

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24601  
 研究種目：基盤研究(B) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26293039  
 研究課題名(和文) 淡蒼球アストロサイトの形態機能連関—パーキンソン病の新しい治療法開発にむけて—  
  
 研究課題名(英文) Morphology-function relationship in the astrocytes of Globus Pallidus  
  
 研究代表者  
 和中 明生 (WANAKA, AKIO)  
  
 奈良県立医科大学・医学部・教授  
  
 研究者番号：90210989  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はOlig2遺伝子プロモーターの下流にGFPを発現するダブルトランスジェニックマウスを用いて、淡蒼球アストロサイトの形態を詳細に追跡した。淡蒼球は脳基底核回路の構成要素であり、運動機能の調整に深く関わっている。ダブルトランスジェニックマウスに3週間の運動負荷を与えるとOlig2アストロサイトはその形態を複雑化させることを明らかとした。このような形態変化は同部位でのシナプス伝達の円滑化、効率上昇に関わっていることが考えられるので、さらに光遺伝学的にアストロサイトを活性化したところ、片側刺激により回転運動を誘発することが明らかとなった。現在この現象の分子的背景をさらに解析している。

研究成果の概要(英文)：We expressed GFP protein in the astrocytes of the Globus Pallidus (GP) by double transgenic technology, which utilize Olig2 gene promoter-driven Cre recombinase and ROSA-floxed-EGFP. Voluntary exercise (running) for three weeks renders the Olig2-astrocytes more complex and bushy morphologies than those of control (sedated) mice. These bushy astrocytes may be involved in synaptic transmission by promoting transmitter uptake and/or by releasing gliotransmitters. To test this hypothesis, we expressed channelrhodopsin in the Olig2-astrocytes in the unilateral GP. By introducing blue laser beam, we specifically activated the astrocytes and checked effects on the mice behavior. The laser beam-treatment induced circling behavior in the double transgenic mice, suggesting that there might be inbalance between ipsilateral and contralateral neural circuit activities of the basal ganglia. We are now investigating detailed molecular mechanisms underlying this behavior.

研究分野：神経化学、分子神経生物学

キーワード：アストロサイト 脳基底核 運動 光遺伝学 シナプス伝達 Olig2

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来アストロサイトは中枢神経系において神経細胞と血管の間をつなぎ、栄養を橋渡しする機能が主なもので、神経機能に積極的には関わらないとされてきたが、近年この考え方に疑問が呈されている。すなわちアストロサイトはシナプス部位を包み込み、その場で神経伝達物質を取り込み、また自身からもグリオトランスミッターと呼ばれる伝達物質を放出することで積極的に神経伝達に関わるという「三つ組みシナプス」仮説が脳の様々な部位において提唱されている。

(2) アストロサイトの上記機能は正常状態だけではなく、病的状態(例えば脳虚血、変性疾患等)においても脳機能回復の面から非常に重要な因子と言える。

(3) 我々はこれまでグリア前駆細胞に発現する Olig2 遺伝子に着目し、同遺伝子の機能的意義をダブルトランスジェニックマウス(詳細は後述)を用いて解析してきた。この過程で、成熟脳内の特定神経核のアストロサイトにおいて Olig2 遺伝子を発現する集団が存在することを認めた。

## 2. 研究の目的

(1) まず Olig2 発現アストロサイト(以下 Olig2 アストロサイト)の形態を GFP 蛋白の発現を通じて(詳細は方法の項参照)光学顕微鏡及び電子顕微鏡レベルで詳細に解析すること、及びこの形態が運動負荷によってどのように変化するかについて定量的に解析する。

(2) Olig2 アストロサイトに光感受性チャネル蛋白である Channerhodopsin (ChR2) 及び Archerhodopsin-T (Arch-T) を特異的に発現させ、これらアストロサイトをレーザー照射することで活性化或いは抑制し、その結果として起こる機能変化を神経回路活動、及び個体レベルでの行動変化を通じて解析する。

(3) 片側パーキンソン病モデルを上記光感受性チャネルを発現させたトランスジェニックマウスにドーパミン神経毒である 6-OHDA を片側黒質に微量注入し作成する。このマウスに片側レーザー照射することで運動の偏り(回転運動)を補正できるか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Olig2 プロモーターの下流にタモキシフェン感受性の遺伝子組換え酵素である CreER をノックインさせたトランスジェニックマウス(以下 Olig2-CreER マウス)と ROSA

