

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19700323

研究課題名（和文）孤束核神経回路発達期におけるアストロサイトの役割

研究課題名（英文）Role of astrocyte in synaptic maturation during postnatal developing nucleus tractus solitarius

研究代表者

太城 康良 (TASHIRO YASURA)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10398787

研究成果の概要（和文）： 神経回路の発達において、不要なシナプスは除去される。本研究では、生後発達期ラットの孤束核において軸索細胞体型シナプスの数が減少する時期と、細胞体がグリア細胞の一種であるアストロサイトに被覆される時期の一致を明らかにした。さらに、アストロサイトの増殖を薬理的に阻害し、アストロサイトがシナプスの除去に積極的に関与することを示した。孤束核は呼吸循環の中枢であり、その神経回路発達過程の解明は重篤な神経疾患解明の端緒を開くことに繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）： In developing nervous system, unnecessary synapses are eliminated. In the present study, the timing for glial coverage of small cell soma appears to be consistent with the decrease of axosomatic synapses on the small cells. Axosomatic synapses remained in adult stages under pharmacological inhibition of astrocytic processes extension during neonatal stages. These observations indicate that astrocytes could participate actively in regulating the decrease of axosomatic synapses on small cells in the caudal nucleus tractus solitarius during postnatal development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	450,000	3,050,000

研究分野：神経解剖学、神経発生学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経回路形成、ニューロン・グリア相互作用、アストロサイト、シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

自律神経系は脳幹に中枢となる神経核を多く含み恒常性の維持に深く関与する。延髄の

孤束核尾側部は圧受容器反射など、呼吸と循環の中枢となり、その発達不全は新生児突然死症候群をはじめ重篤な神経疾患の一因となると考えられている。神経核内部の神経回

路の発達過程と機構を解明することは、自律神経疾患の病態解明における基礎として不可欠な要素である。

神経回路の発達過程に必要なシナプスは強化、不要なシナプスは除去されと考えられている。生後発達期、胎内から外界での自発呼吸に順応する過程において、延髄孤束核のシナプスも再構築されると予想される。実際、延髄の孤束核には、細胞体の大きさから、大型細胞と小型細胞の2種類の細胞が含まれる。小型細胞に関して、パッチクランプ法による記録により、生後直後では興奮性と抑制性の両方の入力を受けているが、生後2週目までに抑制性の入力消失する。さらに、小型細胞の細胞体に軸索細胞体型シナプスを形成する GABA 作動性ニューロンの軸索終末の減少が電顕観察され、抑制性入力の消失はシナプスの形態変化を伴うことが申請者らの研究により明らかとなっていた。

研究開始当初、アストロサイトが発生期の神経系において、形態的、生理的なシナプス可塑性に影響を与えることが報告されていた。申請者は、孤束核において軸索細胞型のシナプスが減少する時期に、アストロサイトの突起が小型神経細胞の細胞体近傍に出現し、軸索終末と細胞体の間にアストロサイトの突起が位置することを確認した。さらに、シナプスの減少がアストロサイトの突起に依存的であることが、アストロサイトの成長を薬理的に阻害した状況下では軸索細胞体型シナプスが残存するなどの予備的知見を得ていた。

## 2. 研究の目的

アストロサイトが孤束核の神経回路の発達に必要であることを示すことを目的とした。アストロサイトの突起成長阻害の条件・方法を確立し、以下の三点を神経回路発達の指標として、それらへの影響を検証する。

- (1) 「シナプスの形態変化」すなわち「軸索細胞体型シナプスが減るか？」
- (2) 「電気生理的な入出力関係」すなわち「抑制性の入力は減るか？」
- (3) 「圧受容器反射の影響」すなわち「正常な個体と同様に血圧の調節ができるか？」

## 3. 研究の方法

(1) シナプス形態の発達を遅延させた個体の作成

ラットの臨界期（生後5～7日）にアストロサイトの突起成長を阻害すると、成体になっても幼若型のシナプス形態が保持される。

Cytosine arabinofuranoside (Ara-C)を導入した Elvax 樹脂を第四脳室に外科的に移植し、生後4～5週齢まで飼育した（図1）。

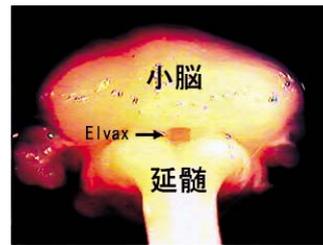


図1 Elvax樹脂による薬剤の導入

### (2) 圧受容器反射の計測

血管収縮剤である Phenylephrine (PE) 投与による人為的な血圧上昇後から定常状態に回復するまでの血圧・心拍数を測定する。PE 投与は大腿静脈、血圧・心拍数の記録は大腿動脈にシリコンチューブを挿管して行った。

