

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870256

研究課題名(和文) 大脳皮質アストロサイトCa²⁺オシレーションの発達期脳内環境変化への対応研究課題名(英文) Ca²⁺ oscillation in cortical astrocytes influence on brain development

研究代表者

武藤 弘樹 (Mutoh, Hiroki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60443040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞とグリア細胞の間に存在する相互情報伝達機能は、脳機能発現または脳の発達過程に関与すると報告されているが、その詳細は明らかにされていない。本研究では、グリア細胞の一種であるアストロサイトの活動を周期的な細胞内Ca変動を観察することで、脳の発達過程におけるアストロサイトの機能的役割を調べた。大脳皮質の発達に伴いアストロサイトの細胞内Ca変動の頻度は増加する傾向にあった。現在、アストロサイトの周期的な細胞内Ca変動がどのように制御され脳の発達に関与しているのか詳細なメカニズムの解明を行っている。

研究成果の概要(英文)：The interactions between neurons and glial cells have physiological importance in the brain function and development. However, it has not been well elucidated. In this study, we investigated a role of astrocyte, major type of glial cells in the central nervous system, in brain development by monitoring rhythmic fluctuations in the concentration of intracellular calcium in association with spontaneous, commonly referred to as calcium oscillation. It has turned out that calcium oscillation in astrocytes tended to increase the frequency with the cerebrocortical development. Currently, it still continues to be accumulating and analyzing calcium oscillation in astrocytes from various ages of mice with a view to understanding control mechanism of calcium oscillation and its influence on brain development.

研究分野：神経科学

キーワード：astrocyte calcium imaging cortical development

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の自発的な活動や神経伝達物質・成長因子などの放出が脳の情報処理や発達過程において中心的な役割を担っていると考えられてきた。最近の研究によって神経細胞とグリア細胞の間に相互情報伝達機能が存在し、脳機能発現に新たな要素が示唆され始めてきた。特に、グリア細胞の一種であるアストロサイトはグリオトランスミッターとしてグルタミン酸・GABA・ATPなどを放出して神経細胞の活動や可塑性を調節し、また、神経細胞の軸索伸長などに関与していることが知られている。

アストロサイトは、電氣的に非興奮性細胞であり神経細胞のような活動電位を生じないが、細胞外に放出された神経伝達物質などによる脳内環境の変化を感知し細胞内 Ca^{2+} を変動させることにより脳機能発現に関与している。この細胞内 Ca^{2+} シグナルやオシレーションは、 Ca^{2+} をセカンドメッセンジャーとした様々な細胞内情報伝達機構や遺伝子発現の制御に関与しており神経細胞でも重要なメカニズムである。アストロサイトの脳内での役割としては、細胞外イオンや神経伝達物質の濃度を調節し、神経が活動する環境を整えていると考えられている。このアストロサイトの周期的な細胞内 Ca^{2+} 変動が脳機能発現や発達に伴う脳内環境へ及ぼす影響はいまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

近年、神経細胞とグリア細胞の間に相互情報伝達機能が存在し、グリア細胞が支持細胞としての機能だけではなく脳機能発現や発達に関与することが示唆されている。特に、アストロサイトは細胞内 Ca^{2+} シグナルによってグリオトランスミッターを放出し神経細胞の制御を行い、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} を人為的に除去することで周囲の神経細胞の活動を抑制する。また神経突起成長に必要な因子も細胞内 Ca^{2+} 依存的に制御することが報告されている。

アストロサイトには神経活動に依存しない自発的な Ca^{2+} オシレーションも様々な脳部位で報告されているが、その生理的意義や脳の発達過程における役割など詳細はいまだ解明されていない。本研究は、大脳皮質の発達期におけるアストロサイトの自発的な Ca^{2+} オシレーションを制御するメカニズムと脳発達過程との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

1. マウス大脳皮質のアストロサイト Ca^{2+} オシレーションが脳の発達に伴いどのような変化をするのか、様々な週齢での Ca^{2+} オシレーションを記録し、頻度・大きさ・同期性など網羅的解析を行い、それぞれの発達段階における特徴を解明する。
2. 安定したアストロサイト Ca^{2+} オシレーションを記録するため、さらにin vivoでの Ca^{2+} オシレーションの記録も想定に入れ、アストロサイト特異的プロモーターにより発現が制御されるGCaMP6配列をpiggyBac transposon systemに組み込んだ発現ベクターを作成し、子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行う。この手法は、成熟したマウスにのみ発現ベクターを導入することができるウイルスシステムと異なり、生後直後の発達段階にある大脳皮質のアストロサイトから Ca^{2+} オシレーションを記録することができる。
3. Ca^{2+} オシレーションをコントロールする因子を明らかにした後、その因子の発現を抑制するshort hairpin RNA発現ベクターを作成し、子宮内電気穿孔法によりアストロサイトへ遺伝子導入することで Ca^{2+} オシレーションの変化を確認し、さらに大脳皮質の層構造や発達に異常などがみられるのか形態学的観察を行い評価する。
4. アストロサイト特異的な発現ベクターの作成と並行して、カルシウム感受性蛍光指示薬(Fluo-4 AM, Oregon Green BAPTA-1 AM)とアストロサイト特異的に取り込まれるsulforhodamine 101 (SR 101)の同時染色を行い、発生段階にある大脳皮質アストロサイトの Ca^{2+} オシレーションを記録・解析する。

4. 研究成果

マウス大脳皮質アストロサイトの活動を細胞内 Ca^{2+} 変動として記録するため、京都大学 橋田充 教授よりpiggyBac transposon systemを機能的発現させるためのベクター、埼玉大学 中井淳一 教授よりGCaMP6, 8とRCaMP1.01, 1.07ベクター(カルシウム感受性蛍光タンパク質)、生理学研究所 池田一裕 教授よりmouse GFAPプロモーターをご供与して頂き、アストロサイト特異的にGCaMP6を発現させるベクターの作製を行った。作製

したベクターは、子宮内電気穿孔法を用いマウス大脳皮質アストロサイトへ導入し、生後に GCaMP6 のタンパク質発現レベルを確認したところ、本研究を効率的に遂行する発現レベルに至らなかった。そこで、発現レベルを向上させるため市販の piggyBac transposon system ベクターを購入し、再度ベクターの作製を試みたが、それでも十分な発現レベルに至らなかった。

次に発現ベクターの改良と並行して、カルシウム感受性蛍光色素 Fluo-4 AM による大脳皮質アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} を観察した。Fluo-4 AM は細胞種非特異的に取り込まれるため、アストロサイト特異的に取り込まれることが報告されている SR 101 を使用し、Fluo-4 と SR 101 の両方が取り込まれたアストロサイトより 2 光子顕微鏡 Ca^{2+} イメージングを行った。また、2 光子顕微鏡の特性により一波長 (900 nm) を励起光にすることで、Fluo-4 と SR 101 の同時記録を行った。この Fluo-4 による染色方法を異なる週齢 (生後 10~30 日) より作製した急性脳スライス標本に用い大脳皮質アストロサイトの Ca^{2+} オシレーションを解析したところ、 Ca^{2+} オシレーションの頻度が発達に伴い変化する可能性が示唆された。

現在、様々な週齢マウスの大脳皮質アストロサイトから Ca^{2+} オシレーションを記録し、詳細を解析している。また、ベクターの改良として GFAP プロモーターの軽量化として gfaABC1D や GAT2 プロモーターを組み込んだ発現ベクターやアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作製なども行っている。

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 6 件)

1. Kakizawa, K., Watanabe, M., Mutoh, H., Okawa, Y., Yamashita, M., Itoi, K., Suda, T., Oki, Y., Fukuda, A. A novel GABA - mediated corticotropin - releasing hormone secretory mechanism in the median eminence. *Science Advances*. 査読有. 2(8):e1501723. 2016. DOI: 10.1126/sciadv.1501723
2. Mutoh, H., Mishina, Y., Gallero-Salas, Y., Knöpfel, T. Comparative performance of a genetically-encoded voltage indicator and a blue voltage sensitive dye for large scale cortical voltage imaging. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 査読有. 9:147. 2015. DOI: 10.3389/fncel.2015.00147
3. Chang Liao, ML., de Boer, TP., Mutoh, H., Raad, N., Richter, C., Wagner, E., Downie, BR., Unsöld, B., Arooj, I., Streckfuss-Bömeke, K., Döker, S., Luther, S., Guan, K., Wagner, S., Lehnart, SE., Maier, LS., Stühmer, W., Wettwer, E., van Veen, T., Morlock, MM., Knöpfel, T., Zimmermann, WH. Sensing cardiac electrical activity with a cardiac myocyte-targeted optogenetic voltage indicator. *Circulation Research*. 査読有. 117(5):401-412. 2015. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.306143
4. Akemann, W., Song, C., Mutoh, H., Knöpfel, T. Route to genetically targeted optical electrophysiology: development and application of voltage-sensitive fluorescent proteins. *Neurophotonics*. 査読有. 2(2). 2015. (pii: 021008) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26082930>
5. Scott, G., Fagerholm, ED., Mutoh, H., Leech, R., Sharp, DJ., Shew, WL, Knöpfel, T. Voltage imaging of waking mouse cortex reveals emergence of critical neuronal dynamics. *Journal of Neuroscience*. 査読有. 34(50):16611-16620. 2014. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3473-14.2014
6. Mishina, Y., Mutoh, H., Song, C., Knöpfel, T. Exploration of genetically encoded voltage indicators based on a chimeric voltage sensing domain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 査読有. 7:78. 2014. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00078

〔図書〕(計 1件)

1. Akeman, W., Mutoh, H., Knöpfel, T.
Springer. Optical Imaging of
Neocortical Dynamics. Fluorescent
indicators for functional optical
imaing. 2014. Pages: 53-72. ISBN:
978-1-62703-784-6 (Print)
978-1-62703-785-3 (Online)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武藤 弘樹 (Mutoh, Hiroki)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号： 60443040

(2)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