

令和元年5月21日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07065

研究課題名(和文) アストロサイトの構造機能連関とその制御の解明

研究課題名(英文) Characterization of structure function relationship of astrocyte

研究代表者

塗谷 睦生(Nuriya, Mutsuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：60453544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年脳の機能や疾患に重要な役割を果たすことが示唆されるようになってきた非神経グリア細胞であるアストロサイトの構造と機能の関係に関する研究を行った。ここから、アストロサイトの微細構造に存在する種々のタンパク質が、これまで神経細胞に作用することで効果を示すと考えられていた薬剤や生体分子によって非常に動的に制御されていることが明らかとなった。また、その機能を評価するのに有効となる顕微鏡法の開発と応用にも成功した。今後はこれらの成果を基に研究を進めて行くことで、健康・疾患状態の脳におけるアストロサイトの構造と機能、そしてその変化の役割の解明が進んで行くものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、これまで神経細胞に作用することでその効果を発すると考えられていた薬やその標的となっている生体内分子が、神経細胞に加え、アストロサイトの特徴的な構造に存在し、その機能を担うタンパク質を直接制御していることが分かった。これは、脳に作用する多くの薬剤の作用機序に関して、アストロサイトの制御と言う観点からの再考を促すものとなった。また、微細構造における機能解析のために新たな顕微鏡法の開発と応用に成功したが、これを更に発展させることにより、アストロサイトの細胞生物学的理解が促進するのみならず、生命科学一般に広く応用されることで新たな知見の獲得へと繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the structure-function relationship of astrocytes, non-neuronal cells whose roles in brain physiology and pathophysiology have been recently realized. We revealed that various proteins that were located at the microstructures of astrocytes were dynamically regulated by drugs and biological molecules that had been considered to exert their functions through their actions on neurons. Furthermore, we have also succeeded in developing and applying microscopy methods that are effective in investigating astrocyte functions. Future studies based on these progresses are expected to reveal the structure function relationship of astrocytes and its roles in physiology and pathophysiology of the brain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：アストロサイト 形態 構造機能連関 多光子顕微鏡 グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の生理学を中心に進められてきた脳科学の領域において、近年グリア細胞、特にアストロサイトの役割が注目されている。アストロサイトは神経細胞と血管を結びつける唯一の細胞であり、神経活動の維持と調節、血流調節などを通じて脳機能全般を積極的に制御することが示唆されている。しかし、このような神経細胞や血管への作用という脳におけるアストロサイトの役割が明らかになってきた一方で、それらを可能にするアストロサイト自身の生理学的性質の研究は少なく、その実態は未だ謎に包まれている。特に、アストロサイトはその突起を介して神経細胞や血管と種々の伝達物質や代謝産物などのやり取りをし、それを伝達・処理していると考えられているが、これらの構造における情報伝達の様式・制御のどちらに関してほとんど何も明かされていない。一方、神経細胞の研究においては、複雑な細胞の構造は細胞内での電気・化学情報の伝達や処理様式を規定することで非常に重要な役割を果たすということが明らかにされた。アストロサイトの構造が神経細胞のそれに比肩するほどの複雑さを持つことやアストロサイトの構造が進化と共に複雑性を増していることを鑑みる時、アストロサイトの複雑な構造が電気・化学情報処理をどのように規定しているのかを理解することは、アストロサイトのみならず脳科学領域全般における急務の課題と言える。

このような重要性にもかかわらず知見が欠如しているのは、ひとえにこれまでそのような研究を可能にする手法自体に限られていたことに起因する。この状況を打開するため、これまで我々はアストロサイトの構造機能連関の解析を可能とするような2光子機能イメージング法の確立と応用を進めてきた。これを応用することにより、我々はアストロサイト足突起が生化学的に独立した細胞内コンパートメントとして働くことを発見し、アストロサイトの複雑な細胞内情報処理機構の一端を明らかにした。しかしこれはアストロサイトの多彩な細胞内情報伝達様式の氷山の一角に過ぎないと考えられた。また、癲癇の脳スライスモデルと独自の生化学的手法を用いることにより、アストロサイト足突起の構造基盤を成す β -dystroglycan分子の変化が分子拡散障壁という機能変化へと繋がることなどを明らかにしたが、やはりこれもアストロサイトの見せる多彩な機能変化の一端に過ぎないと考えられた。このような事例を合わせて鑑みる時、アストロサイトの複雑な構造と機能との関係の研究、そしてそれを可能とする光学顕微鏡法の更なる発展が、脳科学領域全般の更なる推進にとって非常に重要と考えられた。

2. 研究の目的

上記のような背景を受け、本研究では、マウス大脳皮質から調製する急性脳スライスを用い、我々が独自に開発を進めてきた複数のモダリティにまたがる2光子顕微鏡技術を駆使することで従来の限界を乗り越え、これまで解析すること自体が困難であったアストロサイト細胞内における化学・電位情報伝達の様式と制御に関する初めての知見を得ることを試みた。更に生化学的解析系により種々の生理・疾患条件下における細胞構造変化の分子機序の解明を図り、最後にこれらを合わせることで、アストロサイトの構造変化と機能変化の関係に関する初めての知見を得ることを試みた。これにより、アストロサイト、ひいては脳の情報処理様式とその制御機構がアストロサイトの構造機能連関という新たな観点から明らかにされ、アストロサイトと脳の生理学・薬理学・病理学など幅広い分野に独自の視点から貢献することができるものと期待される。

具体的には以下の目標の達成を試みた。

- (1) マルチモダル多光子顕微鏡解析を用いたアストロサイト細胞内情報伝達様式の解明
- (2) 生化学解析系を用いたアストロサイト構造変化の分子基盤の解明

(1) ではアストロサイト内微細構造における電位と化学情報伝達の様式を、独自のマルチモダル2光子顕微鏡を用いて明らかにすることを試みた。アストロサイトの初代培養細胞、或いはマウスから調製する急性脳スライスを用い、アストロサイト微細構造における化学情報伝達を多光子励起顕微鏡により、電位情報伝達を我々が開発を進めてきた唯一の定量的電位イメージングであるSHG (Second Harmonic Generation) イメージングにより、高時空間分解能をもって解析する。そして(2)では正常の発育と老化、更に種々の疾患モデルを用い、脳内で起こるアストロサイトの微細構造変化の分子細胞生物学的基盤の理解を図る。神経科学の分野で有用性が示されてきた種々の生化学的手法を取り入れ、これをアストロサイトに応用することで効率的に新規の知見の獲得を図る。

3. 研究の方法

アストロサイトの複雑な構造の機能的意義を細胞内コンパートメント化による電気・化学情報伝達の制御という観点から明らかにするため、本研究ではマウス脳内での構造をそのまま維持した初代培養アストロサイト、或いは急性脳スライスを用い、2光子顕微鏡を用いて低侵襲的に高時空間分解能で各部位における分子動態を解析する。具体的には2光子タイムラプス蛍光イメージングを基盤とし、それに蛍光以外の多光子現象に基いたイメージングを併せ、統合的な分子動態の解明を図る。

更にこれらの微細構造を支える分子群の生理・疾患条件下における変化を、これまでに確立した独自の生化学的解析によりに解明し、分子動態の変化の分子細胞生物学的基盤を確立する。ここでは神経細胞の研究で長らく使われ十分な実績がありながら、アストロサイトへの応用がなされて来なかった種々の生化学的手法などを応用することで、新たな知見の獲得を図る。

