

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06513

研究課題名(和文) アストロサイトと神経シナプスとの構造的・機能的相互作用機構

研究課題名(英文) Structural and functional interaction between astrocyte and neuronal synapse

研究代表者

宮田 宗明 (Miyata, Muneaki)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：90582007

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)：生体内でアストロサイト突起はシナプスと接着して三者間シナプスを形成しているが、アストロサイト突起とシナプスとの接着の役割については生体内に近い形態を示すアストロサイトの培養法が確立されていなかったため、ほとんど解明されていなかった。本研究では、研究代表者が独自に開発した生体内に類似した三者間シナプスを形成する神経細胞とアストロサイトの二者共培養系と遺伝子欠損マウスを用いて、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位に局在する細胞間接着分子を同定し、これらの分子がアストロサイトの極性形成の制御と三者間シナプスの形成に協調的に作用していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプスの構造、構成分子、形成機構および機能については国内外で精力的に研究され、全貌が解明されつつあるが、アストロサイト突起とシナプスの接着については生体内に近い形態を示すアストロサイトの培養法が確立されていなかったため、ほとんど解明されていなかった。本研究によってアストロサイト突起とシナプスの間の接着の形成・維持機構の一端が解明され、その成果の学術的意義は高い。また、本研究の成果は精神神経疾患の新しい診断法や治療法の開発にも繋がることが期待され、社会的意義も高い。

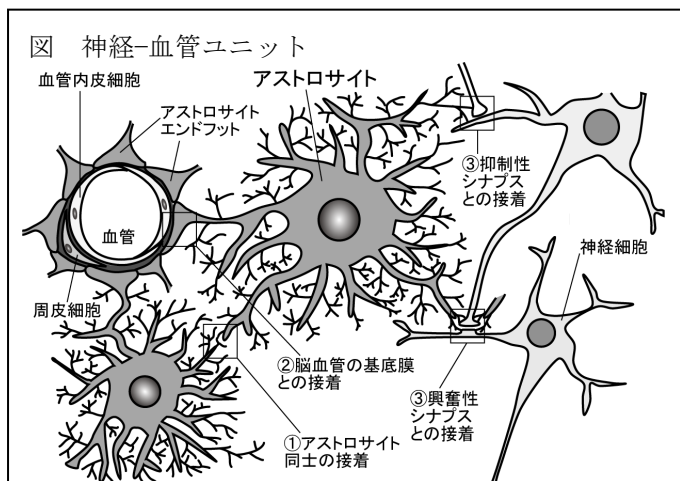
研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms for the astrocyte ramifications and functional polarization and the astrocyte-synapse interaction during tripartite synapse formation have not fully been understood, because the coculture system in which cocultured astrocytes and neurons form tripartite synapses structurally and functionally similar to those in vivo has not been developed. We developed the in vitro coculture system in which astrocytes cocultured with neurons formed high ramifications with numerous fine processes. In this study, using this coculture system and gene-deficient mice, we identified adhesion molecules localized at the astrocyte-synapse interaction sites, and found that these molecules induce astrocyte functional polarization and play cooperative roles in tripartite glutamatergic synapse formation in vitro and in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞間接着分子 アストロサイト 神経細胞 シナプス

1. 研究開始当初の背景

アストロサイトは、神経組織の構築や血液脳関門の形成など構造的にも、グルタミン酸の取り込みや乳酸の産生、細胞外液の恒常性維持など代謝機能的にも、神経細胞の支持細胞として機能している。アストロサイトは機能的に3群にわかれる多数の突起を有している(図)。第1群はアストロサイト同士を接着させている突起である(図①)。その接着部位には、アストロサイト間でカルシウムイオンをはじめ低分子量物質の移行に関与しているギャップジャンクションが局在している。



