

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06410

研究課題名(和文) アストロサイトの細胞間接着分子による神経回路の維持と破綻の制御機構

研究課題名(英文) Roles of astrocytic cell adhesion molecules in the regulatory mechanisms of the maintenance and disruption of neuronal network

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) 3,200,000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および抑制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と三者間シナプスの形成に協調的に作用し、神経回路を制御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。しかし、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。本研究によって興奮性および抑制性三者間シナプスの形成・維持と、これらのシナプスによって形成される神経回路の制御機構の一端が解明されれば、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のが期待され、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, as well as astrocyte-synapse interactions during tripartite synapse formation, have not fully been understood, because a coculture system in which cocultured astrocytes and neurons form tripartite synapses structurally and functionally similar to those in vivo had not been developed. We developed an in vitro coculture system in which astrocytes cocultured with neurons formed highly ramified structures 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, play cooperative roles in tripartite glutamatergic and GABAergic synapse formation, and regulate neuronal network both in vitro and in vivo.

研究分野：細胞生物学、神経形態学

キーワード：細胞間接着分子 アストロサイト 神経細胞 三者間シナプス 神経回路

1. 研究開始当初の背景  
 神経細胞には興奮性神経細胞と抑制性神経細胞が存在し、同種あるいは異なる神経細胞とシナプスを計4種類形成する(図)。興奮性神経細胞はシナプスを介して他の興奮性神経細胞と神経回路を形成するが、抑制性神経細胞はシナプスを介してこの回路を抑制する。生体内では、興奮性のシグナルと抑制性のシグナルのバランスが適切な場所とタイミングで高度に

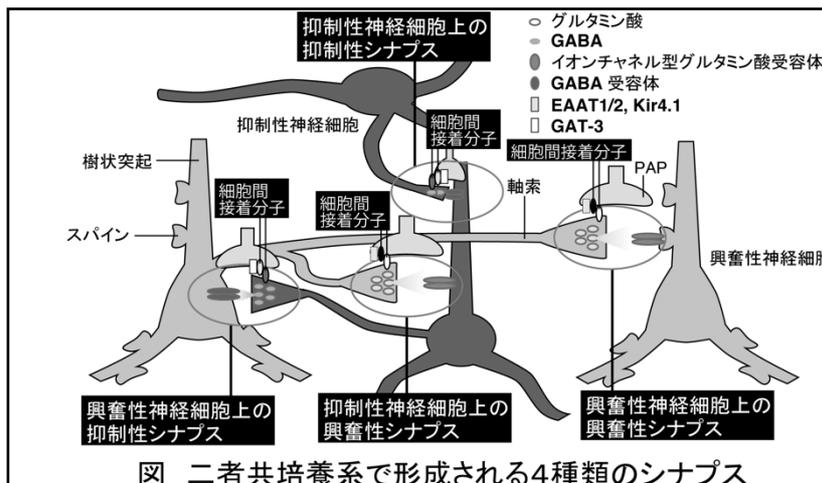


図 二者共培養系で形成される4種類のシナプス

制御されており、その結果、高度な脳機能が制御されている。それぞれのシナプスにはアストロサイトの突起 (PAP) が接着し、興奮性または抑制性の三者間シナプスを形成している。PAPはシナプス構造を支持すると共に、グルタミン酸の取り込みや乳酸の産生など代謝機能を担っており、PAPから分泌される液性因子がこの機能に重要な役割を果たしている。一方、抑制性神経細胞の機能が低下すると、興奮性神経細胞が過剰興奮し、過剰に分泌されたグルタミン酸により神経細胞死が引き起こされる。PAPに集積しているグルタミン酸トランスポーターEAAT1/2は、過剰に分泌されたグルタミン酸をアストロサイトに取り込むことにより神経細胞死を防いでいる。また、シナプスから放出される $K^+$ をアストロサイトに取り込む $K^+$ チャネルKir4.1もPAPに集積して、過剰 $K^+$ によるてんかんの発症とそれによる神経細胞死を防いでいる。しかし、PAPとシナプスとの接着の機構と役割については、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、十分には理解されていなかった。研究代表者は、神経細胞とアストロサイトをマウス脳から調製し、これらの細胞が生体内に類似した三者間シナプスを形成する*in vitro*二者共培養系を開発した。この系では、神経活動により個々のシナプスから分泌されたグルタミン酸が、グルタミン酸受容体 mGluR5 を介してアストロサイトの複雑な枝分かれを誘導してPAPを形成した。また、PAPと興奮性シナプスの接着に関わる細胞間接着分子がEAAT1/2とKir4.1の局在を制御し、興奮性神経細胞上の興奮性三者間シナプスの形成・維持を制御していることを明らかにしていた。一方、抑制性神経細胞上の興奮性三者間シナプス、興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の抑制性三者間シナプスの形成・維持の制御機構と、神経回路においてこれら4種類のシナプスがどのようにバランスを取って制御されているかは、十分には理解されていなかった。

