

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500516

研究課題名(和文)神経回路発達を誘導するグリア細胞トランスポーター分子の制御メカニズム

研究課題名(英文)Glial conditioning mechanism through induction of development of neural circuit in cerebellar development

研究代表者

吉田 祥子 (Yoshida, Sachiko)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40222393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：自家開発した酵素光学デバイスにより培養初期のグリア細胞からGABA放出が観察され、一方培養後期のグリア細胞でGABA放出が著しく減弱した。インピーダンス顕微鏡を用い細胞膜直下のアクチン線維の安定性によるインピーダンスの変化を非接触で観察した。抗てんかん薬バルプロ酸の投与は、初期のグリア細胞からのGABA放出を増大し、早いATP放出を示し、プルキンエ細胞樹状突起の伸長を早めた。GABA-トランスポーター系が小脳発達を制御する可能性を示唆した。バルプロ酸の作用機序とHDAC阻害剤の関係は未だ不明だが、胎生期の特定時期での遺伝子発現への介入が、GABA放出と小脳発達に影響することが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed the enzyme-linked transmitter photoassay device. Using this system, GABA release was observed in the immature cerebellar cultured glial cells without co-cultured neurons. Matured glial cells expressing GFAP released little GABA. This GABA release would relate to VGAT expression in glial cells. Stability of F-actin and plasmalemmal undercoat could be observed in the living cells using the acoustic microscopy. Valproate, general antiepileptic agent, hastened cerebellar development, especially the dendrite elongation of Purkinje cells. Valproate is known as the inhibitor of both GABA transaminase and HDAC. It is unknown which is primary factor, however, some HDAC inhibitors showed same effect. We developed the device for detection of released ATP relating synaptogenesis. In Valproate-treated animals, high ATP release was observed even in P6. We suggested that GABA would be a conductor of cerebellar development, and HDAC inhibitors might disrupt it and hasten abnormally.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：GABA プルキンエ細胞 ATP HDAC阻害剤 小脳発達 神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

組織は多様な細胞から構成され多種の情報伝達分子が相互作用し複雑な生理反応を引き起こしている。このような反応では、伝達分子の「不足」や「過剰」だけではなく、相互のバランスが重要と考えられる。しかし、情報伝達分子の放出は従来、細胞の活動変化の観察、組織周辺溶液の分析、組織の化学固定後物質分布を観察等で研究されてきたが、生きた組織からの生理活性分子の放出を時空間的に観察する方法は乏しかった。本研究の対象である小脳において、我々は小脳皮質の分化過程の研究で、グルタミン酸とアミノ酪酸 (GABA) の放出パターンを調べるために、伝達物質の酸化還元酵素を用い発生する蛍光分子によって神経伝達アミノ酸の分布を観察する方法を自家開発した。伝達物質分布の空間パターンを可視化した結果、従来 GABA が分布すると考えられていなかった小脳皮質表層部に、非神経性のグリア細胞からの GABA 放出が見られること、GABA 興奮性のグルタミン酸放出が時間的に変化することも観察された。より空間的、時間的に詳細な観察のために、酵素をガラス基板に共有結合担持し、光源を LED、光路を表面光励起としてデバイス化を図った。他の酸化還元酵素でも測定可能であると確認した。

2. 研究の目的

小脳皮質の発達に重要な役割を果たしているグリア細胞の伝達物質制御のメカニズムについて、トランスポータタンパク質の作用に薬理的に介入して、伝達物質放出と細胞内骨格の変化の両面から測定する。

目標 1、グリア細胞からの GABA 放出メカニズムと制御因子を確定する。目標 2、発達期小脳で、GABA を合成している細胞を確定する。目標 3、GABA の取り込みと放出に強く関与するトランスポータタンパク質を、細胞膜に安定化させるメカニズムと制御因子を確認する。目標 4、一連の過程での遺伝子発現の変化を追跡する。

3. 研究の方法

(1) 酵素をガラス基板に担持して光学測定する自家開発の光学デバイスを用い、ラット小脳組織スライスおよび培養細胞について伝達物質放出の光学測定を行った。

多様な伝達物質の測定のため開発を進め、研究当初のグルタミン酸、GABA に加え、ATP 放出の測定を可能にした。さらにバックグラウンド光の影響を抑えて高感度撮影が可能になるよう、デバイス回りの改良を行った。