### (3) シナプス形態の確認

計測後、個体の脳を固定し、電子顕微鏡観察用の標本を作製する。抑制性シナプスを同定するための GAD 免疫電顕などを行い、シナプスを形態別に孤束核を観察し（図2）、数を定量した。

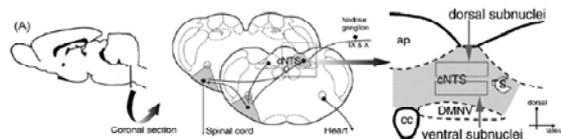


図2 観察対象となる孤束核の位置

## 4. 研究成果

### (1) シナプスの形態変化

まず、呼吸や循環などの中枢となる延髄孤束核は、複数の亜核からなり、その分類と定義を従来の細胞形態ではなく化学マーカーの発現において行った（図3）。

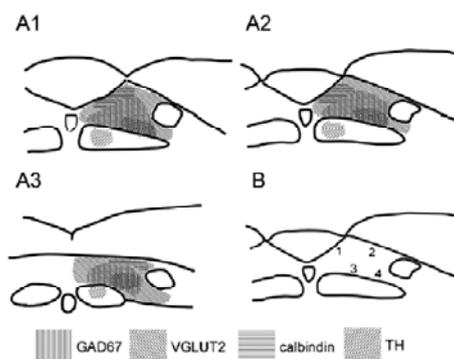


図3 化学マーカーによる孤束核の亜核分類

次に、背側の亜核群において、生後発達期に神経核内部の局所神経回路が再構築される

ことを明らかにした。生後直後には軸索細胞体型シナプス（図4）が小型細胞の細胞体上に多く見られるが、生後10日以降になるとその数は減少する。

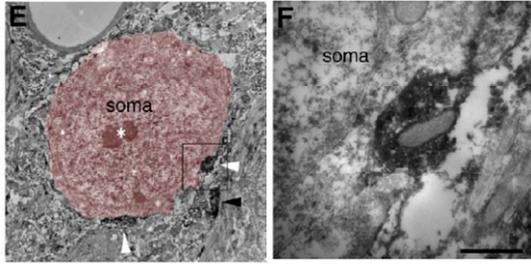


図4 軸索細胞体型シナプス

さらに、我々は軸索細胞体型シナプスが減少する時期と、アストロサイトの突起が小型細胞の細胞体を覆う（図5）時期が一致することを報告した。



図5 アストロサイト(黄色)に被覆される細胞体

そして、アストロサイトの突起による細胞体の被覆が、軸索細胞体型シナプスの減少を生じる原因になるか調べるために、ラットを用いて生体内でのアストロサイト突起伸長の阻害実験を試みた。Ara-C を幼若なラット（生後5～7日）に腹腔内投与すると、アストロサイトの突起伸長が抑制された（図6）。

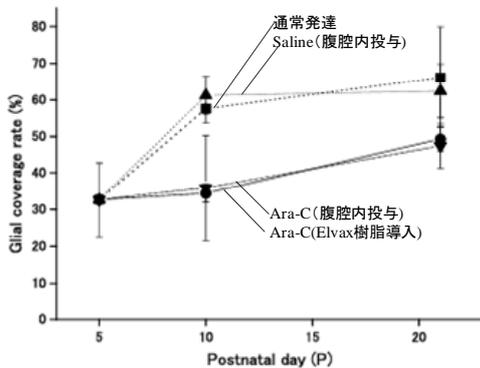


図6 Ara-Cによるアストロサイトの被覆形成の阻害

この状況下において、生後10日において電顕観察すると、軸索細胞体型シナプスを有する小型細胞が数多く観察された（図7）。

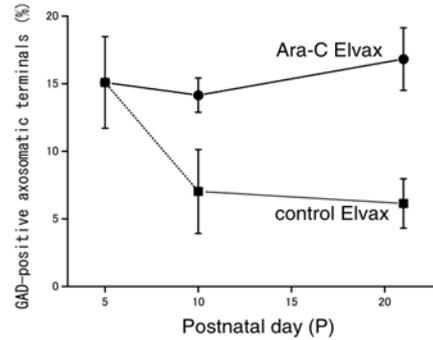


図7 アストロサイト被覆形成阻害下でのシナプスの残存

これらの結果は、アストロサイトの突起が細胞体を被覆することによって、軸索細胞体型シナプスを除去することを示唆している。アストロサイトは孤束核の神経回路再構築において、積極的な役割を担っていると考えられる。

## (2) 生理機能への影響

(1)で述べた形態的な変化が生理機能へどのように影響するかを調べるため、圧受容器反射を指標とした。(2)の内容は(3)に包括されるので、個体レベルでの検証を行った。

