

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870825

研究課題名（和文）発達期海馬周辺皮質における同期活動の解析

研究課題名（英文）Analysis of synchronized spontaneous activity in developing hippocampus

研究代表者

稲田 浩之（Inada, Hiroyuki）

生理学研究所・発達生理学研究室・特任助教

研究者番号：80613702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000 円

研究成果の概要（和文）：発達期の神経細胞集団はしばしば自発的な同期活動を示すことが知られている。この活動は軸索伸長やシナプス形成、シナプス除去（elimination）といった、神経回路の編成過程に重要な役割を持つことが判っている。本研究では、発達期の海馬周辺皮質のリズミックな同期活動を制御するメカニズムに着目し、特にグリア細胞の一種であるアストロサイトが果たす役割について検討した。アストロサイトの活動を抑制すると海馬神経細胞の自発活動の同期性が有意に減少したことから、発達期のアストロサイトが神経細胞の活動を制御することで神経回路形成に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Neuronal population shows highly synchronized spontaneous activity during development. This spontaneous activity is thought to contribute to the maturation of neural circuits, axonal elongation, synapse formation and elimination. In addition, it is suggested that astrocytes contribute to. In this study, the regulatory mechanism of spontaneous activity of hippocampal circuits during development was examined focusing on the functional role of astrocytes.

研究分野：神経科学

キーワード：発達期同期活動 海馬 2光子顕微鏡 カルシウムイメージング

1 . 研究開始当初の背景

動物には自分が居る場所を周囲との位置関係から推測する空間表現と呼ばれる能力がある。空間表現には、自分の位置と向いている方向、周辺の視覚的目印からの距離に関する情報が必要である。空間表現の神経基盤の有力な候補が海馬の“場所細胞 (place cell) ”である。この細胞は探索行動中の動物が特定の場所にきた時にのみ発火頻度が変わることから、動物の位置を表現するのに関わっていると考えられている。この空間表現を可能とするネットワークの機能的・構造的結合はどのようなメカニズムで形成されるのだろうか？ラットを用いた近年の研究において場所細胞やグリッド細胞などの空間表現の神経基盤が生後約2週間から3週間以内の発達初期において既に形成されている事が相次いで報告された。これは十分な視覚入力が必要とせず、内因性のメカニズムによって空間表現に必要なネットワークが形成されていることを強く示唆している。その内因性メカニズムの候補として申請者は発達期の自発的な同期活動に着目した。発達期の周期性同期ネットワーク活動は網膜や脊髄、小脳、大脳皮質など多くの脳領域で報告されている。これらの活動に共通してみられる特徴として、感覚情報が入力される前に生じる自発的な神経活動であることと、多数の神経細胞集団が同期した活動であることが挙げられる。さらに、こうした活動が軸索投射やシナプス形成、シナプスの刈り込み制御することが示唆されている。こうした報告は、成熟後に機能連携する神経細胞集団が未熟期には自発的な同期活動を惹起し、

正常な成熟神経回路を形成するのに重要であることを示唆している。一方で、グリア細胞の一種であるアストロサイトが発達期において同期活動を示すこと、アストロサイトの活動が神経回路形成に寄与していることが、近年相次いで報告されている。特に生後1週齢前後の齧歯類海馬では、アストロサイトは微細な突起を積極的に伸展・退縮させ、周囲の神経・グリア構造と活発に接触していることが知られている。以上の背景から、空間表現の神経基盤である海馬周辺皮質の機能的・構造的結合が発達期において正常に形成されるメカニズムとして、発達期神経回路に特徴的な神経細胞の自発的な同期活動とアストロサイトの関連に着目した。

2 . 研究の目的

本研究は発達期海馬周辺皮質の自発的な同期活動に着目し、イメージング技術と遺伝子改変マウスを用いてそのメカニズムを検討した。特に神経細胞の自発的な同期活動に対してアストロサイトが果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

多数の神経細胞集団の活動を同時に測定する方法としてカルシウムイメージングを行った。生後0日齢から2日齢のマウスにイソフルラン麻酔を行い、シナプシンプロモーターの下流にカルシウム感受性蛍光タンパク質であるGCaMP6fを組み込んだアデノ随伴ウイルスを海馬周辺皮質に注入した後、マウスをケージに戻しておよそ1週間後に海馬周辺皮質を含む急性スライス標本作製し

た。CA1 および CA3 を含む広範な海馬周辺皮質の活動を同時に測定する場合は冷却 CCD カメラおよび水銀ランプを利用し、1 細胞レベルの解像度で複数の神経細胞の活動を記録する場合は 2 光子顕微鏡とフェムト秒チタンサファイアレーザー (Mai Tai DeepSee) を用いてカルシウムイメージングを行った。また、実験によっては急性スライス標本を作製した後に、カルシウム感受性蛍光色素である Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1 AM) を負荷し、さらに神経細胞とアストロサイトを区別するために、アストロサイトマーカーである赤色の蛍光色素 Sulforhodamine101 を処置した。また、アストロサイトの活動が神経細胞の同期活動に与える影響を検討するために、アストロサイトの細胞内カルシウム濃度上昇が抑制されている遺伝子改変マウス、IP₃R2KO マウスを用いて、野生型マウスと自発活動の定量的なパラメータ (頻度、振幅、同期性等) を比較した。

4 . 研究成果

アデノ随伴ウイルスと 2 光子顕微鏡によるカルシウムイメージング法を用いて野生型マウスの海馬周辺皮質における神経活動を検討したところ、生後 6 日齢から 10 日齢にかけておよそ 0.1 Hz の頻度で周期的かつ自発的なカルシウム応答が測定された。この活動は CA3 および CA1 領域で認められ、60 ~ 80% の神経細胞で同期的に発生していることが明らかとなった。さらに灌流液中に GABA_A 受容体の阻害剤である bicuculline を投与することで消失したことから、この同期活動は GABA の興奮性作用によって制御さ

れていることが示唆された。発達期の海馬においては Giant Depolarizing Potentials (GDPs) と呼ばれる自発的な脱分極が生じることが知られており、興奮性の GABA 作用の他にもグルタミン酸や ATP、D-serine によって発生頻度が変化することが報告されている。そこでグリア伝達物質としてこれらの分子を放出することが知られているアストロサイトに着目した。GDPs の制御におけるアストロサイトの役割を検討するために、アストロサイトの細胞内カルシウム濃度上昇を抑制された遺伝子改変マウス (IP₃R2KO マウス) を用いて、海馬神経細胞のカルシウムイメージングを行った。その結果、個々の神経細胞で認められるカルシウム応答の振幅に変化はなかったが、発生頻度と同期性は野生型に比べて有意に減少していた。この結果は、発達期海馬のアストロサイトが神経細胞集団の自発的な同期活動を制御していることを示唆している。今後は野生型マウスにおいてアストロサイトと神経細胞の活動を同時に測定し、両者の活動のタイミングに相関が認められるかを検討する。

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)

〔 雑誌論文 〕 (計 3 件)

1 . Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman MA, Nabekura J.

Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from

Excitotoxicity.

eNeuro (in press)

査読有り

2 . Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S, Nabekura J.

Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain.

J Clin Invest. 2016;126(5):1983-97.

査読有り

Doi: 10.1172/JCI82859. Epub 2016

3 . Goto K, Kawahara I, Inada H, Misawa H, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M.

Activation of 5-HT4 receptors facilitates neurogenesis from transplanted neural stem cells in the anastomotic ileum.

J Physiol Sci. 2016 66(1):67-76.

査読有り

Doi: 10.1007/s12576-015-0396-1. Epub 2015

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

稲田 浩之 (Inada, Hiroyuki)

生理学研究所・発達生理学研究室・特任助教

研究者番号: 80613702

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: