

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08328

研究課題名（和文）アストロサイトの密度変化とシナプス投射位置および情報伝達との相関解析

研究課題名（英文）The fundamental relationship between the density of astrocytes and synaptic transmission

研究代表者

桂林 秀太郎（Katsurabayashi, Shutaro）

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：50435145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳における主要なグリア細胞であるアストロサイトは、シナプスの形成と成熟に関与しており、ニューロン間の持続可能なシナプス伝達に貢献しています。本研究により、アストロサイトの密度が高いほど、神経細胞（ニューロン）における興奮性シナプス伝達は高くなることが分かりました。また、形態学的に同定されたグルタミン酸作動性シナプスの全体的な数は変化しませんでした。また、伝達物質を放出できる機能的シナプス（アクティブシナプス）の割合は増加しました。つまり、ニューロンを取り巻くアストロサイトの高密度化は、シナプス前の非サイレンシングを介して興奮性シナプス伝達を強化することが明らかとなりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳高次機能を有する高等動物ほど、脳内のグリア細胞の数が多いといわれています。その多数を占めるアストロサイトが欠如すると、神経回路の架け橋である『シナプス』の数は激減し、伝達物質放出機能も低下します。研究代表者はこれまでに、アストロサイトの液性因子は重要であるが、アストロサイトの占有面積とシナプス機能には相関関係はないことを報告しました。

この成果を更に発展させるため、本研究ではアストロサイトの“密度”に着目し、アストロサイトとニューロンの混成比の違いによるシナプス機能（情報伝達）とシナプス形態（形成秩序）を解析し、アストロサイト密度と高次機能の相関関係を明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：The astrocyte, a primary glial cell type, is involved in the formation and maturation of synapses, and thus contributes to sustainable synaptic transmission between neurons. Given that the animals in the higher phylogenetic tree have brains with a higher density of glial cells for neurons, there is a possibility that the relative astrocytic density directly influences synaptic transmission. Here we addressed it by using a primary culture preparation and patch-clamp electrophysiology. Neurons with a higher astrocytic density showed a higher excitatory synaptic transmission than that of neurons with a lower astrocytic density. The number of morphologically identified glutamatergic synapses was unchanged, but the proportion of functional ones was increased, indicating a lower ratio of presynaptically silent synapses. Taken together, the higher astrocytic density enhanced excitatory synaptic transmission by increasing the fraction of functional synapses through presynaptic un-silencing.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス伝達 グリア細胞 アストロサイト サイレントシナプス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳の神経回路は神経細胞（ニューロン）とグリア細胞を中心に構成されている。さらにグリア細胞は、アストロサイトとミクログリア、オリゴデンドロサイトの3種類に分類される。そのグリア細胞の多くを占めるアストロサイトの構造は高等動物ほど複雑であり、動物種によって細胞容積が異なる。興味深いことに、高次脳機能を有する高等動物ほどニューロン1個に対するアストロサイトの数が多いことも近年明らかになった（Oberheim et al., *TRENDS Neuroscience*, 2006）。また、*in vitro*系においてアストロサイトを除去すると、神経回路の架け橋であるシナプスの数は激減し、シナプス伝達が低下することも報告されている（Hama et al., *Neuron*, 2004）。

シナプス機能は、学習や記憶などに直結すると考えられている。正に『アストロサイト環境脳機能』であり、アストロサイトはシナプス機能を制御する極めて重要な司令塔として位置づけられる。

2. 研究の目的

アストロサイトがシナプス機能を制御することは既に分かっている。しかし、アストロサイトの密度が変化した場合のシナプス動態は、未知な部分が多い。例えば、1)ニューロンがシナプスを投射する場所（位置）は影響を受けるのか、2)個々のシナプスにおける開口放出メカニズムの変化はどうなっているのか、3)その生理的意義は何か、などである。

本研究で用いた培養標本は、従来の神経生理学研究で用いられる脳スライス標本や分散培養標本とも異なる、全く新しいコンセプトに基づいた再構築型単一ニューロン培養モデルである。この特徴を活かした解析的研究の成果を基に、共存するアストロサイトの密度環境とシナプス動態の相関関係を理論的にモデル化することによって、アストロサイトの密度依存的な環境変化を基軸として高次脳機能の獲得原理を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 自己にシナプスを投射する海馬オータプス初代培養標本の作製

