

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20917

研究課題名(和文) グリア創薬に向けたグリア-神経信号伝達機序の解明

研究課題名(英文) Glial control of neuronal excitability

研究代表者

別府 薫(下田)(Beppu, Kaoru)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40747458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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はグルタミン酸などの興奮性伝達物質を放出する。本研究では、神経細胞の興奮状態を高めるグルタミン酸や乳酸といった伝達物質がアストロサイトから放出されるメカニズムを調べた。実験結果から、アストロサイトからのグルタミン酸放出は、グルタミン酸トランスポーターを介した炭酸イオン濃度の変化が影響していることが分かった。また、乳酸の合成または放出は、アストロサイト内の水素イオン濃度の変化によって影響されることが示唆された。これらの結果から、アストロサイトが放出する様々な伝達物質は、アストロサイト内のイオン濃度変化やpH変化によって精密に制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes release transmitters such as glutamate and lactate. We investigated how these transmitters are released from astrocytes. Excitatory neurons release glutamate and this glutamate activates glutamate transporters in astrocytes. Uptake of glutamate via glutamate transporters cause intracellular acidification in astrocytes. We found that ion flux and the resulting acidification trigger opening of volume-sensitive anion channels in astrocytes. Then glutamate anion is released through this channels. We also found that optogenetic alkalization of astrocytes by photostimulation of archaerhodopsin in astrocytes enhanced extracellular lactate level. These results suggest that ion flux and the resulting pH fluctuation strongly regulates gliotransmitter release in astrocytes.

研究分野：神経科学

キーワード：アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

脳内における神経細胞間のシナプス伝達は、動物の行動や学習の基盤であり、その信号伝達のやり取りが乱れると、様々な病態が生じる。しかし、何が原因で神経伝達網が乱れるのかは、いまだ明らかではない。申請者はこれらの問いに対して、神経細胞だけに着目するのではなく、神経細胞を取り巻く環境も考慮する必要があると考えている。神経細胞を密接に包囲するグリア細胞では、神経細胞の活動に応じて細胞内 pH 変化や Ca^{2+} 変化が生じる。また申請者らのこれまでの研究により、光遺伝学を用いて人工的にグリア細胞の pH 変化を誘発すると、グリア細胞から神経細胞へと興奮性の信号が送られて、神経細胞を興奮させることが明らかになった(Sasaki, **Beppu**, *PNAS*, 2012; **Beppu**, *Neuron*, 2014)。これらの研究を踏まえて申請者は、神経活動を受けたグリア細胞は神経細胞へと信号を送り返しており、このグリア細胞を介した経路が、神経細胞の活動状態を強く左右しているのではないかと予想した。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞を取り囲むグリア細胞であるアストロサイトからの信号が、神経細胞の興奮状態に関与している可能性を検証する。具体的には、神経細胞の興奮状態に関与する Gliotransmitter の放出経路を調べて、それが神経細胞に流れる興奮性電流や膜電位変化にどのように関与しているかを調べる。

3. 研究の方法

マウス脳スライス標本を用いて、ホールセルパッチクランプ法により、神経細胞に生じる興奮性のグルタミン酸電流や電位を記録する。アストロサイト特異的に細胞の活動を操作するために、光感受性の ChR2 や ArchT がアストロサイトだけに発現した遺伝子改変マウスを用いる。光操作によりアストロサイト内のイオン環

境を操作した場合に、グルタミン酸や他の伝達物質の放出がどのように変化するかを調べる。

4. 研究成果

小脳スライス標本を用いた電気生理実験において、電気刺激によって前シナプス細胞からのグルタミン酸放出を引き起こしたところ、小脳パーグマングリア細胞に発現するグルタミン酸トランスポーターがはたらいて、グリア細胞内のイオン濃度が変化し、グリア細胞からグルタミン酸が放出されることを明らかにした。このグルタミン酸放出のメカニズムを詳しく調べたところ、グルタミン酸トランスポーターの回転によって運ばれる Na^+ 、 H^+ 、 K^+ イオンではなく、トランスポーターに付随して開く陰イオンチャネルを介した HCO_3^- イオンの濃度変化がグルタミン酸放出を促していることを明らかにした。また、陰イオンチャネル阻害剤のうち、非特異的アニオンチャネルの阻害剤である DIDS だけでなく、Volume sensitive アニオンチャネルの阻害剤である DCPIB によって、グリア細胞からのグルタミン酸の放出が止まることも明らかにした。この研究から、グリア細胞は神経細胞間のシナプス信号を素早く検知して、興奮性の信号を神経細胞へと送り返し、シナプス信号を増強させていることを明らかにした。

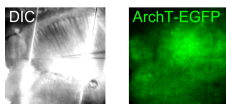
続いて、視床スライス標本を用いた電気生理実験において、薬物によりてんかん発作様の過興奮状態を作り出した。この標本下で、グリア細胞に発現させた ArchT を光刺激してアストロサイトの活動を抑制すると、神経の過剰な発火が抑制されることを明らかにした。そこで、ArchT 刺激によってどのような伝達物質が放出されるのかを、バイオセンサーや質量分析法を用いて調べたところ、ArchT 刺激によって細胞外の乳酸濃度が増加することが示唆された。これは、ArchT 刺激によってグリア細胞内がアルカリ化し、乳酸の合成が加速したことが原因ではないかと考えられる。また、グリア

細胞の ArchT 刺激によって視床神経細胞の Excitatory postsynaptic currents (EPSC)が増加した(図 1)。さらに、グリアから神経へ乳酸を運ぶ乳酸トランスポーターを阻害剤(4-CIN)によって阻害すると、ArchT 刺激による EPSC の増加は起きなかった(図 2)。これらの結果から、乳酸を介したグリア-神経信号は、シナプス後神経細胞の AMPARs などの機能を促進したり、シナプス前神経細胞のグルタミン酸放出を増強させている可能性が示唆された。そして、この信号がてんかん発作様の神経過興奮状態を生み出す原因になっていることも示唆された。

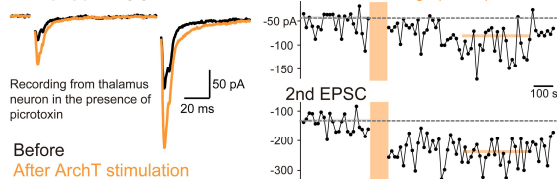
研究期間全体を通して、アストロサイトからのグルタミン酸や乳酸の放出は、神経細胞間のシナプス伝達を行進していることが示された。これらの放出メカニズムがてんかんの病態にどのように働くのかを、今後、In vivo で調べていきたい。

1. Astrocytes ArchT stimulation increased EPSC amplitude

A. ArchT expressed in astrocytes in the Thalamus

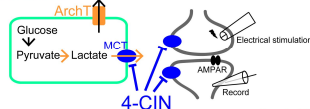


B. Evoked EPSC

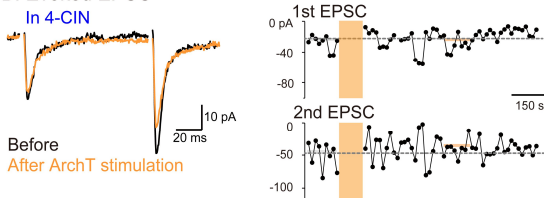


2. Inhibition of lactate transporter eliminated ArchT effect

A. Scheme



B. Evoked EPSC



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Igarashi H, Ikeda K, Onimaru H, Kaneko R, Koizumi K, Beppu K, Nishizawa K, Takahashi Y, Kato F, Matsui K, Kobayashi K, Yanagawa Y, Muramatsu SI, Ishizuka T, Yawo H.

Targeted expression of step-function opsins in transgenic rats for optogenetic studies.

Scientific Reports, 2018 Apr 3;8(1):5435. doi: 10.1038/s41598-018-23810-8. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. Rodrigo Lerchundi & Kaoru Beppu. Manipulation of cell metabolism and neural activity in brain tissue.

3rd Young Glia, 2018 January, Tokyo

[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

別府 薫 (BEPPU Kaoru)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号:40747458

(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

()