

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401  
研究種目：基盤研究(A) (一般)  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16H01888  
研究課題名(和文) グリア細胞により支援される皮質神経回路の可塑性

研究課題名(英文) Cortical circuit plasticity supported by glia

## 研究代表者

平瀬 肇 (Hirase, Hajime)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90392084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,690,000円

研究成果の概要(和文)：グリア細胞の一種であるアストロサイトが記憶学習の成立にどのように機能するかをマウスを用いて研究した。アストロサイトのCa<sup>2+</sup>上昇が抑制されるIP3R2ノックアウトマウスを観測したところ、単離飼育下において海馬脳波に異常がみられた。また、経頭蓋直流電気刺激では、アストロサイトに加えミクログリアもノルアドレナリンによる影響を受けることが分かった。恐怖条件付け学習時に、アストロサイト神経網において、Ca<sup>2+</sup>のみならずcAMPの上昇を見出した。そして、光刺激のできるGq-GPCRをアストロサイトに発現させた遺伝子改変マウスを作製し、アストロサイトのGqシグナルが長期記憶の保持を促進させることを示した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

分子生物学と光イメージングの技術の進歩により、グリア細胞の研究はこの10年間に大きく発達した。これらの最新の技術を駆使してin vivoイメージング実験を進めたところ、本研究により記憶学習獲得時およびtDCS刺激によるグリア細胞の活動様式が明らかとなった。この結果は、学習障害や記憶低下はグリア細胞を刺激することで改善できる可能性を提起した。実際にアストロサイトをOptoA1ARを利用して光遺伝学的に刺激したところ、記憶の保持が良くなったことから、グリアによる脳機能の操作は現実味を帯びてきたものといえる。

研究成果の概要(英文)：The operational dynamics of the astrocyte in relation to memory and learning have been investigated. We found a hippocampal sharp wave ripple phenotype in IP3R2-KO mice that were reared in isolation. In addition to astrocytes, we showed that microglia are affected by tDCS in mice. We found that Ca<sup>2+</sup> and cAMP are elevated in astrocytic soma and processes during fear conditioning learning. To understand how GPCR signaling in astrocytes contributes to memory, we made a transgenic mouse that express an optogenetic Gq-GPCR in astrocytes. Using this mouse, we demonstrated that astrocytic Gq activation promotes the maintenance of remote memory.

研究分野：神経科学

キーワード：グリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳の神経細胞は、活動電位を発生してシナプスで接続されている他の神経細胞に電位変化を与え、情報処理を行っている。記憶と学習は、シナプスの伝達効率の調節により成立するものであると考えられている。アストロサイトは、シナプスを被覆するグリア細胞であり、大きな膜電位変化は起こさないが、脳内で  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を起こす (Hirase et al. PLoS Biol. 2004)。麻酔下マウスを用いた我々の研究で、アストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が、マウス大脳皮質シナプス可塑性に重要な役割を担うことを見出された (Takata et al. J. Neurosci 2011)。前脳基底部から投射されるアセチルコリンが拡散放出され、アストロサイトの G 蛋白共役型受容体 (GPCR) を活性する事を示したこの研究報告は、神経修飾物質がグリアを介してシナプス可塑性を促進させるという新たなシナプス可塑性の様式を検証したものである。

一方、覚醒下にある動物では、ノルアドレナリンの放出がアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を惹起するとの報告がされている。(Wang et al. Cell Calcium 2013; Paukert et al. Neuron 2013)。実際、アストロサイトには、Gq 型の GPCR である  $\alpha 1$  受容体が多分に発現している (例、Zhang et al. J Neurosci 2014)。ここに、学習の成立において、神経修飾物質の拡散放出→アストロサイトの GPCR 活性→アストロサイトから神経細胞への物質分泌 (あるいは細胞外濃度の調節) というニューロン・グリア相互作用が考えられる。しかし、無麻酔動物のグリアからシナプスへの作用様式およびその効果の詳細は不明である。

神経細胞とアストロサイトの活動は、細胞内カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 上昇に反映され、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサーで観測出来る。近年では蛍光タンパク質を利用した感度の高い  $\text{Ca}^{2+}$  センサーが開発され、個々の脳細胞の活動を観測することが可能となった。我々は、G-CaMP7 蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサーを神経細胞とアストロサイトに発現するトランスジェニックマウス (G7NG817) を作製した (図 2、Monai et al. 2016)。このマウスは、経頭蓋イメージング出来ると言う特長を有す。即ち、頭蓋骨を露出するだけで神経活動を可視化でき、神経・グリア活動を非侵襲的かつ慢性的に観測できる。このマウスを用いて、を流す経頭蓋直流刺激療法 (以下 tDCS) は、大脳皮質に全体的にアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を誘発させ、さらにこの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、ノルアドレナリン作動性投射と  $\alpha 1$  受容体に依存することがわかってきた。