遺伝子座に loxP 配列で囲んだ Stop Codon の下流に GAP43-EGFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(以下 Rosa-GAP43-EGFP マウス)を交配させたダブルトランスジェニックマウス(以下ダブル TG マウス)をまず作成する。このダブル TG マウスではタモキシフェンを食餌に混ぜて与えると Olig2 遺伝子が活性化している細胞でのみ組換えが起こり、GAP43-EGFP 蛋白が発現する。この融合蛋白は単なる EGFP とは異なり GAP43 蛋白の細胞膜指向性ドメインを有するので、細胞の隅々まで EGFP が行き渡り細胞形態の詳細な描出が可能となる。このダブル TG マウスにタモキシフェンを給餌で与えてから以下の3群に分ける。1) タモキシフェン後、通常ケージに3週間飼うグループ(コントロールグループ)、2) 回し車を備えたケージに3週間飼うグループ(Runner グループ)、3) 回し車のケージに3週間、その後通常ケージに戻して3週間飼うグループ(Runner-Rest グループ)。これらのグループのマウスを灌流固定後、脳を取り出し、抗 EGFP 抗体を用いた蛍光抗体法、或いは免疫電子顕微鏡法で EGFP 蛋白の局在を検討した。

(2) Olig2-CreER マウスの淡蒼球或いは黒質網様部にアデノ随伴ウイルスベクターに組み込んだ Flox 化 ChR2 発現カセット(CMV-flox-ChR2) 或いは Arch-T 発現カセット(CMV-flox-Arch-T)を微量注入し、Olig2 アストロサイトに特異的にタモキシフェン存在下に ChR2 或いは Arch-T 光感受性チャネルを発現させる。これらマウスの淡蒼球或いは黒質網様部に光ファイバーを挿入し、青色レーザー(ChR2 活性化)黄色レーザー(Arch-T 活性化)を照射する。この際に片側だけにレーザー照射することで、運動の偏り(回転運動)が起こるか否かを検討する。

(3) (2) の検討を行った後に、ChR2 或いは Arch-T を発現した Olig2-CreER マウスの黒質緻密部に向けてドーパミン神経毒である 6-OHDA を微量注入し、片側の黒質-線条体路のドーパミン回路を変性させる。このマウスはアポモルフィンを投与されると変性側と同じ側に回転運動をすることが知られている。この回転運動を確認した後に光ファイバーを同側の淡蒼球或いは黒質網様部に向けて刺入し、レーザー光を照射することでアポモルフィン投与の際の回転運動が補正されるか否かを検討する。

## 4. 研究成果

(1) Olig2 アストロサイトの形態と運動負荷に対する動的反応

ダブル TG マウスに運動負荷無し(コントロールグループ)、自発運動あり(Runner グループ)、3週間の自発運動後、3週間の運動

負荷なし (Runner-Rest グループ)

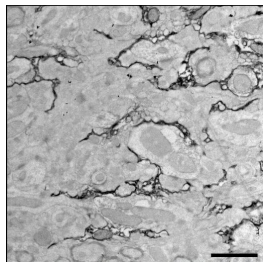
の EGFP 陽性細胞 (Olig2 アストロサイト) の形態を比較すると、コントロールグループに比して、Runner グループでは明らかに細胞の突起が多くなり、複雑な形態を取ることが観察された。また興味深いことに、Runner-Rest グループでは、コントロールグループと同じような単純な形態に戻っていることが明らかとなった。このような形態変化を定量化するために以下の二つの指標で評価した。

(2) Olig2 アストロサイトの形態変化の光学顕微鏡レベルでの定量解析

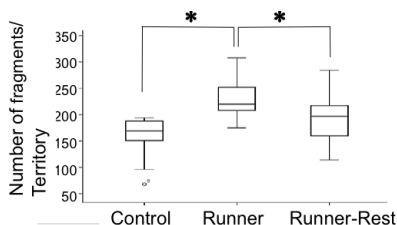
3 グループの Olig2 アストロサイトを EGFP 抗体を用いた蛍光抗体法で染色し、レーザー共焦点顕微鏡で撮像した。この画像を白黒イメージに変換し、NIHimage ソフトウェアを用いて細胞一個あたりの蛍光強度 (黒バックグラウンドに比した白強度) を測定し、各々のグループから 3 匹ずつの個体/60 個ずつのアストロサイトを抽出し、グループ間での平均蛍光強度を統計解析したところ、コントロールグループと Runner グループの間に有意な差があった。Runner-Rest グループは Runner グループに比して蛍光強度は低下傾向を認めしたが有意差には至らなかった。