生後0日齢ICRマウスから大脳皮質を摘出し、ニューロンの足場となるグリア細胞：アストロサイトを培養した。アストロサイトの培養法は、従来の手順に準拠した。次に、生後0日齢ICRマウスの海馬ニューロンと共培養した。単一ニューロンは、自己にシナプスを形成しながら与えられた領域内で成長するので、シナプス形成が安定する2週間をニューロンの培養期間とした。この単一ニューロン標本（オータプス培養）は他ニューロンからのシナプス入力がかく無いので、単一ニューロンが有するシナプス動態や形態を詳細に解析できる。実験を行う直前にドット状の培養エリアに含まれるアストロサイトを数え、低密度群（アストロサイト数1-10）および高密度（アストロサイト数20-30）に分類した。

(2) パッチクランプ法を用いたシナプス伝達の解析

海馬CA1単一ニューロンを共培養し、構成的アストロサイト環境を制御した時のシナプス伝達変化を、パッチクランプ法にてリアルタイムに解析した。具体的には、パッチしたオータプスニューロンから、神経伝達物質放出量（evoked EPSC amplitude）、放出確率（Pvr）、自発的開口放出量（mEPSC amplitude）、自発的開口放出頻度（mEPSC frequency）、開口放出即時可能シナプス方法数（No. of readily releasable pool）を求めた。

(3) 蛍光イメージング法によるシナプス数の解析

オータプスニューロンの樹状突起はMAP2抗体、興奮性シナプスはVGLUT1抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡にて三次元（z-stack）解析した。シナプス数は、VGLUT1イメージをガウシアンブロー処理し、ノイズ除去してS/N比を疑似的に増加させたイメージから定量した。

(4) 蛍光イメージング法によるアクティブシナプスとサイレントシナプスの構成比の解析

シナプス小胞にFM1-43®を取り込ませ、シナプス小胞の開口放出可能なアクティブシナプスを蛍光観察した。そして連続してホルマリン固定し、シナプスをVGLUT1抗体、樹状突起をMAP2抗体で免疫染色を行った。

FM1-43®は、開口放出可能なシナプスのみを個々に緑色で可視化できる。この特性を活用し、興奮性シナプス全体を染めるVGLUT1抗体（赤色で染色）との二重染色によって、開口放出可能な“アクティブシナプス”は黄色、開口放出できない“プレサイレントシナプス”は赤色で識別した。

4. 研究成果

アストロサイトが高密度になるほど、単一ニューロンにおける興奮性シナプス後電流は大きかった。単一ニューロンあたりの即時開口放出可能シナプス小胞のサイズと自発的シナプス伝達の頻度も、アストロサイト高密度群のほうが大きかった。形態学的に同定されたグルタミン酸作動性シナプスの数は両者で有意な差は認めなかったが、伝達物質を放出できる興奮性シナプス（アクティブシナプス）の比率はアストロサイト高密度群では増加しており、逆にシナプス前サイレントシナプスの比率は低い結果であった。

