

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月 5日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700480

研究課題名（和文） 大脳皮質における異種グリア細胞間連関の解析

研究課題名（英文） Analysis of interaction between glial cells in the cerebral cortex

研究代表者

加藤 剛 (KATO GO)

生理学研究所・発達生理学研究室・助教

研究者番号：20586705

研究成果の概要（和文）：

近年、神経細胞とアストロサイト、あるいは神経細胞とミクログリア細胞間において連関があることが明らかとなっている。そこで異種グリア細胞間連関を解析する足がかりとして、まずミクログリア細胞と神経細胞の連関関係の観察を行った。神経活動依存的なミクログリア細胞の形態的、機能的応答を観察する目的で大脳皮質錐体細胞に活動電位を頻回発生させた際の軸索の容積変化とこの軸索周囲のミクログリア突起の挙動変化を観察した。

研究成果の概要（英文）：

Recently, it has been reported that the interactions between astrocyte and neurons or microglia and neurons play important roles in the efficacy of neurotransmission or elaboration of neuronal circuits. Therefore, at first, we aim to study neuronal-activity-dependent interactions between microglia and neurons. Repetitive action potentials evoked in pyramidal neurons elicited an axonal swelling that could be accompanied by a sustained (>10min) and large (>20mV) depolarization with likely pathological consequences. Microglial processes migrated to these swollen axons in a mechanism involving both ATP and glutamate releases via volume-activated anion channels. This migration to swollen axons was followed by intensive microglial wrapping that could strip off the distorted axon compartment and subsequently rapidly restore the resting membrane potential and rescue neurons from depolarization induced death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

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：神経 活動電位 ミクログリア細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ミクログリア細胞が樹状突起スパインや軸索終末部などに対し、神経活動や経験依存的に接触し、その活動をモニターしている可能性が明らかになった(Wake et al., 2009, Tremblay et al., 2010)。しかしながら、このようなミクログリアの挙動を制御するメ

カニズムや接触により修飾される神経機能に関しては未だ詳細不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

異種グリア細胞間連関を解析する前段階としてまず、神経細胞とミクログリア細胞の連関を解析し、その知見を踏まえてグリア-グ

リア細胞間連関の解析につなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ミクログリア細胞が蛍光標識されている Iba-1 eGFP マウス-大脳皮質スライス標本の S1 領域からシャドウパッチクランプ法 (Kitamura et al., 2008) を用いて記録及び経電極的蛍光色素注入を行い、2 光子顕微鏡下で神経及びその周辺部に存在するミクログリア突起 (図 1) の経時的挙動変化を観察した。

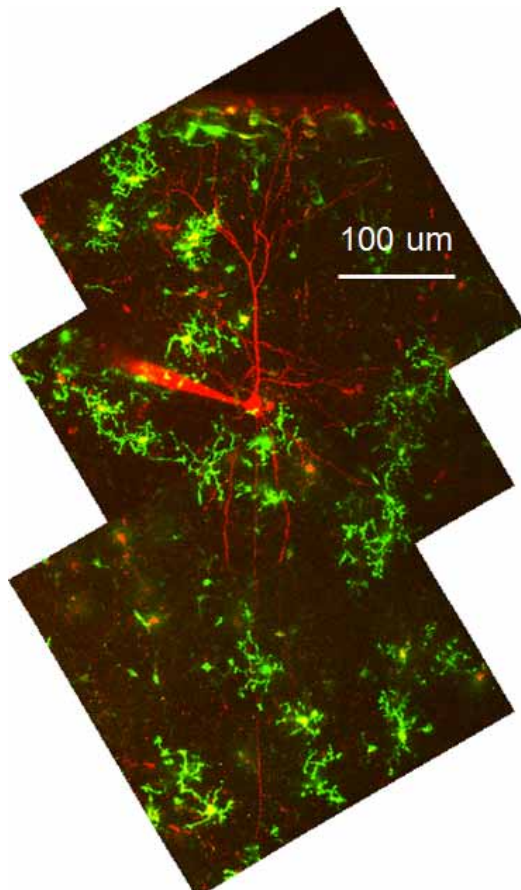


図 1: 2 光子顕微鏡下で観察される錐体細胞 (alexa-594 赤色) 及びその周囲のミクログリア細胞 (GFP 緑色)

### 4. 研究成果

大脳皮質 2/3 層の錐体細胞に活動電位を頻回発生させると (10 Hz, 0.33-9 分)、刺激の持続時間依存的な軸索の腫脹が生じ、これに相関する形でミクログリア細胞突起の軸索周辺領域への侵入が認められた (図 2)。またこのような走化性には、容量依存性陰イオンチャネルより放出される ATP 及びグルタミン酸が直接的または間接的に誘因物質として関与している可能性が考えられた。また上記と同様の現象は樹状突起やその周辺部位では生じなかった (図 3)。