### 2. 研究の目的

上記の背景から本課題では、アストロサイトの GPCR 活性による皮質の機能変化を見出し、そのメカニズムを解明したい。また、そのような変化が動物の学習や行動に影響どのように影響するのかを追究したい。

NG817 マウスではシナプスとアストロサイト微小突起からなる神経網 (ニューロピル) から、個々のシナプスやアストロサイトの信号を抽出することが出来る。tDCS をはじめとする様々な刺激や慢性的経験をマウスに与え、大脳皮質感覚野と高次野の感覚刺激に対する情報表現様式の変化をニューロピル信号から解析する。そして、この変化がアストロサイトの GPCR 活性に依存するかを確認する。さらに、各種 GPCR の光遺伝学で、ニューロピル信号の変化が再現できるかを追認する。最終的には、アストロサイト GPCR によるニューロピル信号変化が、マウスの学習能あるいは気分に影響するのかを見極め、アストロサイトが学習障害や気分障害の進行の作用点となるかを検証したい。

### 3. 研究の方法

実験動物にはマウスを用い、大脳皮質感覚野のニューロピルの活動を二光子励起顕微鏡を用いて観測した。ニューロピルの  $\text{Ca}^{2+}$  活動には、BAC-GLT1-G-CAMP7 (NG817 ライン) を用いた。cAMP の活動には、Pink Flamingo を発現するアデノ随伴型ウイルスベクター (AAV) を用いた。AAV で発現させる緑色蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして G-CaMP7、赤色蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして RCaMP あるいは jRGECO1a を用いた。細胞外スペースのトレーサーとして、ピオチン化デキストランアミンを用いた。

手術：マウスの頭蓋骨に、開窓手術を施した後、頭部固定用ヘッドフレームを装着した。手術後の回復を待った後、頭部固定に状態に慣れるように飲み水を報酬としてマウスを訓練した。恐怖条件付け実験を行ったマウスには、開窓手術に加えて筋電位電極を板状筋・僧帽筋付近に設置した。

イメージング：大脳皮質一次感覚野と高次野のニューロピルより二光子励起顕微鏡でイメージングを行った。二光子励起蛍光イメージングには、B-Scope または、Bergamo 顕微鏡 (共に Thorlabs 社) を用いた。励起光源は、Chameleon Vision 2 (コヒーレント社) モードロックレーザーを使用した (中心波長: 920nm)。画像は 2~15Hz のフレームレートで、約  $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$  の領域を 1M ピクセルの精度で取得した。

tDCS (経頭蓋直流刺激)：tDCS には、高精度計測用オペアンプを利用して設計した定電流直流パワーサプライ (非接地型) を用いた。tDCS の刺激としては、既に効果が確かめられている 0.1mA、10 分を基準とした。正極を皮質上部の頭蓋骨、負極を首 (あるいは胴体) の皮膚に設置した。

感覚刺激：感覚刺激は、観測する感覚野により、ひげ刺激、フラッシュ刺激 (視覚)、日常の風景動画 (いわゆる Natural Image)、純音を提示す。恐怖条件付け学習においては、チャープ音を 30 秒提示後にフットショックを提示した。また、この時すくみ行動を計測できるように筋電

位を測定した。

画像解析：動物の微小な動き（あるいは顕微鏡によるぶれ）を修正する。修正には、ImageJ 画像処理プログラム上で起動する、TurboReg 拡張機能を利用した。修正された画像データを非負値行列因子分解(Non-negative Matrix Factorization=NMF) アルゴリズムにかけ、空間要素と時間要素に分解する。時間的に早い神経細胞要素と時間的に緩慢なグリア要素に分かれることを想定した。これらの解析は複数プロセッサを有する Linux サーバーにて行った。