(3) Olig2 アストロサイトの形態変化の電顕定量解析

(2) の結果を踏まえてさらに免疫電子顕微鏡法を用いて Olig2 アストロサイトの微細形態の描出とそれを用いた形態の定量評価を試みた。EGFP 陽性の Olig2 アストロサイトの微細突起は以下のような神経絨の中の黒色の反応として検出された。



この反応を用いて定量化するために、単位面積あたりの独立した黒色の反応の個数を数え、この数が多い程細胞突起の複雑性が増しているとした。3 グループで比較したところ以下のように Runner グループが有意に



複雑性を増していることが示された。

(4) Olig2-CreER マウスへのアデノ随伴ウ

イルスベクターの導入の検討

Olig2-CreER マウスに光感受性チャネルを発現させるために予備検討として EGFP を組み込んだ組換えウイルスを導入し、EGFP が Olig2 アストロサイトに発現するか否かを検討した。結果は予想に反して、非常に発現量が低く、この系を用いて光感受性チャネルを発現させることは困難であると結論した。

(5) GFAP-Cre マウスを用いた検討

(4) の予備検討の結果を踏まえ、当初予定していた計画を変更し、GFAP-Cre マウスにアデノ随伴ウイルスベクターを導入しその発現効率を検討した。Olig2 アストロサイト特異的ではないが、GFAP は Olig2 アストロサイトも含めてより広くアストロサイトに発現していることを確認した。結果は GFAP-Cre マウスにはアデノ随伴ウイルスベクターを用いた EGFP 導入は高効率で行えることが分かった。そこで光感受性チャネルである Chr2 と Arch-T を GFAP-Cre マウスに発現させる実験を行った。導入部位も当初の予定である淡蒼球より GFAP アストロサイトが豊富である黒質網様部に標的を変更した。

(6) 黒質網様部への光感受性チャネル導入と行動実験。

GFAP-Cre マウスの片側黒質網様部にまず Chr2 発現カセットを組み込んだ組換えウイルスを微量注入した。次に同部位に向けて光ファイバーを刺入し、青色レーザー光を照射した。照射中5分間の行動をビデオに録画し、行動 (立ち上がり、回転、毛づくろい等) を評価した。レーザー光を照射すると導入側と同じ側に非常に緩徐に鼻先を向ける運動が持続して観察された。これは導入側の脳基底核回路の内、間接経路が活性化されている (運動が全体として低下) ことを示唆するものである。そこで次にレーザー光を照射中にアポモルフィンを投与した。すると投与後の導入側への回転運動が惹起された。これは導入側の間接経路 (線条体-淡蒼球-視床下核-黒質網様部-視床経路) が反対側に比して活性化したことを示している。

(7) 片側パーキンソン病モデルマウスへの光感受性チャネル導入実験。

(6) の結果を受けて、GFAP-Cre マウスの片側黒質緻密部に 6-OHDA を導入し、同部位のドーパミン神経細胞を変性脱落させた。これはドーパミン神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素 (TH) の免疫染色で確認した。このマウスでは破壊側の脳基底核間接経路が活性化しているため、対側の黒質網様部に Chr2 を発現させ、青色レーザー光照射をすることで対側の間接経路を活性化させて両側のバランスを取ることを現在試みているところである。

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12件)

1: Tanaka T, Murakami K, Bando Y, Nomura T, Isonishi A, Morita-Takemura S, Tatsumi K, Wanaka A, Yoshida S. Microglia support ATF3-positive neurons following hypoglossal nerve axotomy. *Neurochem Int*. 2017 May 15. pii: S0197-0186(17)30004-9.

2: Ikawa D, Makinodan M, Iwata K, Ohgidani M, Kato TA, Yamashita Y, Yamamuro K, Kimoto S, Toritsuka M, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Okumura K, Tanaka T, Wanaka A, Owada Y, Tsujii M, Sugiyama T, Tsuchiya K, Mori N, Hashimoto R, Matsuzaki H, Kanba S, Kishimoto T. Microglia-derived neuregulin expression in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun*. 2017 61:375-385.