4. 研究成果

顕微鏡を用いたこれまでの研究から、血管を取り巻くアストロサイトの足突起が細胞内コンパートメントとして働き、ここには脳の主要な水チャネルである AQP4 や、アストロサイト細胞間のギャップ結合情報伝達を担うコネキシン Cx43 をはじめとする重要な機能分子群が局在していることが明らかとなった。しかし、これらの機能分子に関してはその制御機構や様式の解明が進んでいない。そこで、神経細胞の解析で用いられてきた種々の生化学的解析法を応用し薬理学的手法とあわせることで、アストロサイトの機能に重要な役割を果たす分子群の性質と様々な状況下における変化の解析を試みた。ここから、アストロサイト細胞間のギャップ結合を主に担う Cx43 分子の機能制御に重要なリン酸化が、臨床で多用されている麻酔薬であるプロポフォールにより直接的に制御されているという知見が得られた (Nuriya et al. BBRC, 2018)。これは、神経細胞に作用することで薬理学的効果を発揮すると考えられているプロポフォール、更には他の薬剤が、神経細胞と共にアストロサイトに直接作用し、アストロサイトの生理機能に重要な役割を果たす分子群を制御することで薬理学的作用を発揮していることを示唆するものとなった。また、生理学的な調節機構を明らかにするために種々の生理活性物質による Cx43 の制御について薬理学と生化学を合わせて解析を行ったところ、「神経調節物質」の一つであるノルアドレナリンが Cx43 のリン酸化と細胞内局在を持続的に調節していることが明らかとなった (Nuriya, Morita et al. BBRC, 2018)。これはノルアドレナリンが神経細胞に加えグリア細胞であるアストロサイトの機能を調節しているものであることを示唆するものとなった。ここで、ノルアドレナリンの不調は種々の精神疾患の原因とされていることから、上記の結果はこれらの生理学・病理学・薬理学の機序にアストロサイトの関与を示唆する結果となった。以上のように、本研究によりアストロサイトの重要な機能タンパク質がこれまで神経細胞への作用が主たる作用と考えられてきた生理活性物質や薬剤の標的となっていることが明らかとなり、更なる解析により、脳の生理・病理・薬理学に対するアストロサイトの関与が明らかにされるものと期待される。

本研究では、上記のような分子レベルでの解析に併せ、アストロサイトの機能評価についても研究を進めた。ここで、アストロサイトは脳で水チャネルを発現する主たる細胞であり、また種々の疾患、或いは生理条件下において脳の水代謝の重要性が示唆されていることから、アストロサイトの形質膜における水の可視化が非常に重要となる。しかし、これまで形質膜を選択的に捉えること、そしてそこにおける水の可視化を行う手法は無く、よって知見が限られてきた。このような現状を克服しアストロサイトの構造機能連関の謎に迫るため、新たな顕微鏡法の開発を試みた。まず、多光子現象である Second Harmonic Generation (SHG) 顕微鏡により、これまでの蛍光ベースの顕微鏡観察では特異的に観測することができなかった形質膜の特異的な可視化が可能となることが明らかとなった (Mizuguchi et al. iScience, 2018)。また、同じく多光子現象でラマン散乱を捉える Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) 顕微鏡の応用により、生きた細胞内外の水の状態を高い時空間分解能で可視化できることが明らかとなった (Nuriya et al. JPCA, 2019)。今後、これらの顕微鏡技術を合わせたマルチモダル多光子顕微鏡の応用により、アストロサイトの構造とそこにおける水や分子の動態を同時に可視化し、構造機能連関の解明が更に進むものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Characterization of Intra/Extra-Cellular Water States Probed by Ultrabroadband Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Spectroscopic Imaging.

Nuriya M, Yoneyama H, Takahashi K, Leproux P, Couderc V, Yasui M, Kano H. (2019)

J Phys Chem A, 123(17):3928-3934. doi: 10.1021/acs.jpca.9b03018.

査読有

2. Norepinephrine induces rapid and long-lasting phosphorylation and redistribution of connexin 43 in cortical astrocytes.

Nuriya M, Morita A, Shinotsuka T, Yamada T, Yasui M. (2018)

Biochem Biophys Res Commun., 504(4):690-697. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.021.

査読有

3. High-Resolution Plasma Membrane-Selective Imaging by Second Harmonic Generation.

Mizuguchi T, Yasui M, Nuriya M. (2018)
iScience, 9:359-366. doi: 10.1016/j.isci.2018.11.008.
査読有

4. Direct posttranslational modification of astrocytic connexin 43 proteins by the general anesthetic propofol in the cerebral cortex.
Nuriya M, Yasui D, Yamada T, Aoki T, Yasui M. (2018)
Biochem Biophys Res Commun., 497(2):734-741. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.142.
査読有

5. Background norepinephrine primes astrocytic calcium responses to subsequent norepinephrine stimuli in the cerebral cortex.
Nuriya M, Takeuchi M, Yasui M. (2017)
Biochem Biophys Res Commun., 483(1):732-738. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.073.
査読有

6. 塗谷睦生 (2017) 「多光子顕微鏡法のための SHG 専用色素」
生体の科学 68 (5): 424-425.
査読無

7. 塗谷睦生 (2017) 「第二高調波顕微鏡～生体機能解明への挑戦～」
光アイアンズ 28 (11): 37-43.
査読無

8. Nuriya M & Hirase H (2016) Involvement of astrocytes in neurovascular communication. Progress in Brain Research. 225: 41-62.
査読無

9. 塗谷睦生 (2016) 「光第二高調波顕微鏡の細胞生物学研究への応用」
OPTRONICS 35 (8) 69-73.
査読無

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 水口 高翔、安井 正人、塗谷 睦生
第二高調波発生を用いた形質膜選択的イメージング
第 92 回日本薬理学会, (2019 年)

2. 芦刈洋祐、藤本ゆかり、安井正人、塗谷睦生
クリックケミストリーを利用したドーパミンイメージングを可能とするアルキンタグ化されたドーパミン・プローブの開発
第 92 回日本薬理学会, (2019 年)

3. 塗谷睦生
「多光子顕微鏡の生命科学研究への応用」
第 12 回 ISG-Keio (2019 年)

4. 塗谷睦生
「組織内の溶媒・溶質動態の可視化」
第 44 回日本微小循環学会総会 シンポジウム (2019 年)

5. Takaha Mizuguchi, Masato Yasui, Mutsuo Nuriya
Plasma membrane-selective visualization by multimodal two-photon imaging in living cells using second harmonic generation.
Biophysical Society 63rd Annual Meeting, (2019 年)

6. 塗谷睦生
「マルチモダル多光子顕微鏡のバイオイメージングへの応用」
第 27 回日本バイオイメージング学会 シンポジウム (2018 年)

7. 塗谷睦生
「非線形光学顕微鏡の脳科学研究への応用」

第 15 回 医用分光学研究会 (2017 年)

8. 塗谷睦生

「多面的シグナル伝達解析を可能とするマルチモダル 2 光子顕微鏡技術の開発と応用」
生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」(2017 年)

9. 塗谷睦生

「光第二高調波イメージングの細胞生物学研究への応用」
第 55 回日本生物物理学会年会 シンポジウム (2017 年)

10. 塗谷睦生

「光第二高調波顕微鏡の生体機能解明への応用」
光材料・応用技術研究会 (2017 年)

11. 塗谷睦生

「光第二高調波イメージングの細胞生物学研究への応用」
日本顕微鏡学会 先端光学顕微鏡分科会 ワークショップ (2017 年)

12. 塗谷睦生

「光第二高調波顕微鏡の細胞生物学研究への応用」
月刊オプトロニクス特集連動特別セミナー (2016 年)

13. 塗谷睦生

「光第二高調波発生イメージングの細胞生物学研究への応用」
第 305 回光エレクトロニクス第 130 委員会研究会 (2016 年)

14. 塗谷睦生

「睡眠・覚醒とグリア細胞」
第 3 回 Circadian Rhythm Forum (2016 年)

〔図書〕(計 1 件)

1. 牛木辰男・臼倉治郎・岡部繁男・高松哲郎・寺川進・藤本豊土編
朝倉書店
ライフサイエンス顕微鏡学ハンドブック (2018)
318 ページ (55-63 ページ「非線形顕微鏡」塗谷睦生担当)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称: 化合物、化合物の塩、神経機能調節物質、神経機能調節物質の評価方法、化合物の製造方法、及び化合物の塩の製造方法
発明者: 塗谷睦生、芦刈洋祐、安井正人、藤本ゆかり
権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 特願
番号: 2018-148873
出願年: 2018 年
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
塗谷グループのホームページ
<http://user.keio.ac.jp/~aa606547/homepage.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

無

(2)研究協力者

研究協力者氏名：芦刈 洋祐

ローマ字氏名：ASHIKARI, Yosuke

研究協力者氏名：水口 高翔

ローマ字氏名：MIZUGUCHI, Takaha

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。