;下段では中段よりも5倍の力価のプロモーター-AAV ベクターを用いた)。Control 条件として、AAV-mGFAP-GFP という同じ mGFAP プロモーターを用いた 1 種類の AAV ベクターをマウス小脳に単感染させたところ、GFP の発現はグリア細胞だけに局限しており、非特異的発現は見られなかった(図2、上段)。

したがって、この Tet off システムと AAV 二重感染法を組み合わせる方法を用いる場合、導入遺伝子のサイズを増やせる利点がある反面、本来そのプロモーターが持つ発現特異性とは異なる非特異的な発現が生じうる短所も実験的に明らかとなり、この方法を用いる場合は、プロモーター-AAV ベクターの力価を下げて実験を行うことが望ましいことが示唆された。AAV ベクターを用いた遺伝子発現の技術は、生命科学研究において広く用いられているだけでなく、ヒトに対して遺伝子治療を行う際にも使用されており、研究上のツールとしてだけでなく、臨床的にも非常に重要な技術である。したがって、AAV ベクターを用いた遺伝子発現技術の長所と短所を実験的に明らかにしておくことは、大きな意義を持つと思われる。これらの成果をまとめ、学術誌に投稿する準備を進めている。

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 2 件)

(1) Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice.

Shuvaev AN, Hosoi N, Sato Y, Yanagihara D, Hirai H.

J Physiol. 2017 Jan 1;595(1):141-164. doi: 10.1113/JP272950. Epub 2016 Sep 15.

査読あり

(2) Glycine release from astrocytes via functional reversal of GlyT1.

Shibasaki K, Hosoi N, Kaneko R, Tominaga M, Yamada K.

J Neurochem. 2017 Feb;140(3):395-403. doi: 10.1111/jnc.13741. Epub 2016 Aug 9.

査読あり

〔学会発表〕(計 11件)

(1) N. Hosoi, A. Shuvaev, H. Hirai
Progressive impairment of metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated signaling and cerebellar synaptic plasticity in spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) model mice
Neuroscience 2016 SfN 46 th Annual meeting, 2016年11月12日~2016年11月16日 サンディエゴ (アメリカ)

(2) 細井延武、Anton Shuvaev、平井宏和
脊髄小脳変性症(SCA1)モデルマウスにおける小脳シナプス可塑性の進行性異常
第39回日本神経科学学会 2016年7月20日から2016年7月22日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(3) Nobutake Hosoi, Masayuki Shichida, Ayumu Konno and Hirokazu Hirai
Probing expression pattern of a novel AAV double infection method combined with the Tet system and the glia specific GFAP promoter
10th FENS Forum of Neuroscience 2016年7月2日~2016年7月6日 コペンハーゲン (デンマーク)

(4) 細井延武、アントン シュワエフ、平井宏和
脊髄小脳変性症 1型モデルマウスにおける短期・長期シナプス可塑性とCa²⁺シグナルの進行性異常
第93回日本生理学会大会 2016年3月22日~2016年3月24日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

(5) 細井延武、平井宏和
脊髄小脳変性症1型(SCA1)モデルマウスにおけるmGluRを介したシナプス伝達の進行性異常
第38回日本神経科学大会 2015年7月28日~2015年7月31日 神戸国際会議場、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

(6) 七田真之、細井延武、今野歩、平井宏和
短縮型マウス GFAP プロモーターと Tet systemを組み合わせた新規AAV二重感法による遺伝子発現のグリア特異性の検討
第38回日本神経科学大会 2015年7月28日~2015年7月31日 神戸国際会議場、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

(7) 七田真之、細井延武、今野歩、平井宏和
短縮型マウス GFAP プロモーターと Tet systemを組み合わせた新規AAV二重感法による遺伝子発現のグリア特異性の検討
第5回国際放射線神経生物学会大会 2015

年2月21日 高崎シティギャラリー(群馬県高崎市)

(8) 細井延武、平井宏和
小脳性運動失調とシナプス伝達異常
第91回日本生理学会大会 2014年3月16日~2014年3月18日 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
細井 延武 (Nobutake HOSOI)
群馬大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 90543570

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
今野 歩 (Ayumu KONNO)
群馬大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 40509048

平井 宏和 (Hirokazu HIRAI)
群馬大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70291086

(4) 研究協力者
()