(2) 超音波によって生きた細胞内構造を可視化する音響インピーダンス顕微鏡を用い、培養細胞および急性スライス組織の細胞内構造変化を連続観察した。

(3) 細胞内の情報伝達及び遺伝子発現に介入するため、培養細胞及び個体への薬理的介入を行い、その細胞・組織を光学デバイス及び音響インピーダンス顕微鏡で観察した。

(4) 細胞・組織のタンパク質レベルでの変

化を観察するために、組織化学的手法による染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 培養小脳グリア細胞からの GABA 放出光学測定を行ったところ、神経細胞が共存しない環境においても培養初期のグリア細胞から GABA 放出が観察され、一方 GFAP 発現した培養後期のグリア細胞では、GABA 放出が著しく減弱した。GABA 放出期のグリア細胞は、GABA 合成酵素 GAD65/67 抗体で染色され、GABA 合成能があることが確認できた。発生初期にはグリア細胞が GABA を合成し放出していると考えられる。生きたグリア細胞に VGAT タンパク質 N-末端認識抗体または C-末端認識抗体を結合させたところ、N-末端抗体のみが結合した。GABA 放出期のグリア細胞は、GABA 細胞内取り込みの向きに VGAT を発現していることが示唆された。

(2) トランスポータタンパク質を細胞膜に安定化させるメカニズムと制御因子を観察するため、インピーダンス顕微鏡を用いた細胞観察のフレームアップを整えた。細胞膜直下のアクチン線維の重合・脱重合に伴うインピーダンスの変化、および、アクチン線維が収縮を示した際のインピーダンス変化を、細胞に非接触で観察した。

(3) トランスポーターの作用に影響する抗てんかん薬バルプロ酸を胎児期に投与されたラットで、発生初期にグリア細胞からの GABA 放出が増大し、GLAST、GLT-1 などトランスポータタンパク質の発現が変化した。更に神経突起の早期の異常伸長が見られ、GABA-トランスポータ系が小脳発達の時間進行を制御している可能性を示唆した。

(4) 小脳発生から神経回路形成をつなぐ伝達物質として重要な、ATP の放出分布観察デバイスを構成し、バルプロ酸投与動物の小脳組織を観察したところ、対照動物に比べ早期から ATP の放出が観察された。

(5) 神経発達に関わる遺伝子発現に影響することが知られるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を、バルプロ酸と同様に胎児期に投与したところ、トリコスタチン A 投与群では極弱い影響、SAHA 投与群ではバルプロ酸より弱いが一応の影響が現れることを確認した。バルプロ酸の効果は、GABA を介したものが HDAC 阻害剤としての効果がまだ結論は得られないが、胎生期の特定時期での遺伝子発現への介入が、GABA 放出と小脳発達に影響することが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Yoshida S, Minowa R, Masaki S, Yamamoto S, Kobayashi K, Hozumi N. Characterization techniques of particular proteins in cerebellar cortex using acoustic impedance microscope. J Acoust Soc Am. 査読あり 2012 131(4)pp.3495.

Wang T, Kumada T, Morishima T, Iwata

S. Kaneko T. Yanagawa Y. Yoshida S. Fukuda A. Accumulation of GABAergic Neurons, Causing a Focal Ambient GABA Gradient, and Downregulation of KCC2 Are Induced During Microgyrus Formation in a Mouse Model of Polymicrogyria. *Cerebral Cortex*. 査読あり 2012.

doi:10.1093/cercor/bhs375

吉田祥子・穂積直裕 神経伝達物質を視るデバイスが拓く神経科学の展開 IEICE Technical Report. 査読あり 2012 vol.112(345), NC2012-81, pp.39-40.