3: Makinodan M, Ikawa D, Miyamoto Y, Yamauchi J, Yamamuro K, Yamashita Y, Toritsuka M, Kimoto S, Okumura K, Yamauchi T, Fukami SI, Yoshino H, Wanaka A, Kishimoto T. Social isolation impairs remyelination in mice through modulation of IL-6. *FASEB J*. 2016 12:4267-4274.

4: Morita-Takemura S, Nakahara K, Tatsumi K, Okuda H, Tanaka T, Isonishi A, Wanaka A. Changes in endothelial cell proliferation and vascular permeability after systemic lipopolysaccharide administration in the subfornical organ. *J Neuroimmunol*. 2016 298:132-7.

5: Takahashi H, Ogawa Y, Yoshihara S, Asahina R, Kinoshita M, Kitano T, Kitsuki M, Tatsumi K, Okuda M, Tatsumi K, Wanaka A, Hirai H, Stern PL, Tsuboi A. A Subtype of Olfactory Bulb Interneurons Is Required for Odor Detection and Discrimination Behaviors. *J Neurosci*. 2016 36(31):8210-27.

6: Tatsumi K, Okuda H, Morita-Takemura S, Tanaka T, Isonishi A, Shinjo T, Terada Y, Wanaka A. Voluntary Exercise Induces Astrocytic Structural Plasticity in the Globus Pallidus. *Front Cell Neurosci*. 2016 10:165.

7: Nochioka K, Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Ogata N, Wanaka A. Hedgehog Signaling Components Are Expressed in Choroidal Neovascularization in

Laser-induced Retinal Lesion. *Acta Histochem Cytochem*. 2016 49(2):67-74.

8: Okuda H, Tatsumi K, Morita-Takemura S, Nakahara K, Nochioka K, Shinjo T, Terada Y, Wanaka A. Hedgehog Signaling Modulates the Release of Gliotransmitters from Cultured Cerebellar Astrocytes. *Neurochem Res*. 2016 41(1-2):278-89.

9: Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, Miyata S. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res*. 2016 363(2):497-511.

10: Nakano Y, Furube E, Morita S, Wanaka A, Nakashima T, Miyata S. Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *J Neuroimmunol*. 2015 278:144-58.

11: Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, Miyata S. Vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis and dynamic vascular plasticity in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res*. 2015 359(3):865-84.

12: Shimomura T, Kawakami M, Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Nochioka K, Kirita T, Wanaka A. Retinoic acid regulates Lhx8 expression via FGF-8b to the upper jaw development of chick embryo. *J Biosci Bioeng*. 2015 119(3):260-6.

〔学会発表〕(計5件)

Tatsumi K, Okuda H, Takemura SM, Tanaka T, Isonishi A, Wanaka A, Astrocytic structural changes correlate with overall running activities in the globus pallidus. 第13回アジア太平洋神経化学学会大会 2016年8月27日-30日、於マレーシア、クアラルンプール市

Wanaka A, Okuda H, Tatsumi K, Morita S, Astrocytic chondroitin sulfate proteoglycans in Brain injury and in glutamate uptake functions. 第25回国際神経化学学会大会 2015年8月23日-27日、於オーストラリア、ケアンズ

森田晶子、中原一貴、辰巳晃子、奥田洋明、宮田清司、和中明生、末梢からの炎症シグナルによって引き起こされる脳弓下器官の血管の可塑的变化 第38回日本神経科学学会大会、2015年7月28日-31日、於神戸

奥田洋明、辰巳晃子、森田晶子、和中明生、  
Hedgehog signaling modulates the release  
of gliotransmitters from cultured  
cerebellar astrocytes. 第58回日本神経化学  
学会大会 2015年9月11日-13日 於大宮

辰巳晃子、奥田洋明、森田晶子、和中明生、  
Characterization of Olig2 positive  
astrocytes in the normal adult forebrain.  
第58回日本神経化学学会大会、2015年9月11  
日-13日 於大宮

〔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

和中 明生 ( WANAKA, Akio )

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90210989

##### (2) 研究分担者

竹村-森田 晶子 ( TAKEMURA-MORITA,  
Shoko )

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40453162

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )