

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18344

研究課題名(和文)興奮性シナプス入力 of 樹状突起内統合におけるグリア・ニューロン代謝連関の解明

研究課題名(英文)Astrocyte-neuron energetic interaction in dendritic integration of excitatory synaptic inputs

研究代表者

永瀬 将志 (Nagase, Masashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・ポスト・ドクトラルフェロー

研究者番号：40749462

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)：異なる種類の興奮性シナプス入力のアストロサイトによってエネルギー的に支えられて樹状突起内で統合される機構の解明を目指して研究を進めた。形態が異なる二種の特徴的な興奮性シナプスが単一ニューロンに形成される扁桃体中心核を用いて、アストロサイトによるラクテート依存的エネルギー供給がこれらの二種の興奮性シナプスのシナプス伝達の維持に共通して必須であることを明らかにした。さらに、興奮性シナプス伝達に伴う局所的カルシウム動態を解析することによって、二種の興奮性シナプス入力 that 樹状突起の異なる部位に投射し、入力位置と入力頻度依存的に樹状突起内で統合される可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：I aimed to reveal the roles of astrocyte-neuron energetic interaction in maintaining excitatory synaptic inputs from distinct origins and the mechanisms of dendritic integration of these inputs. I focused on the central amygdala because the inputs from two distinct origins form excitatory synapses on the distinct dendritic compartments, spines and dendritic shafts. I found that energy supply through lactate transfer from astrocytes was indispensable to maintain excitatory synaptic transmissions at both spine and shaft excitatory synapses. I also found that calcium rises associated with these synaptic inputs were observed at distinct dendritic compartments and propagating into the overlapping compartments in a manner that depends on the location of calcium rise initiation and the frequency of the synaptic inputs.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起内統合 アストロサイト ラクテート 扁桃体 エネルギー代謝 パッチクランプ カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

ニューロンの基本的な役割は複数のシナプス入力を統合して、次のニューロンへ情報を伝達することである。シナプスはスパインシナプス、樹状突起シャフトシナプスまたは軸索 細胞体間シナプスなど、さまざまな形態をもつ。このような異なる形態のシナプスからの入力統合される現象として、興奮性入力に対する抑制性入力によるシャント効果がよく知られている。しかし、複数の興奮性シナプス入力が樹状突起内で相互作用して統合される機構は未解明であり、その解明は神経科学の重要な基礎課題である。

興奮性シナプス伝達はニューロンの活動の中でも最もエネルギーを消費する。我々は、脳幹の孤束核において、興奮性シナプス伝達がニューロン自身ではなく、アストロサイトから供給されるラクテート由来のエネルギーに大きく依存して維持される事実を明らかにし、報告した (Nagase et al, *J Neurosci*, 2014)。さらに、シナプス伝達のラクテート供給依存性は脳内の諸部位に共通した性質であること、その一方、依存するニューロンの機能は脳部位によって異なることを見出している。スパインシナプスとシャフトシナプスのように形態が異なるシナプスにおいても、シナプスと接するアストロサイト突起の形態の違いから、シナプス伝達を支えるラクテート供給の役割が異なることが予想される。しかし、単一ニューロンの異なる形態のシナプスのそれぞれにおいて、ラクテート供給が担う個別の役割は明らかにされていない。

扁桃体中心核 (CeA) は有害性感覚情報の情動成分と感覚成分を連合し、特に痛みによる負情動の形成に中心的な役割を担う神経核である。CeA ニューロンの活動は、(1) 橋の外側腕傍核 (LPB) と、(2) 扁桃体外側基底核 (BLA) という、全く離れた部位に由来する二種の興奮性シナプス入力によって制御される。これらは、LPB 由来入力は有害性感覚情報の情動成分を、BLA 由来入力は感覚成分を同一の CeA ニューロンに伝える。驚くべきことに、両シナプス入力はどちらも興奮性であるにもかかわらず、LPB-CeA シナプスは樹状突起のシャフト上に、BLA-CeA シナプスはスパインにいずれも非対称性シナプスを形成することが、Dong らの電子顕微鏡像解析によって明らかにされた (Dong et al, *J Comp Neurol*, 2010)。このように機能的・形態的に異なる二種のシナプスからの興奮性入力が樹状突起内でどのように統合され、CeA ニューロンの活動を制御するかは、実は未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シャフトシナプスとスパインシナプスの二種の特徴的な興奮性シナプスが単一ニューロンに形成される CeA ニューロンを用いて、異なる種類の興奮性シナ

プス入力が、(1) どのようにアストロサイトによってエネルギー的に支えられて、(2) どのように樹状突起内で干渉して統合され、単一ニューロンの活動を制御するか、その機構を解明することである。

3. 研究の方法

以下の2つのアプローチを用いて研究を進めた。

(1) シナプス伝達に及ぼすアストロサイト依存的エネルギー供給阻害の影響の解析

C57BL/6L マウス (3-5 週齢) から扁桃体を含む急性脳スライス標本 (厚さ 400 μm) を作成後、グルコース (10 mM) を含む人工脳脊髄液で灌流維持した。ATP (2 mM) を含むパッチ内液を用いてホールセル・パッチクランプ記録を行い、膜電流あるいは膜電位を記録した。刺激電極を用いて LPB 由来線維および BLA ニューロンを電気刺激して、LPB-CeA および BLA-CeA 興奮性シナプス後電流を誘発した。電気刺激は 100 ms 間隔で 2 回与え、1 回目の振幅に対する 2 回目の振幅の比 (paired-pulse ratio, PPR) を放出確率の変化の指標として用いた。この刺激を 0.1 Hz で LPB 由来線維と BLA ニューロンに交互に与えた。