## 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、神経回路の形成・維持と破綻の制御機構における細胞間接着分子の役割と作用機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 抑制性神経細胞上の興奮性三者間シナプスの形成・維持の制御機構における細胞間接着分子の役割と作用機構の解析

研究代表者が開発した神経細胞とアストロサイトの二者共培養系を用いて、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がアストロサイトの形態と抑制性神経細胞上の興奮性三者間シナプスの形成・維持に果たす役割と作用機構を解析した。

(2) 興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の抑制性三者間シナプスの形成・維持の制御機構における細胞間接着分子の役割と作用機構の解析

研究代表者が開発した神経細胞とアストロサイトの二者共培養系を用いて、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を同定し、この細胞間接着分子がアストロサイトの形態と興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の抑制性三者間シナプスの形成・維持に果たす役割と作用機構を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抑制性神経細胞上の興奮性三者間シナプスの形成・維持の制御機構における細胞間接着分子の役割と作用機構の解析

アストロサイト-神経細胞共培養系を用いて、興奮性神経細胞上の興奮性三者間シナプス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、抑制性神経細胞マーカーGAD67を指標にして、抑制性神経細胞上の興奮性三者間シナプスにおいても局在することを確認した。GAD67以外の抑制性神経細胞マーカーとしてパルブアルブミン、ソマトスタチンを用いて抑制性神経細胞を識別した場合も結果は同様であった。興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の興奮性シナプスにおいて、ともに70%以上にEAAT1が局在していたことから、興奮性シナプスの大半にアストロサイト突起が接着し、興奮性三者間シナプスを形成していることが明らかになった。アストロサイト突起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EAAT1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とシナプス側に局在する細胞間接着分子が集積し、それらが共局在した。さらに、野生型マウス由来のアストロサイト、またはアストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子を過剰発現させ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EAAT1とアストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子が共局在した。アストロサイト突起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は局在しなかった。そこで、これらの細胞間接着分子の細胞外領域とヒトFc領域との融合タンパク質(細胞外領域フラグメント)を作製し、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との共培養に添加すると、アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子の細胞外領域フラグメントはアストロサイトの形態形成と興奮性三者間シナプスの形成を抑制し、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EAAT1も減少したが、興奮性シナプス側に局在する細胞間接着分子の細胞外領域フラグメントはこれらの抑制効果は見られなかった。これらの結果から、抑制性神経細胞上の興奮性三者間シナプスにおいても、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に結合し、アストロサイトの機能分子を集積させることによって、興奮性三者間シナプスの形成と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。

一方、生体内では、海馬CA1領域において、パルブアルブミン陽性の抑制性神経細胞の樹状突起上で観察される興奮性シナプスでこれらの細胞間接着分子とEAAT1が共局在した。これらの細胞間接着分子の局在を免疫電子顕微鏡で詳細に解析すると、アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子は、前シナプスに面したアストロサイト突起側とシナプスの後シナプス側に局在し、一方、興奮性シナプス側に局在する細胞間接着分子は、アストロサイト突起に面した軸索末端側とシナプスの前シナプス側に局在した(免疫電子顕微鏡解析は東京大学 岡部繁男教授との共同研究)。アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子と興奮性シナプス側に局在する細胞間接着分子の二重欠損マウスの海馬CA1領域において、パルブアルブミン陽性の抑制性神経細胞の樹状突起上で観察される興奮性シナプス周囲でEAAT1のシグナルが退縮・断片化していた。