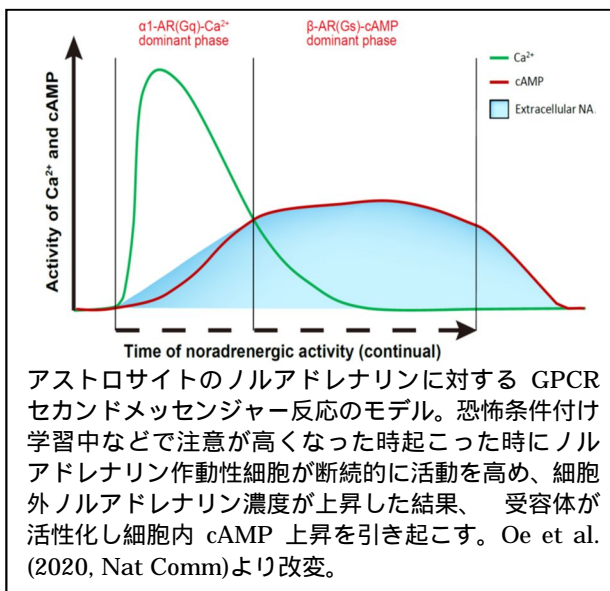
#### 4. 研究成果

慢性的な環境刺激による脳機能の変化を観測するために、回し車や円筒などが設置された「豊かな環境」でグループ飼育されたマウスと標準ケージで単離飼育された「孤独環境」マウスの脳波を比較した。我々のラットを用いた先行研究で、豊かな環境飼育群において海馬ガンマ波の振幅が大きくなることが報告されていたが、この事象をマウスでも確認した。次に、同様の実験をアストロサイトの  $Ca^{2+}$  上昇が抑制される 2 型イノシトールトリリン酸受容体( $IP_3R2$ ) ノックアウト(KO)マウスを用いて行ったところ、野生型と同様にガンマ波の増大が豊かな環境飼育群において見出された。このことは、アストロサイトの  $Ca^{2+}$  上昇が飼育環境刺激によるガンマ波の増大に関与しないことを示唆した。一方で、海馬リップル波は単離飼育の  $IP_3R2$  KO マウスで減衰していた。海馬リップル波は、海馬から大脳皮質への出力を担い、記憶の定着に重要な役割を果たすことがわかっていることから、 $IP_3R2$  を介したアストロサイトの  $Ca^{2+}$  上昇は記憶の定着に関与していることが見出された。

記憶学習の獲得の際の神経細胞とアストロサイトの活動を顕微鏡下に観測するために、頭部を固定した状態での恐怖条件付け学習の実験系を開発した。その結果、従来のフットショックと警告音を組み合わせる恐怖条件付け学習と同様にすくみ反応を翌日に観測することに成功した。実験計画を申請した段階では NMF 法などの行列因子分解法によって神経細胞とアストロサイトの信号を分離する予定であったが、赤色  $Ca^{2+}$  センサーや赤色 cAMP センサーの開発が進み、細胞種類により別色のセンサーを発現させることが技術的に可能となった。そこで、アストロサイトに緑色  $Ca^{2+}$  センサーと赤色 cAMP センサーを同時発現させたり、神経細胞に赤色  $Ca^{2+}$  センサーを発現、アストロサイトに緑色  $Ca^{2+}$  センサーを発現させるなど、さまざまなセンサーの組み合わせで、恐怖条件付け学習の導入時に大脳皮質 2, 3 層ニューロピルの観測を行った。その結果、恐怖条件付けの最初の 3 回あたりまで、フットショック提示後にアストロサイトの  $Ca^{2+}$  上昇に加えて、cAMP の上昇を見出すことができた。顔面に空気を吹きかけるような軽い驚愕反応では  $Ca^{2+}$  上昇は見られるが cAMP の上昇は見られないことから、恐怖条件付け学習時にはアストロサイトを強く刺激する機構があることが示唆された。

次に蛍光ノルアドレナリンセンサー-nLight を利用して細胞外乗るアドナリン濃度を観測してみたところ、フットショック後に顕著なノルアドレナリンの上昇を大脳皮質に見出すことができた。このノルアドレナリン上昇と cAMP 上昇の時間的パターンは類似していた。アストロサイトの (ノル) アドレナリン受容体には  $Ca^{2+}$  を上昇させる  $\alpha 1$  型、cAMP を上昇させる  $\beta 1$  型および  $\beta 2$  型、cAMP を低下させる  $\alpha 2$  型が知られているが、今回の実験で、軽微な驚愕反応では主に  $\alpha 1$  型が活性化することがわかった。さらに、恐怖条件付け学習のような特別な注意を引き起こすような状態では、 $\alpha 1$  型に加えて  $\beta$  型受容体が活性化することがわかった。この恐怖条件付け学習時の驚愕反応におけるアストロサイトの  $\beta$  型受容体のサブタイプは  $\beta 1$  型であった。マウスのアストロサイトにおける  $\beta 1$  型の  $\beta 2$  型に対する優勢は、最近のトランスクリプトーム解析と合致する。しかしながら、 $\beta 2$  型はヒトの培養アストロサイトでは有意な発現がみとめられることから、アストロサイトの  $\beta$  受容体の活性は動物種に依存する可能性がある。

アストロサイトの cAMP 信号の下流にはいくつかの機能が結びついているが、その一つにエネルギー代謝がある。肝細胞では、グルカゴン受容体やアドレナリン  $\beta$  受容体の活性によりグリコーゲンが解糖されるが、アストロサイトは脳細胞のなかでグリコーゲンを貯蓄する細胞であり、ノルアドレナリンで駆動される同様の代謝経路があることが培養細胞の実験で知られている。cAMP 上昇によるグリコーゲン解糖を生体脳で確認するために、DREADD-GS を援用してアストロサイト選択的に cAMP の上昇を誘発させた。アストロサイトの cAMP を十分に刺激した後にマイクロ電磁波でマウス脳を固定してグリコーゲン分布を調べたところ、DREADD-GS を発現させたアストロサイトのグリコーゲンの低下が確認できた。また、マイクロ電磁波固定法による脳グリコーゲン分布を記述した論文の発表を行った。今後の脳グ



リコーゲン研究に長く参考にされる資料になればよいと期待する。

アストロサイトの G タンパク質共役受容体活性化が学習に影響を与えるのかを試す実験を Opto-Gq 系を使って行った。理化学研究所脳科学総合研究センターの平瀬研で作製した BAC-Glt1-OptoA1AR マウスにおいて新奇物体認識試験を行ったところ、記憶時のアストロサイトの活性により記憶の保持が2週間以上続くこと見出した。アストロサイトの活性化を行わなかった動物では二週間後の記憶は保持できなかったことから、アストロサイトが長期的な記憶の保持に有用であることが示された。この成果は、現在 bioRxiv に収録・公開した。  
(<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/753095v1>)

また、本計画のもう一つの提案であった tDCS 刺激時におけるミクログリアの動態について実験をした。その結果、tDCS によりミクログリアの微小突起伸長の活動が低減することがわかった。また、これは  $\beta 1$  型受容体に依存するものであった。研究計画申請時に投稿中であった論文 (Monai et al., Nat Comm 2016) の結果と合わせて考えると、tDCS は大脳皮質のノルアドレナリン濃度を上昇させ、アストロサイトの  $Ca^{2+}$  上昇に加えてミクログリアの活動にも影響を及ぼすことがわかった。興味深いことに、ミクログリアの形態変化は tDCS 刺激後 2 時間以降に現れる。この事象は、ミクログリアが神経回路の長期的変化に関与する可能性を示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Monai Hiromu, Hirase Hajime	4. 巻 126
2. 論文標題 Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 15 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.08.012	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 Tanaka Mika, Wang Xiaowen, Mikoshiba Katsuhiko, Hirase Hajime, Shinohara Yoshiaki	4. 巻 595
2. 論文標題 Rearing-environment-dependent hippocampal local field potential differences in wild-type and inositol trisphosphate receptor type 2 knockout mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 6557 ~ 6568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1113/JP274573	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 Ue Yoshihiro, Monai Hiromu, Higuchi Kaori, Nishiwaki Daisuke, Tajima Tetsuya, Okazaki Kenya, Hama Hiroshi, Hirase Hajime, Miyawaki Atsushi	4. 巻 500
2. 論文標題 A spherical aberration-free microscopy system for live brain imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 236 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.049	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 Monai H, Hirase H	4. 巻
2. 論文標題 Astrocytic calcium activation in a mouse model of tDCS - extended discussion	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Neurogenesis	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) 10.1080/23262133.2016.1240055	査読の有無 無
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 Oe Y, Baba O, Ashida H, Nakamura KC, Hirase H	4. 巻 64
2. 論文標題 Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1532-1545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23020	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 Humberto M, et al., ..., Hirase H, Mori Y, Nedergaard M	4. 巻 367
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid influx drives acute ischemic tissue swelling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eaax7171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1126/science.aax7171">https://doi.org/10.1126/science.aax7171</a>	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 Humberto M, et al., Hirase H, Asokan A, Iliff JJ, Nedergaard M	4. 巻 7
2. 論文標題 Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e40070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.40070	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Hirase H
2. 発表標題 Transcranial direct current stimulation triggers cortical metaplasticity via glial calcium elevation
3. 学会等名 The first international symposium for frontend brain science of the University of Yamanashi (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirase H
2. 発表標題 Brain glycogen distribution by glycogen immunohistochemistry in the mouse
3. 学会等名 13th International Conference on Brain Energy Metabolism (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirase H
2. 発表標題 Transcranial direct current stimulation triggers cortical metaplasticity via glial calcium elevation
3. 学会等名 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwai Y, Ozawa K, Yahagi K, Sato S, Hirase H
2. 発表標題 アストロサイトGq GPCRの光遺伝学的活性化による神経活動の制御
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wang X, Tanaka M, Shinohara Y, Mikoshiba K, Hirase H
2. 発表標題 Modulation of hippocampal local field potential patterns by rearing condition in inositol trisphosphate receptor type 2 knockout mice.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hajime Hirase
2. 発表標題 tDCS Mediaplasticity and Astrocytic Calcium
3. 学会等名 NYC Neuromodulation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hajime Hirase
2. 発表標題 Role of astrocytic calcium elevation in transcranial direct current stimulation in mice
3. 学会等名 International Astrocyte School (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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
研究分担者	今野 歩 (Konno Ayumu) (40509048)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師  (12301)	