Yoshida S. Shioki Y. Minowa R. Hozumi N. Kobayashi K. Featuring technique of particular proteins for brain tissue using acoustic impedance microscope. *Ultrasonics Symposium (IUS) 2012 IEEE International*. 査読あり 2012 pp.362 -365

doi:10.1109/ULTSYM.2012.0089

Hozumi N. Yoshida S. Kobayashi K. Saijo Y. Miura K. Yamamoto S. Observation of rat brain tumor model and its quantitative analysis by acoustic impedance microscopy. *Ultrasonics Symposium (IUS) 2012 IEEE International*. 査読あり 2012 pp.2372 - 2375

doi:10.1109/ULTSYM.2012.0593

吉田祥子, 穂積直裕 発達期小脳アストロサイトの機能と秩序形成 日本神経回路学会誌 査読あり 2013 Vol. 20(1), pp.14-18

Yoshida S. Yamada H. Shioki Y. Hozumi N. Yagihashi M. Kobayashi K. Yamamoto S. Visualization of cancer distribution for living tissues using acoustic impedance microscope. *Ultrasonics Symposium (IUS) 2013 IEEE International*. 査読あり 2013 pp.2014 - 2017

doi:10.1109/ULTSYM.2013.0514

Gunawan AI. Hozumi N. Furuhashi T. Yoshida S. Saijo Y. Kobayashi K. Yamamoto S. Projection mode ultrasonic microscopy for cell-size observation. *Ultrasonics Symposium (IUS) 2013 IEEE International*. 査読あり 2013 pp.884 -887

doi:10.1109/ULTSYM.2013.0227

Hozumi N. Gunawan AI. Kajima S. Yoshida S. Saijo Y. Kobayashi K. Yamamoto S. Sound field analysis for biological acoustic impedance microscope for its precise calibration. *Ultrasonics Symposium (IUS) 2013 IEEE International*. 査読あり 2013 pp.1212 - 1215

doi:10.1109/ULTSYM.2013.0310
Kobayashi K. Yoshida S. Saijo Y. Hozumi N. Acoustic impedance microscopy for biological tissue characterization. 査読あり 2014 *Ultrasonics*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2014.04.007>

[学会発表](計 34 件)

Yoshida S. Visualization of GABA release in the developing cerebellar cortex, 8th IBRO World Congress of Neuroscience, 2011.7.16 Florence, Italy

Kurimoto Y. Yonezawa Y. Kobayashi K. Hozumi N. Takayama C. Fukuda A. Yamamoto S. Yoshida S. GABA conditioning regulated by the transporters in cultured cerebellar glial cells, 第34回神経科学学会, 2011.9.17, 横浜
Jimbu T. Itoh S. Hozumi N. Fukuda A. Yoshida S. Observation of glutamate, GABA and ATP release in mature rat cerebral slices photo assay systems using the enzyme-linked photo assay systems, 第34回神経科学学会, 2011.9.16, 横浜

Tanozaki M. Lim CW. Yoshida S. Observation of glutamate and GABA in developing rat cerebellar slices using the enzyme-linked photo assay systems: assay system innovation, 第34回神経科学学会, 2011.9.16, 横浜
Nomura M. Kobayashi R. Nagai Y. Nishibayashi E. Itoh H. Yoshida S. Visualization of GABA release from pancreatic β -cells for hyperglycemia 第34回神経科学学会, 2011.9.16, 横浜

Tanozaki M. Hozumi N. Takayama C. A. Fukuda A. Yoshida S. Observation of glutamate and GABA in developing rat cerebellar slices using the enzyme-linked photo assay systems: assay system innovation, AP-IRC2011, 2011.11.17, 豊橋

Nomura M. Kobayashi R. Nagai Y. Nishibayashi E. Itoh H. Yoshida S. Visualization of GABA release from pancreatic β -cells for hyperglycemia, AP-IRC2011, 2011.11.17, 豊橋

Kurimoto Y. Yonezawa Y. Kobayashi K. Hozumi N. Takayama C. Fukuda A. Yoshida S. GABA conditioning regulated by the transporters in cultured cerebellar glial cells, AP-IRC2011, 2011.11.17, 豊橋
Lim CW. Saigusa M. Yoshida S. Observation of glucose and sucrose

