

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500352

 研究課題名（和文） 錐体細胞付随性グリア細胞によるニューロン活動に対する修飾効果の
機序の解明

 研究課題名（英文） Modulatory effects of perineuronal glial cells on neuronal activities
of pyramidal cells

研究代表者

山崎 良彦（YAMAZAKI YOSHIHIKO）

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：10361247

研究成果の概要（和文）：

海馬錐体細胞の細胞体に付随するグリア細胞を同定し、その形態学的特徴を明らかにした。また、グリア細胞を付随する錐体細胞では、付随しない錐体細胞に比べ、静止膜電位や入力抵抗に違いはなかったが、最大発火周波数が有意に小さかった。そして、付随性グリア細胞を脱分極させると、その初期相において、錐体細胞の発火頻度を増加させた。これらの結果は、付随性グリア細胞が定常的に錐体細胞の興奮性を調節し、さらに活動依存的にも興奮性を修飾していることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：

We identified perineuronal glial cells (PNG) of pyramidal cells in CA1 region of the rat hippocampus. The maximum firing frequency of the pyramidal cells accompanying the PNG was significantly smaller than that of the pyramidal cells without PNG. Direct depolarization of PNG increased the firing frequency of action potentials of pyramidal cells, especially in the initial phase of the depolarization. These results indicate that the PNG modulate the activity of pyramidal cells constitutively and activity-dependently.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：海馬，グリア，錐体細胞，活動電位，発火周波数，CA1

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞は多様な神経伝達物質受容体を発現しており、近傍の神経活動に対しダイナミックに反応する。さらに神経活性物質を放出していることも確認されている。これらのことはグリア細胞が神経回路網に対して積極的に関与していることを示唆しており、実際、その関与についての証拠も集積されてきている。特に魅力的な点として、時間的・空間的の広がりをもつグリア細胞の神経活動に対する調節機能は、特異性には欠けるものの、異なる神経回路間に同時に影響を与える可能性が挙げられる。しかし、具体的にどのようにグリア細胞が神経回路を調節しているのかは、その作用の多様性もあり、不明な点が多い。われわれは、これまでに電気生理学および形態学的手法を用いてグリア細胞の性質を調べ、ニューロンとグリア細胞の相互作用を検討してきた。そして、1) 海馬の介在ニューロンとそれに付随するグリア細胞との同時ホールセル記録により、グリア細胞が興奮性シナプス伝達およびニューロンの発火に対し抑制的に作用すること、2) オリゴデンドロサイトの脱分極により、海馬錐体細胞の活動電位の軸索伝導速度が促進効することを発見した。グリア細胞とニューロンのいろいろな組み合わせで相互作用を調べ、海馬全体としては、その作用が興奮性に働くのか、あるいは逆に抑制的に働くのかという視点に立って検討するために、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

具体的な機序を調べるためには、空間的に近接している細胞の組み合わせが理想的である。本研究においては、ニューロンとその細胞体に付随するグリア細胞間の相互作用を調べることにより、グリア細胞による神経活動調節機構を解明する。これまでに確立した技術を用い、海馬からの出力を担うCA1領域の錐体細胞とそれに付随するグリア細胞との組み合わせに着目し、以下のことを行って相互作用の存在とその機序を明らかにしようというのが本研究の目的である。

(1) 錐体細胞付随性グリア細胞の同定.

本研究では、まず錐体細胞付随性グリア細胞の細胞膜の電気的性質および全細胞電流パターンを測定し、さらに記録した細胞のサブタイプを同定する。

(2) 錐体細胞付随性グリア細胞の活性化物

質の検討.

この細胞にどのような神経伝達物質受容体が発現しているか調べるために、薬物の微小圧投与を行う。また、内在性の物質に反応するかどうか調べるために、求心性線維の電気刺激を行う。

(3) 錐体細胞の活動に対するグリア細胞の修飾効果.