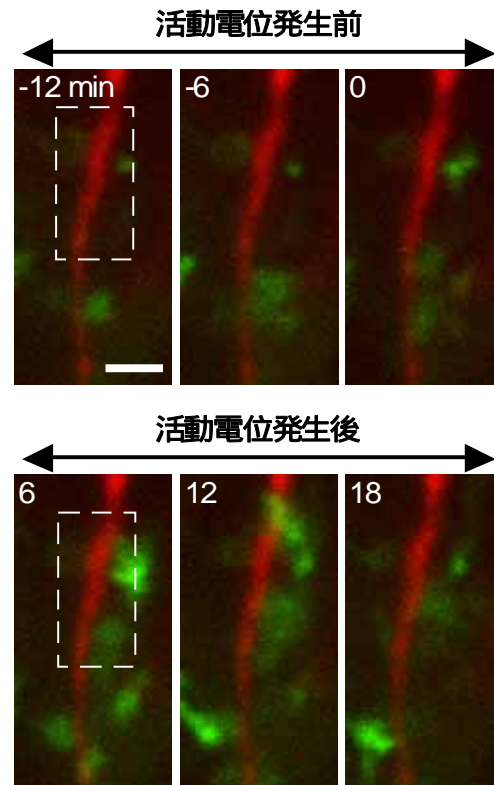


図 2: 頻回活動電位発生前後の軸索周辺領域のミクログリアの挙動変化のタイムラプスイメージ (右上の数値は分)

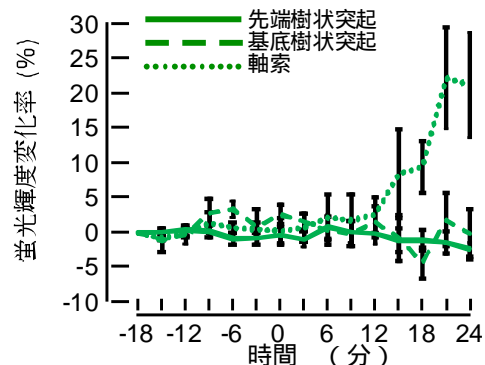
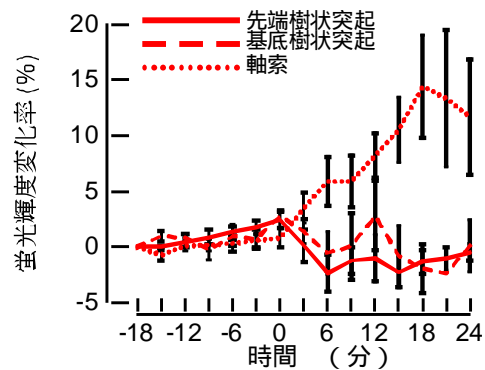


図 3 上: 軸索及び樹状突起領域における蛍光輝度変化率。下: 軸索周辺及び樹状突起周辺領域における蛍光輝度変化率

活動電位を6分間頻回発生させた際に、25% (4/16)の錐体細胞で持続的 (>10分)かつ比較的大きな脱分極 (>20 mV)を伴う、軸索の大きなネクロシス様の腫脹が認められた。ミクログリア細胞の突起はこのような腫脹に伴い軸索へと伸展するが、その際にネクロシス様変化を生じた部位への集中的な接触や(図4)貪食(図5)を行いその結果錐体細胞膜電位を過分極させ静止膜電位付近まで誘導する現象が認められた。

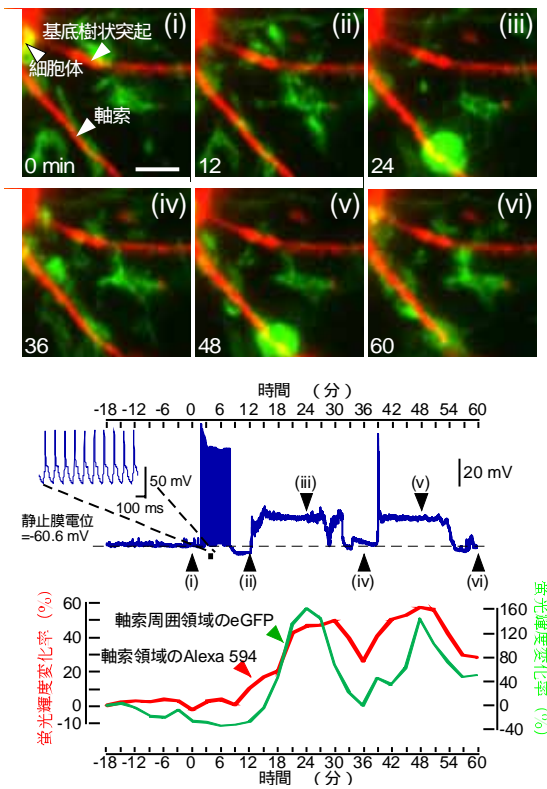


図4：上(画像)：活動電位発生後にミクログリア突起(緑色)は軸索へ2回にわたり接触(24、48分)。下(膜電位、軸索及び軸索周辺領域における経時的蛍光輝度変化率)：軸索の腫脹に伴い、ミクログリア突起の接触による軸索周辺領域での蛍光輝度上昇が認められこの接触の後に細胞体で上昇した病的脱分極は再分極へ誘導された。