release from plant cells using double enzyme immobilization, AP-IRC2011, 2011.11.17, 豊橋
FUKUDA A, MORISHIMA T, KUMADA T, TAKAYAMA C, YOSHIDA S. Ambient GABA released from Bergmann glial cells promotes proliferation of cerebellar granule cell precursors, 41th Neuroscience meeting of SFN, 2011.11.14, Washington DC, USA
Yoshida S, et al. Oral GABA treatment prevents aged degradation of the islet reactions in hyperglycemic conditioning, 第 89 回日本生理学会大会, 2012.3.31, 松本
Hayasaki H, Morishima T, Sohma Y, Yoshida S, Fukuda A, Otsuki A. An immunocytochemical study for the local GABAergic system in rat trigeminal ganglion, 第 89 回日本生理学会大会, 2012.3.31, 松本
Yoshida S, Minowa R, Masaki S, Yamamoto S, Kobayashi K, Hozumi N. Characterization techniques of particular proteins in cerebellar cortex using acoustic impedance microscope, Acoustics2012 Hong Kong, 2012.5.17, Hong Kong
Tanozaki M, Katsumata D, Sekino Y, Fukuda A, Yoshida S. The adverse effect of GABA overdose in developing rat cerebellar cortex, 第 35 回神経科学学会, 2012.9.21, 名古屋
Muramoto H, Itoh S, Jlmbu T, Hozumi N, Yoshida S. Observation of ATP release in developing rat cerebellar slices using the enzyme-linked photo assay system, 第 35 回神経科学学会, 2012.9.21, 名古屋
Harada T, Furukawa K, Lim CW, Saigusa M, Hozumi N, Yoshida S. Improvement of enzyme-linked photo assay device for neurotransmitter detection, 第 35 回神経科学学会, 2012.9.21, 名古屋
Shioki Y, Harada T, Yagihashi M, Kobayashi K, Hozumi N, Yamamoto S, Yoshida S. Living Observation of Channel-protein Distribution in Developing Cerebellar Cortex Using Acoustic Impedance staining, 第 35 回神経科学学会, 2012.9.21, 名古屋
Yoshida S, Yamada H, Kurimoto Y, Kobayashi K, Takayama C, Yamamoto S, Fukuda A, Hozumi N. Transient GABA release from cerebellar glial cells is conditioned by the transporter proteins, 第 35 回神経科学学会, 2012.9.21, 名古屋
Ohkuma M, Kaneda M, Yoshida S, Fukuda A, Miyachi E. Visualization of

glutamate release in the mouse retinal slice, 第 35 回神経科学学会, 2012.9.18, 名古屋
Nomura M, Nagai Y, Shioki Y, Iwaya K, Kawamoto T, Yoshida S. GABA release and control from pancreatic β -cells for hyperglycemia, 2012 年度日本生物工学会大会, 2012.10.26, 神戸
21 Yoshida S, Shioki Y, Minowa R, Kobayashi K, Hozumi N, Yamamoto S. Featuring technique of particular proteins for brain tissue using acoustic impedance microscope, the 2012 IEEE International Ultrasonics Symposium, 2012.10.8, Dresden, Germany
22 MURAMOTO H, SEKINO Y, HOZUMI N, FUKUDA A, YOSHIDA S. Developing transition of ATP release to glutamate stimulation in rat cerebellar slices using a new ATP imaging system, 42th Neuroscience meeting of SFN, 2012.10.14, New Orleans, USA
23 Yoshida S, Hozumi N. Development of enzyme-linked photo assay systems for observation of neurotransmitters released in developing rat cerebellar slices, 12th Polish-Japanese Seminar on Biomeasurements and Health Care Systems, 2012.11.10, Warsaw, Poland
24 YOSHIDA S, MURAMOTO H, TANOZAKI M, HOZUMI N, FUETA Y, SEKINO Y. Valproate application to rat fetus encourages the development of Purkinje cell dendrites and network formation in cerebellar development. 43th Neuroscience meeting of SFN, 2013.11.10, San Diego, USA
25 Yoshida S. ATP release to glutamate stimulation in rat cerebellar cortex correlated to the development of Purkinje cell dendrites and network formation, The 11th Japan-Korea Joint Symposium on Brain Science, and Cardiac and Smooth Muscles, 2013.9.5, 浜松
26 Hozumi N, Yoshida S, Kobayashi K, Saijo Y, Yamamoto S. Projection Mode Ultrasonic Microscopy for Cell-size Observation, 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium, 2013.7.25, Prague, Czech Republic
27 Yoshida S, Yamada H, Shioki Y, Yagihashi M, Kobayashi K, Yamamoto S, Hozumi N. Visualization of cancer distribution for living tissues using acoustic impedance microscope, 2013 IEEE International Ultrasonics Symposium, 2013.7.25, Prague, Czech Republic