上記の実験結果をふまえた上で、錐体細胞と付随するグリア細胞より同時ホールセル記録を行い、グリア細胞の膜電位を操作して、シナプス伝達や発火閾値に対するグリア細胞の修飾効果を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、ラット海馬の薄切片（スライス標本）を用いた急性実験を行う。ホールセル記録と免疫組織化学染色を組み合わせた手法を用いる。

(1) 海馬スライス標本を作成し、近赤外線微分干渉顕微鏡下で、海馬CA1領域の錐体細胞とそれに付随するグリア細胞の組み合わせを観察・同定し、細胞体よりホールセル記録をする。

(2) 付随性グリア細胞の、静止膜電位・入力抵抗ならびに電圧変化・電流注入に対する反応を調べる。

(3) 電極内溶液にバイオサイチンを加え、電気生理学の実験後に染色し、形態を確認する。また、注入したバイオサイチンに対する蛍光染色と、グリアのマーカータンパクであるS100 β （アストロサイト）、NG2, CNPase、（オリゴデンドロサイトおよびその前駆細胞）、Iba1（ミクログリア）に対する抗体を用いた蛍光染色を組み合わせることによって、記録した細胞のサブタイプを同定する。

(4) グリア細胞に注入したバイオサイチンに対する蛍光染色と錐体細胞へのルシフェーゼの注入により、両者の形態学的関係を検討する。

(5) 放線層あるいは多形細胞層に刺激電極を刺入し、グリア細胞が電気刺激にて反応するかどうか検証する。

(6) グリア細胞を付随している錐体細胞と付随していない錐体細胞の比較。活動電位の発火パターン、発火周波数に違いがないか検討する。

(7) 付随性グリア細胞と錐体細胞を同時ホールセル記録し、まず、興奮性シナプス伝達に対するグリア細胞の修飾効果を検討する。グリア細胞の膜電位を脱分極あるいは過分極させたときのシナプス反応の変化を調べる。具体的には、この修飾効果の性質について、効果が出現するまでの潜時や効果の持続時間を明らかにしていく。

4. 研究成果

(1) 海馬CA1領域の錐体細胞の細胞体に付随するグリア細胞の形態学および電気生理学的性質。このグリア細胞は、4~8本の細胞体から伸びる突起を持っており、各々の突起はニューロンの樹状突起やアストロサイトの突起に比べかなり太い径を示した。さらに、突起の先端で膜状に広がっている部位を持ち、特徴的な形態を示していた(図1)。また、静止膜電位は平均で約-40 mV、入力抵抗は約400 MΩ以上であった。

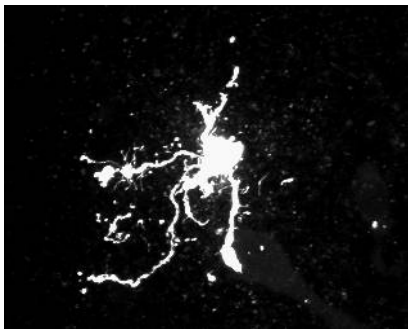


図1 典型的な錐体細胞付随性グリア細胞の蛍光染色像。

(2) グリア細胞の近傍を電気刺激し、神経終末から放出される神経伝達物質に対して反応するかどうか調べた。しかし、電圧固定法・電流固定法のどちらにおいても、明瞭な反応は見られなかった。近くに多数の錐体細胞が存在するため、活動電位発生に伴う細胞外カリウムイオン濃度増加による変化が期待されたが、その反応もみられなかった。入力抵抗が大きいことと合わせて考えると、このグリア細胞のリークコンダクタンスは非常に小さいことが推定された。