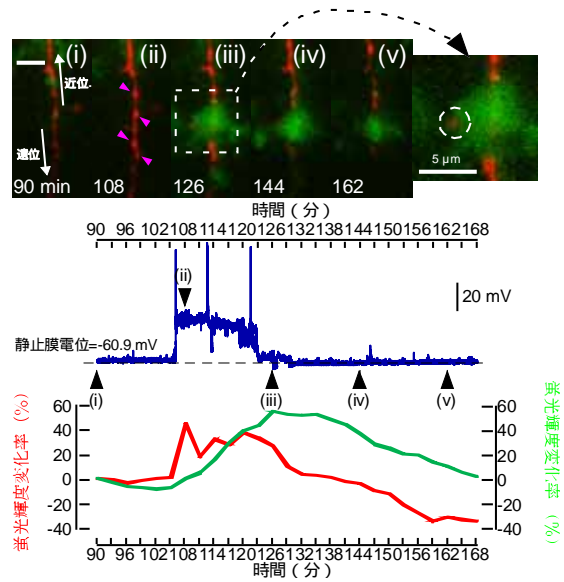


図5：上(画像)：活動電位発生後に軸索はネクロシス様の変化を来しミクログリア突起により貪食された。下(膜電位、軸索及び軸索周辺領域における経時的蛍光輝度変化率)：軸索の腫脹に伴い、ミクログリア細胞突起の集積および貪食が誘導され、貪食された結果、軸索遠位部位は消失したが、細胞体の膜電位において再分極が誘導された。細胞体は、ネクロシス様の変化に陥った軸索の除去を受けてレスキューされたと考えられた。

また容量依存性陰イオンチャンネルの阻害によりマイクログリア細胞突起の軸索への接触の減少が認められ、過活動後の膜電位の上昇の持続により錐体細胞が細胞死に至る比率が増加した。これらの観察結果から、神経細胞の過活動に伴うマイクログリア細胞突起の軸索特異的な接触や貪食は、神経細胞の細胞体に対して傷害性ではなくむしろ保護的に働くことが示唆された(図6)。

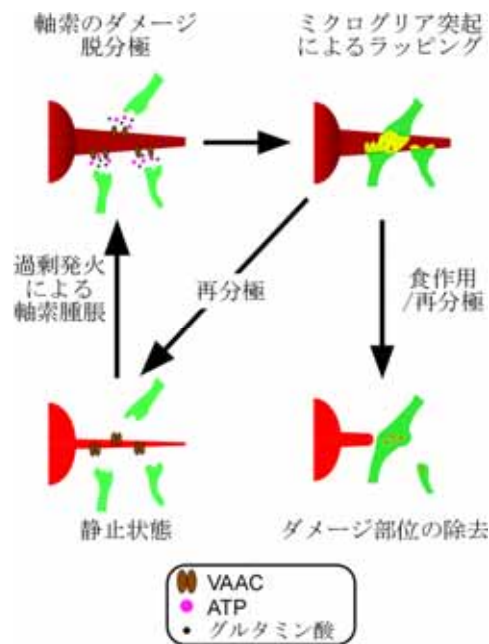


図6 活動電位過剰発生時の軸索とマイクログリアの挙動。マイクログリア細胞突起の接触や貪食により細胞体の膜電位は再分極が誘導され静止膜電位に復帰する。

## 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)

[学会発表](計2件)

### 1. 加藤 剛

活動電位発生に伴うマイクログリア細胞突起の軸索への介入 (自然科学研究機構プロジェクト 合同シンポジウム 「脳神経情報の階層的研究」「機能生命科学におけるゆらぎと決定」 2013年3月5日・岡崎 生理学研究所)

### 2. 加藤剛、石川達也、川本恭兵、Andrew Moorhouse、鍋倉淳一

Microglia respond to activity-induced axonal swelling to rescue neurons from irreversible damage. (CREST ミーティング 脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出 2013年3月1日・東京 ベルサール神保町)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

加藤 剛 (KATO GO)

生理学研究所・発達生理学研究室・助教

研究者番号：20586705

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者