本研究成果の詳細は、BioRxiv (バイオアーカイヴ) にプレプリントとして掲載した。下記 URL を参照されたい。

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.20.000166v1.full>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Egashira N, Kubota N, Goto Y, Watanabe T, Kubota K, Katsurabayashi S, Iwasaki K.	4. 巻 165
2. 論文標題 The antipsychotic trifluoperazine reduces marble-burying behavior in mice via D2 and 5-HT2A receptors: Implications for obsessive-compulsive disorder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacol Biochem Behav	6. 最初と最後の頁 9-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbb.2017.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nogami-Hara A, Nagao M, Takasaki K, Egashira N, Fujikawa R, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Hatip FB, Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K.	4. 巻 214
2. 論文標題 The Japanese Angelica acutiloba root and yokukansan increase hippocampal acetylcholine level, prevent apoptosis and improve memory in a rat model of repeated cerebral ischemia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Ethnopharmacol	6. 最初と最後の頁 190-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jep.2017.12.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawano H, Oyabu K, Yamamoto H, Eto K, Adaniya Y, Kubota K, Watanabe T, Hirano-Iwata A, Nabekura J, Katsurabayashi S, Iwasaki K.	4. 巻 143
2. 論文標題 Astrocytes with previous chronic exposure to amyloid β -peptide fragment 1-40 suppress excitatory synaptic transmission	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurochem	6. 最初と最後の頁 624-634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kubota K, Fukue H, Sato H, Hashimoto K, Fujikane A, Moriyama H, Watanabe T, Katsurabayashi S, Kainuma M, Iwasaki K.	4. 巻 21
2. 論文標題 The Traditional Japanese Herbal Medicine Hachimijiogan Elicits Neurite Outgrowth Effects in PC12 Cells and Improves Cognitive in AD Model Rats via Phosphorylation of CREB.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2017.00850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Nagao, Satoshi Yamano, Naoki Imagawa, Kentaro Igami, Toshitsugu Miyazaki, Hisatomi Ito, Takuya Watanabe, Kaori Kubota, Shutaro Katsurabayashi, Katsunori Iwasaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Effect of Lactobacillus paracasei A221 fermented ginseng on impaired spatial memory in a rat model with cerebral ischemia and amyloid injection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 96-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tkm2.1220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohei Oyabu, Hiroki Kiyota, Kaori Kubota, Takuya Watanabe, Shutaro Katsurabayashi, Katsunori Iwasaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Hippocampal neurons in direct contact with astrocytes exposed to amyloid 25-35 exhibit reduced excitatory synaptic transmission	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibror.2019.07.1719	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 窪田香織, 桂林秀太郎	4. 巻 24
2. 論文標題 神経突起萎縮やシナプス減少を呈する新規神経変性モデル培養標本の構築	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Research	6. 最初と最後の頁 87-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iba H, Watanabe T, Matsuzawa K, Saimiya M, Tanaka M, Moriyama H, Kubota K, Katsurabayashi S, Iwasaki K	4. 巻 42
2. 論文標題 Effect of yokukansan and yokukansankachimpinange on aggressive behavior, 5-HT receptors and arginine vasopressin expression in social isolation-reared mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 2009-2015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda T, Irie T, Katsurabayashi S, Hayashi Y, Nagai T, Hamazaki N, Adefuin AMD, Miura F, Ito T, Kimura H, Shirahige K, Takeda T, Iwasaki K, Imamura T, Nakashima K.	4. 巻 101 (3)
2. 論文標題 Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 472-485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2018.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura R, Yamamoto H, Hayakawa T, Katsurabayashi S, Niwano M, Hirano-Iwata A.	4. 巻 8 (1)
2. 論文標題 Dependence and Homeostasis of Membrane Impedance on Cell Morphology in Cultured Hippocampal Neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28232-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 桂林 秀太郎
2. 発表標題 構成論的に神経ネットワークを作る ~人工脳を作るための細胞レシピ~
3. 学会等名 第20回ブレインサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyabu K, Kiyota H, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K
2. 発表標題 Excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons is reduced by direct contact with astrocytes exposed to amyloid 25-35
3. 学会等名 The 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyabu K, Kiyota H, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K
2. 発表標題 The direct contact of astrocytes to neuron is critical for lowering excitatory synaptic transmission after the exposure of amyloid β -protein 25-35 onto astrocytes
3. 学会等名 Society for Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shutaro Katsurabayashi, Kohei Oyabu, Kotomi Takeda, Kaori Kubota, Takuya Watanabe, Katsunori Iwasaki
2. 発表標題 Glial assembly for regenerative medicine and brain transplant
3. 学会等名 2nd Mini-Symposium on The Blood-Brain Barrier from Basic to Clinical Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大藪康平、武田琴水、渡辺拓也、窪田香織、桂林秀太郎、岩崎克典
2. 発表標題 アストロサイトと単一ニューンの比率変化が及ぼすシナプス伝達変化
3. 学会等名 第19回ブレインサイエンス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桂林 秀太郎、大藪 康平、武田 琴水、渡辺 拓也、窪田 香織、岩崎 克典
2. 発表標題 ニューロン/アストロサイト混成比とシナプス伝達
3. 学会等名 第27回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桂林 秀太郎
2. 発表標題 人工脳を作るための細胞レシピ～構成論的に神経ネットワークを作る試み～
3. 学会等名 福岡大学 学際シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohei Oyabu, Shutaro Katsurabayashi, Katsunori Iwasaki
2. 発表標題 Excitatory synaptic transmission is modulated by the density of surrounding astrocytes
3. 学会等名 The 7th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyabu K, Kawano H, Yamamoto H, Eto K, Adaniya Y, Kubota K, Watanabe T, Hirano-Iwata A, Nabekura J, Katsurabayashi S, Iwasaki K
2. 発表標題 Excitatory synaptic transmission is reduced by astrocytes previously exposed to amyloid peptide fragment 1-40
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oyabu K, Kiyota H, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K
2. 発表標題 Excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons is reduced by direct contact with astrocytes exposed to amyloid 25-35
3. 学会等名 The 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安谷屋友菜、河野洋幸、朝原 愛、窪田香織、渡辺拓也、桂林秀太郎、岩崎克典、廣瀬伸一
2. 発表標題 Scn1a変異マウスにおける中枢抑制性シナプスの機能解析
3. 学会等名 第70回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考