第2群は脳血管の基底膜に接着している突起(エンドフット)である(図②)。その接着部位には、脳血管からのグルコースの取り込みを担うグルコーストランスポーターが局在している。第3群は神経細胞のシナプスと接着している突起である(図③)。その接着部位には、神経細胞から放出されたグルタミン酸やカリウムイオンを取り込むグルタミン酸トランスポーターやカリウムイオンチャネルが局在している。この突起におけるアストロサイトの機能が低下すると、グルタミン酸濃度が上昇し、その毒性によって神経細胞を変性させて死に至らしめる。また、カリウムイオンが上昇しててんかんを引き起こすので、アストロサイト突起とシナプスとの接着は正常なシナプス機能に重要である。アストロサイト同士の接着には細胞間接着分子のカドヘリンが関与しており、アストロサイトと血管基底膜との接着には細胞-基質間接着分子のインテグリン、ジストログリカン、アグリニンなどが関与しているが、アストロサイト突起とシナプスとの接着の形成・維持機構は、生体内に近い形態を示すアストロサイトの培養法が確立されていなかったため、十分には解明されていなかった。研究代表者は、生体内で観察される多数の細かい突起を持ったアストロサイトの培養法を開発し、このアストロサイトと神経細胞の共培養系の開発にも成功した。このような背景から、アストロサイト突起とシナプスとの接着の役割と作用機構の解明に着手した。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が独自に開発した生体内に類似した三者間シナプスを形成する神経細胞とアストロサイトの二者共培養系と遺伝子欠損マウスを用いて、アストロサイトの形態と興奮性シナプスの形成・維持におけるアストロサイト突起とシナプスの接着の役割と作用機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位に局在する細胞間接着分子の同定と詳細な局在の解析

研究代表者が開発したアストロサイト-神経細胞共培養系と野生型マウスを用いて、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位に局在する細胞間接着分子を同定し、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位における詳細な局在を解析した。

(2)アストロサイト突起と興奮性シナプスとの接着の形成・維持における細胞間接着分子の役割と作用機構

同定したアストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位に局在する細胞間接着分子の欠損マウス由来のアストロサイトまたは神経細胞を用いた共培養系を用いて、これらの分子のアストロサイトの形態と興奮性シナプスの形成・維持における役割と作用機構を解析した。

また、これらの分子を欠損させたマウスを用いて、生体内におけるアストロサイトの形態と興奮性シナプスの形成・維持における役割と作用機構を解析した。

4. 研究成果

(1)アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位に局在する細胞間接着分子の同定と詳細な局在の解析

野生型マウスの海馬において、歯状回から投射される苔状線維終末の存在するCA3野の透明層は興奮性シナプスが多数存在する領域であり、この領域でシグナルが強く観察される細胞間接

着分子を免疫染色により調べたところ、2種類の分子が同定された。また、アストロサイト-神経細胞共培養系において、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位にこれらの分子が局在した。野生型マウスの海馬 CA3 野の透明層において、これらの分子の詳細な局在を免疫電子顕微鏡法で観察すると、これらの分子がアストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位でそれぞれアストロサイト突起側、興奮性シナプス側に局在した（電子顕微鏡解析は東京大学岡部繁男教授との共同研究）。この過程でアストロサイト突起と抑制性シナプスの接着部位に局在する細胞間接着分子も同定された。