(2) 興奮性シナプス伝達に伴う局所的カルシウム動態の解析

急性脳スライス標本作成後、カルシウム指示薬 (Fluo-5F 200 μM) と蛍光色素 (Alexa 568 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えたパッチ内液を用いてホールセル・パッチクランプを行い、単一ニューロンにカルシウム指示薬と蛍光色素を導入した。蛍光色素の観察下に樹状突起およびスパイン構造を同定した。マグネシウムフリーの人工脳脊髄液を用いて NMDA 受容体電流記録条件下とし、LPB-CeA および BLA-CeA シナプス伝達に伴う局所的カルシウム動態をカルシウムイメージングによって可視化した。カルシウムイメージングは高速撮像可能なニポウディスク共焦点レーザー顕微鏡を用いて、10-20 frames/s で撮像した。

4. 研究成果

(1) アストロサイトによるラクテート依存的エネルギー供給が両シナプス伝達の維持に担う役割を明らかにするために、その機能分子であるモノカルボン酸トラスポーター (MCT) の薬理的阻害がニューロンの諸機能に及ぼす影響を解析し、以下の成果を得た。

細胞外グルコースおよび細胞内 ATP 存在下にもかかわらず、MCT 阻害薬 4-CIN (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; 1 mM, 15 min) は LPB-CeA および BLA-CeA のシナプス後電流の振幅を顕著に減少させた。4-CIN によるこの振幅減少率はどちらも 60%程度であり、振幅減少率に両シナプス間で差は認められなかった。MCT 阻害がシ

ナプス前の放出確率に及ぼす影響を、放出確率の指標である PPR を用いて評価した。4-CIN は両シナプスにおいて PPR に著明な影響を及ぼさなかった。MCT 阻害が膜電位および活動電位に及ぼす影響を解析した。シナプス伝達に及ぼす著明な作用とは対照的に、4-CIN は CeA ニューロンをわずかに脱分極させたただけであった。活動電位の振幅には著明な影響を及ぼさなかった。

以上の結果は、興奮性シナプスの形態にかかわらず、シナプス伝達の維持にアストロサイトによるラクテート供給が不可欠であること、および、ラクテート供給の役割は異なる形態のシナプスでも共通している可能性を示す。

(2) LPB-CeA と BLA-CeA の興奮性シナプス入力が樹状突起内で統合される様式を明らかにするために、両シナプス伝達に伴う局所的カルシウム動態とその樹状突起内伝播を評価し、以下の成果を得た。

両シナプス伝達は樹状突起の異なる部位で、一過性かつ局所的なカルシウム上昇を誘発した。シナプス伝達に伴うカルシウム上昇は NMDA 受容体拮抗薬 (APV 50 μ M) によって消失した。

シナプス伝達に伴うカルシウム上昇の空間的特性を明らかにするために、カルシウム上昇の発生スポット (カルシウムスポット) の樹状突起内分布を解析した。97%以上のカルシウムスポットはどちらか一方のシナプス伝達に特異的であったが、一部のスポットは両方のシナプス伝達に応答を示した。カルシウムスポットはどちらのシナプス伝達でもスパインとシャフトで認められたが、LPB-CeA ではシャフトで、BLA-CeA ではスパインで有意に多く認められた。カルシウムスポットと細胞体の距離、および、カルシウムスポットが観察された樹状突起に至るまでの分岐数に、両シナプス伝達間で差は認められなかった。

両シナプス伝達に伴うカルシウム上昇の樹状突起内相互作用を明らかにするために、その樹状突起内伝播を解析した。カルシウム上昇の樹状突起内伝播はさまざまな様式を示し、カルシウムスポットに局限するものや周囲に広がるものが認められた。両シナプス伝達のカルシウムスポットが近接して位置していたとき、シナプス伝達に伴うカルシウム上昇は樹状突起の同一部位まで伝播した。シナプス伝達に伴うカルシウム上昇の樹状突起内伝播の時空間的特性をより詳細に明らかにするために、LPB および BLA の電気刺激の回数が樹状突起内伝播に及ぼす影響を解析した。単回刺激誘発シナプス伝達よりも、連続刺激 (2 回または 5 回; 50 Hz) 誘発シナプス伝達に伴うカルシウム上昇の方が樹状突起内を広範囲に伝播した。

以上の結果は、異なる投射元からの興奮性シナプス入力が樹状突起の異なる部位に主

に投射し、入力位置と入力頻度依存的に樹状突起内で統合される可能性を示す。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Nagase M, Watabe AM, Kato F.
Dendritic integration of excitatory inputs of distinct origins to distinct dendritic compartments in the central amygdala.
第 39 回日本神経科学大会, 2016 年 7 月 20-22 日, パシフィコ横浜 (横浜).

(2) Nagase M, Watabe AM, Kato F.
Regulation of synaptic transmission and membrane potential through distinct mechanisms by monocarboxylate transporters.
第 93 回日本生理学会大会, 2016 年 3 月 22-24 日, 札幌コンベンションセンター (札幌).

〔図書〕(計 1 件)

(1) 永瀬将志, 加藤総夫.
メディカルドゥ.
脳内環境辞典 モノカルボン酸トランスポーター.
2017 年. 160 ページ (92-93 ページ)

〔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
東京慈恵会医科大学 神経科学研究部 ホームページ

http://www.jikei-neuroscience.com/website/what_we_have_found_recently/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永瀬 将志 (Masashi Nagase)

東京慈恵会医科大学・医学部・

ポスト・ドクトラルフェロー

研究者番号：40749462

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()