(3) グリア細胞が付随している錐体細胞と付随していない細胞との比較。

① 形態学的差異：グリア細胞を付随している錐体細胞の基底樹状突起は、付随していない錐体細胞に比べ、垂直方向に分布する傾向がみられた。

② 電気生理学的差異：静止膜電位および入力抵抗には、優位な差はみられなかった。脱分極性電流注入による活動電位の発火について、初期相での最大発火周波数が小さい傾向がみられた。活動電位の発火頻度について検討したところ、グリア細胞が付随していない錐体細胞では、電流注入による活動電位の最大発火頻度が、初期相では 79.3 ± 0.9 Hz、定常相では 31.1 ± 2.3 Hz ($n = 16$) であった。これに対し、グリア細胞が付随している場合では、初期相で 69.5 ± 1.8 Hz、定常相で 27.3 ± 2.1 Hz ($n = 9$) の発火周波数を示し、初期相において優位に小さい発火頻度を示すことがわかった。定常相での発火周波数も小さい傾向がみられたが、統計学的優位差には至らなかった。これらのことから、付随性グリア細胞はニューロン発火に対し定常的に影響を与えていることが示唆された。

(4) 錐体細胞付随性グリア細胞のサブタイプを同定。注入したバイオサイチンに対する蛍光染色と、CNPase, NG2, S100 β , Iba 1に対する抗体を用いた染色との二重染色を行った。その結果、NG2およびS100 β 陰性であることが確認できた。一方、CNPaseについては5例中2例、Iba 1については、6例中2例で陽性の細胞がみられた。より明確な結果を得るためには、染色法を含め、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

(5) 錐体細胞付随性グリア細胞による錐体細胞発火に対する修飾効果。同時にホールセル記録を行い、付随性グリア細胞の膜電位を操作したときの錐体細胞発火に対する効果を調べた。これまでの研究により、介在ニューロン付随性オリゴデンドロサイトと介在ニューロンとの組み合わせにおいて、オリゴデンドロサイトの過分極により介在ニューロン発火頻度の抑制がみられることがわかっており、錐体細胞付随性グリア細胞を段階的に過分極させたが、錐体細胞の発火頻度には変化がみられなかった。しかし、付随性グリア細胞を脱分極すると、修飾効果が観察された。付随性グリア細胞を脱分極させたときの錐体細胞発火に対する効果を調べた。

その結果、付随性グリア細胞を脱分極させた場合、脱分極初期（脱分極開始～400 ms）では発火頻度がコントロールの $108.3 \pm 5.1\%$ ($n = 4$) と有意に増大することがわかった。これに対し、グリア脱分極の後期（脱分極開始後400 msから800 ms）では、コントロールの $101.2 \pm 2.1\%$ ($n = 4$) を示し、明らかな変化は認められなかった。これらの結果は、錐体細胞付随性グリア細胞が、特にその脱分極初期において、ニューロン活動を促進的に修飾していることを示唆している。以上のことから、神経回路網の情報伝達におけるグリア細胞の新しい関与形態を直接的に記述することができた。

(6) 今後の展望.

錐体細胞付随性グリア細胞の同定においては、まだ明確な結果が得られていない。今後、その全電流パターンを含め、より詳細な検討を行い一つのサブタイプのみから構成されるのか、あるいはどのように分類されるか明らかにする必要がある。また、生理的環境下において、このグリア細胞が脱分極する条件を調べることも必要である。本研究の同時ホールセル記録から、付随性グリア細胞の脱分極により、錐体細胞の発火頻度が増大することがわかった。このことは、海馬出力をより強力にすることを示唆している。介在ニューロンには多くの種類が存在するが、これらに付随するグリア細胞による修飾効果が、本研究でみられたものと同様のものであるかどうかの検討も重要な課題であると考えられた。

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7件)

- ① Lee HU[†], Yamazaki Y[†], Tanaka KF, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K. Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 61: 210-224, 2012. [†]These authors contributed equally to this work. (査読: 有) DOI: 10.1002/glia.22427
- ② Yamazaki Y, Fujii S, Aihara T, Mikoshiba K. Activation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors during preconditioning low-frequency stimulation leads to reversal of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Neurosci* 207:

1-11, 2012. (査読: 有) DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.045

- ③ Suzuki Y, Yamazaki Y, Hozumi Y, Okada M, Tanaka T, Iseki K, Ohta N, Aoyagi M, Fujii S, Goto K. NMDA receptor-mediated Ca^{2+} influx triggers nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase ζ under oxygen-glucose deprivation conditions, an in vitro model of ischemia, in rat hippocampal slices. *Histochem Cell Biol* 137: 499-511, 2012. (査読: 有) DOI: 10.1007/s00418-011-0907-y
 - ④ Yamazaki Y, Fujii S, Goto JI, Sugihara T, Sugita M, Fujiwara H, Kaneko K, Aihara T, Mikoshiba K. Suppressive effect of preconditioning low-frequency stimulation on subsequent induction of long-term potentiation by high frequency stimulation in hippocampal CA3 neurons. *Brain Res* 1449: 15-23, 2012. (査読: 有) DOI: 10.1016/j.brainres.2012.02.025
 - ⑤ Yamazaki Y, Sugihara T, Goto JI, Chida K, Fujiwara H, Kaneko K, Fujii S, Mikoshiba K. Role of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptors in the postsynaptic expression of guinea pig hippocampal mossy fiber depotentiation. *Brain Res* 1387: 19-28, 2011. (査読: 有) DOI: 10.1016/j.brainres.2011.02.088
 - ⑥ Ikarashi K, Fujiwara H, *Yamazaki Y, Goto JI, Kaneko K, Kato H, Fujii S, Sasaki H, Fukumoto S, Furukawa K, Waki H, Furukawa K. Impaired hippocampal long-term potentiation and failure of learning in β 1,4-N-acetylgalactosaminyl transferase gene transgenic mice. *Glycobiol* 21: 1373-1381, 2011. *corresponding author. (査読: 有) DOI: 10.1093/glycob/cwr090
 - ⑦ Jia Y[†], Yamazaki Y[†], Nakauchi S, Ito K-I, Sumikawa K. Nicotine facilitates long-term potentiation induction in oriens-lacunosum molecular cells via Ca^{2+} entry through non- α 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci* 31: 463-476, 2010. [†]These authors contributed equally to this work. (査読: 有) DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.07058.x
- [学会発表] (計5件)
- ① 山崎良彦:海馬白板のオリゴデンドロサイト脱分極による活動電位の軸索伝導に対する修飾効果. 第4回光操作研究会(招待講演) 2012年9月27日, 岡崎市, 自然科学

研究機構 岡崎カンファレンスセンター.

- ② Yamazaki Y. Facilitative effects of oligodendrocytes depolarization on the axonal conduction in the white matter of murine hippocampus. 第35回 日本神経科学大会. 2012年9月20日, 名古屋市, 名古屋国際会議場.
- ③ Yamazaki Y. Modulatory effects of perinterneuronal oligodendrocyte on interneuronal firing in CA1 region of rat hippocampus. 第89回 日本生理学会大会. 2012年3月29日, 松本市, 松本文化会館.
- ④ 山崎 良彦: 介在ニューロン付随性オリゴデンドロサイトによる介在ニューロン発火に対する修飾効果. 第43回 東北生理談話会. 2010年10月16日, 秋田市, 秋田大学.
- ⑤ Yamazaki Y. Properties of perineuronal oligodendrocytes and its modulatory effects on neuronal activities in CA1 region of rat hippocampus. The 29th Naito Conference "Glia world-dynamic function of glial cells in the brain" (招待講演) 2010年10月7日, 神奈川県葉山町, 湘南国際村センター.

[その他]

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/PhysiologyII/Physiol2-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 良彦 (YAMAZAKI YOSHIHIKO)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号: 10361247

(2) 研究協力者

金子 健也 (KANEKO KENYA)
山形大学・医学部・技術専門職員