(2) アストロサイト突起と興奮性シナプスとの接着の形成・維持における細胞間接着分子の役割と作用機構

アストロサイト-神経細胞共培養系において、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位で同定された細胞間接着分子がグルタミン酸トランスポーターEAAT1、EAAT2、カリウムイオンチャネル Kir4.1 と共局在した。アストロサイト側に局在する細胞間接着分子の欠損マウス由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞を共培養すると、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位でシナプス側に局在する細胞間接着分子が局在したが、EAAT1、EAAT2、Kir4.1 は局在しなかった。逆に、この分子をアストロサイトで過剰発現させた野生型マウス由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞を共培養すると、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位でより多くの EAAT1、EAAT2、Kir4.1 が共局在した。野生型マウス由来のアストロサイトと興奮性シナプス側に局在する細胞間接着分子の欠損マウス由来の神経細胞を共培養すると、アストロサイト突起が興奮性シナプスから離れた位置で樹状突起と接着し、その接着部位でアストロサイト側に局在する細胞間接着分子と EAAT1、EAAT2、Kir4.1 が共局在した。アストロサイト側に局在する細胞間接着分子の欠損マウス由来のアストロサイトと興奮性シナプス側に局在する細胞間接着分子の欠損マウス由来の神経細胞を共培養すると、アストロサイト突起が興奮性シナプスから離れた位置で樹状突起と接着し、その接着部位に EAAT1、EAAT2、Kir4.1 は局在しなかった。また、今回検討した種々の組み合わせのアストロサイト-神経細胞共培養系において、アストロサイトの形態形成に影響は見られなかった。これらの結果から、これらの細胞間接着分子はアストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位でトランス結合し、アストロサイトの機能分子を集積させることによって、アストロサイトの形態形成に影響を及ぼすことなく、アストロサイトの極性形成を制御していることが明らかになった。さらに、アストロサイト突起と抑制性シナプスの接着部位に局在する細胞間接着分子がアストロサイト突起と抑制性シナプスの接着部位で GABA トランスポーター GAT-3 と共局在した。この結果から、アストロサイト突起と抑制性シナプスの接着部位においても細胞間接着分子がアストロサイトの極性形成を制御することが明らかになった。

野生型マウス由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞の共培養において、アストロサイト突起と興奮性シナプスの接着部位を透過電子顕微鏡法で観察すると、アストロサイトの突起は興奮性シナプス近くまで達していたが、興奮性シナプスに密着していなかった。同様にアストロサイト側に局在する細胞間接着分子をアストロサイトで過剰発現させた野生型由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞の共培養では、アストロサイトの突起は興奮性シナプスに密着していた（電子顕微鏡解析は東京大学 岡部繁男教授との共同研究）。この結果から、これらの接着分子のトランス結合がアストロサイト突起と興奮性シナプスの接着に必要であることが明らかになった。

神経細胞単培養、野生型マウス由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞の共培養、アストロサイト側に局在する細胞間接着分子をアストロサイトで過剰発現させた野生型マウス由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞の共培養において電気生理学的解析を行った結果、神経細胞単培養と野生型マウス由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞の共培養に比べてアストロサイト側に局在する細胞間接着分子をアストロサイトで過剰発現させた野生型由来のアストロサイトと野生型マウス由来の神経細胞の共培養では神経細胞の自発発火頻度が上昇したが、これらの培養系において微小興奮性シナプス後電流の振幅は変化しなかった（電気生理学的解析は大阪医科大学 栗生俊彦博士との共同研究）。この結果は、これらの接着分子のトランス結合が神経細胞のグルタミン酸放出部位を増加させることを示しており、これらの分子が三者間シナプスの形成に協調的に作用していることが明らかになった。

一方、野生型マウスの海馬 CA3 野において、これらの細胞間接着分子と EAAT1、EAAT2、Kir4.1 が苔状線維終末で共局在した。アストロサイト側に局在する細胞間接着分子を欠損させたマウスの海馬 CA3 野において、興奮性シナプス側に局在する細胞間接着分子と EAAT1、EAAT2、Kir4.1 の局在は野生型マウスと変わらなかった。興奮性シナプス側に局在する細胞間接着分子を欠損させたマウスの海馬 CA3 野において、アストロサイト側に局在する細胞間接着分子のシグナルが野生型マウスに比べて減少した。EAAT1、EAAT2、Kir4.1 の苔状線維終末における局在は変化しなかったが、苔状線維終末外のシグナルが野生型マウスに比べて減少した。この結果から、一部共培養の結果と一致しない部分はあるが、生体内においてもこれらの細胞間接着分子のトランス結合がアストロサイトの極性形成と三者間シナプスの形成に協調的に作用していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------