- 28 Muramoto H, Harada T, Furukawa K, Hozumi N, Yoshida S. Spatiotemporal ATP release to glutamate stimulation in developing rat cerebellar slices using a new ATP imaging system, 第 56 回神経科学学会大会, 2013.6.20, 京都
- 29 Yoshida S, Tanozaki M, Fukuda A, Fueta Y, Sekino Y. Valproate application to rat fetus changes developing GABA release and neuronal differentiation, 第 56 回神経科学学会大会, 2013.6.20, 京都
- 30 Betsudan M, Yamada H, Shioki Y, Furuhashi T, Kobayashi K, Yamamoto S, Hozumi N, Yoshida S. Subcellular structure observation of glioblastoma and myoblast differentiation using high-resolution acoustic impedance microscope, 第 56 回神経科学学会大会, 2013.6.21, 京都
- 31 勝股大樹, 村本英樹, 田野崎真, 笛田由紀子, 関野祐子, 吉田祥子, 胎生期バルプロ酸曝露による発達期小脳皮質での伝達物質放出変化, 第 60 回中部日本生理学会, 2013.10.25, 岐阜
- 32 渡邊一徳, 原田太一, Lim Chinwooi, 穂積直裕, 吉田祥子, 神経伝達物質測定のための酵素光学デバイスの開発, 第 60 回中部日本生理学会, 2013.10.25, 岐阜
- 33 阿部 巧, 古川和樹, 塩木康紀, 野村真悟, 永井裕次郎, 岩谷和輝, 佐津川満, 河本哲宏, 吉田祥子, 2 型糖尿病発症モデルラット ZFDM に対する GABA 経口投与の抗糖尿病効果, 第 60 回中部日本生理学会, 2013.10.25, 岐阜
- 34 Fueta Y, Yoshida S, Sekino Y. Evaluation of developmental neurotoxicity by the functional analysis of local neuronal circuits in the brain slice of autism model animals, 第 86 回日本産業衛生学会, 2013.5.16, 松山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 生体からの ATP、アデノシン、リン酸放出分布可視化デバイス
 発明者: 吉田祥子
 権利者: 豊橋技術科学大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2011-176342
 出願年月日: 2011.8.11
 国内外の別: 国内

名称: 新規乳酸菌

発明者: 吉田祥子、永井裕次郎、西林依里子
 権利者: 東海漬物株式会社
 種類: 特許
 番号: 特願 2012-20206
 出願年月日: 2012.2.1
 国内外の別: 国内

名称: 光学観察装置、光学観察方法、標本観察画像の画像処理プログラム
 発明者: 吉田祥子、穂積直裕、氏家雅彦、須山洋行
 権利者: 豊橋技術科学大学、パルステック工業
 種類: 特許
 番号: 特願 2013-258731
 出願年月日: 2013.12.13
 国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

名称: 糖尿病性白内障を予防する医薬品製剤
 発明者: 吉田祥子、三木隆治
 権利者: 豊橋技術科学大学
 種類: 特許
 番号: 特許 4787952
 取得年月日: 2011/7/29
 国内外の別: 国内

名称: 音響パラメータ測定装置、音響パラメータ測定装置用の試料支持体、音響パラメータ測定方法、及び超音波脳組織観察方法
 発明者: 吉田祥子、小林和人
 権利者: 豊橋技術科学大学、本多電子
 種類: 特許
 番号: 特許 5130451
 取得年月日: 2012.11.16
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 祥子 (YOSHIDA Sachiko)
 豊橋技術科学大学・大学院工学系研究科・講師
 研究者番号: 40222393

(2) 研究分担者

穂積 直裕 (HOZUMI Naohiro)
 豊橋技術科学大学・国際協力センター・教授
 研究者番号: 30314090

(3) 連携研究者

福田 敦夫 (FUKUDA Atsuo)
 浜松医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 50254272