これらの結果から、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抑制性神経細胞上の興奮性三者間シナプスの形成と維持に重要であることが明らかになった。

##### (2) 興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の抑制性三者間シナプスの形成・維持の制御機構における細胞間接着分子の役割と作用機構の解析

アストロサイト-神経細胞共培養系を用いて、GAD67を指標にして、興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の抑制性三者間シナプスにおいて、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を同定した。さらに、これらの細胞間接着分子は、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。抑制性三者間シナプスの形成は、GABA<sub>A</sub>受容体アンタゴニストのピククリン存在下では抑制されなかったが、GABA<sub>B</sub>受容体アンタゴニストのSNAP-5114存在下で抑制された。また、アストロサイト突起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、アストロサイトの形態形成がわずかに抑制された。これらの結果から、抑制性三者間シナプスの形成において、アストロサイト突起はGABA<sub>B</sub>受容体依存的に伸長するが、GAT-3によるGABAのクリアランスが低下すると、活動依存性に放出されるグルタミン酸が減少し、アストロサイトの形態形成が抑制されることが示唆された。

アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子を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抑制性シナプスの接着部位でより多くのGAT-3とシナプス側に局在する細胞間接着分子が集積し、それらが共局在した。抑制性シナプス側に局在する細胞間接着分子、あるいは興奮性三者間シナプスの

アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子を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しても、アストロサイト突起と抑制性シナプスの接着部位に GAT-3 とシナプス側に局在する細胞間接着分子は局在しなかった。さらに、アストロサイト突起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が抑制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 GAT-3 とシナプス側に局在する細胞間接着分子の局在が減少した。しかし、野生型マウス由来のアストロサイトと抑制性シナプス側に局在する細胞間接着分子を欠損したマウス由来の神経細胞を共培養しても、アストロサイト突起と抑制性シナプスの接着部位で GAT-3 とアストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子の局在は変化しなかったことから、アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子がトランスに結合する未同定の分子が抑制性神経細胞側に存在することが示唆された。これらの結果から、興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の抑制性三者間シナプスにおいて、これらの細胞間接着分子はアストロサイト突起と抑制性シナプスの接着部位でトランスに結合し、アストロサイトの機能分子を集積させることによって、抑制性三者間シナプスの形成と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。

一方、生体内では、海馬 CA1 領域において、錐体細胞の先端樹状突起上で観察される抑制性シナプス（興奮性神経細胞上の抑制性シナプス）でこれらの細胞間接着分子が局在した。また、海馬 CA3 領域と歯状回門の境界付近において、パルブアルブミン陽性の抑制性神経細胞の樹状突起上で観察される抑制性シナプス（抑制性神経細胞上の抑制性シナプス）でこれらの細胞間接着分子が局在した。これらの細胞間接着分子の局在を免疫電子顕微鏡で詳細に解析すると、いずれの海馬領域において、アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子は、前シナプスに面したアストロサイト突起側に局在し、抑制性シナプス側に局在する細胞間接着分子は、アストロサイト突起に面した軸索末端側とシナプスの前シナプス側および後シナプス側に局在した（免疫電子顕微鏡解析は東京大学 岡部繁男教授との共同研究）。また、アストロサイト突起側に局在する細胞間接着分子の欠損マウスの海馬 CA1 領域において、加齢に伴ってアストロサイトが変性し、アストロサイトドメインの退縮と神経細胞死の促進が観察された。これらの結果から、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興奮性神経細胞上および抑制性神経細胞上の抑制性三者間シナプスの形成と維持に重要であること、抑制性三者間シナプスの機能不全により神経回路が破綻して神経細胞死を引き起こすことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nozawa Osamu, Miyata Muneaki, Shiotani Hajime, Kameyama Takeshi, Komaki Ryouhei, Shimizu Tatsuhiro, Kuriu Toshihiko, Kashiwagi Yutaro, Sato Yuka, Koebisu Michinori, Aiba Atsu, Okabe Shigeo, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi	4. 巻 150
2. 論文標題 Nec12/3-mediated mechanism for tripartite synapse formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev200931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200931	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 -

〔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
---------	---------