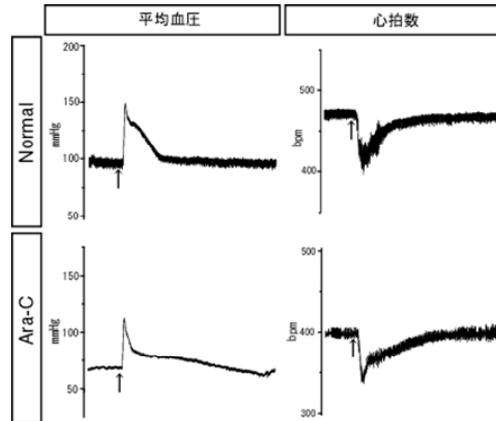


図8 シナプスが残存した個体での圧受容器反射応答の遅延

幼若な個体と同様に、孤束核で不要なシナプスが残存する個体では、一過的な血圧上昇に対して速やかな回復がみられずフィードバックを与える神経機能に影響がみられた（図8）。

このように、ラット延髄の孤束核における神経回路のシナプス形態の発達とその生理機能の成熟に、アストロサイトが関与していることを示した。

## (3) 本研究で得られた知見の意義

本研究で得られた成果の意義は大きく以下の2点が挙げられる。

### ①体性神経系での回路発達の知見との比較

により共通性が解明された。

神経回路発達に関しては、視覚系の眼優位コラム、ヒゲなどの体性感覚系、小脳、神経筋接合部など、体性神経系を用いた実験系から多くの知見が得られているが、内蔵知覚に応答する自律神経系での知見は十分ではない。本研究では、胎仔期の胎内環境から外界の自発呼吸に順応する過程に対応して、おそらく不要なシナプスが除去されることを示したことから、自律神経系の回路発達においてもシナプス除去が神経回路発達において共通な現象であることを示した。これは神経科学分野における報告として、学術上の研究の進展に寄与するものである。

②病態解明の基盤となる基礎的知見が得られた。

未だ詳細な原因が未解明な「新生児突然死症候群」など呼吸循環に関する先天性疾患の病態理解の基礎となり、アストロサイトをはじめ回路発達に関連する候補因子が同定されれば、臨床的な応用の端緒を開きうる。

特に、生後1週間前後のアストロサイトとの相互作用が臨界期として重要であり、その時期のアストロサイトへの障害が、神経回路の成熟に大きく影響することを示したので、該当する妊婦の時期に対応させることで、病態理解の解明に寄与しうる。

#### 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4件)

[1] Tashiro Y, Okada T, Kawai Y. (2009) Postnatal development of axosomatic synapses in the rat nucleus tractus solitarius: dorsal and ventral subnuclei differences. *Neurosci Lett.* 450(2):217-220. (査読有)

[2] Okada T, Tashiro Y, Kato F, Yanagawa Y, Obata K, Kawai Y. (2008) Quantitative and immunohistochemical analysis of neuronal types in the mouse caudal nucleus tractus solitarius: Focus on GABAergic neurons. *J Chem Neuroanat.* 35(3):275-284. (査読有)

[3] Tashiro Y, Kawai Y. (2007) Glial coverage of the small cell somata in the rat nucleus of tractus solitarius during postnatal development. *GLIA.* 55(16): 1619-1629 (査読有)

[4] Tashiro Y, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F. (2007) Development and migration of GABAergic neurons in the mouse myelencephalon. *J Comp Neurol.* 503(2): 260-269. (査読有)

[学会発表] (計4件)

[1] Tashiro Y, Okada T, Kawai Y. (2008) Postnatal development of axosomatic synapses in the rat caudal nucleus of tractus solitarius. *Neuroscience Research (Suppl.)* 61. S160. 2008年7月8日 第31回神経科学大会(東京)

[2] Tashiro Y, Okada T, Kawai Y. (2008) Development of axosomatic synapses in the rat caudal nucleus of tractus solitarius. *Acta Anatomica Nipponica (Suppl.)*. 83: 246. 2008年3月28日 第113回日本解剖学会(大分)

[3] Tashiro Y, Kawai Y. (2007) Activity-dependent glial coverage in the rat nucleus of tractus solitarius during postnatal development. *Neuroscience Research (Suppl.)* 58. S80. 2007年9月11日 第30回神経科学大会(横浜)

[4] Tashiro Y, Kawai Y. (2007) Role of astrocytic processes in local neural network formation within the caudal nucleus of tractus solitarius during postnatal development. *Acta Anatomica Nipponica (Suppl.)* 82 S 193. 2007年3月28日 第112回日本解剖学会(大阪)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
太城 康良 (TASHIRO YASURA)  
三重大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10398787

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし