

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22240042

研究課題名(和文) シナプス再編の *in vivo* 長期観察研究課題名(英文) *in vivo* Observation of Synapse Remodeling

研究代表者

鍋倉 淳一 (NABEKURA, Junichi)

生理学研究所・発達生理学研究室・教授

研究者番号：50237583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,600,000円、(間接経費) 11,280,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経における長期シナプス再編とその制御機構について生体イメージングを主な手法として検討をおこなった結果、障害神経細胞において、ミクログリアは直接の接触により、過剰興奮による細胞障害死を抑制していること。幼若期においてミクログリアは直接接触によりシナプス形成に寄与していることが判明した。慢性疼痛モデル動物を用いて検討した結果、大脳皮質においては長期固定シナプスと可変シナプスが存在し、痛覚入力持続などの環境が変化する場合、可変シナプスがより高率に再編されることが判明した。グリア細胞は発達期や脳障害後の回復期など脳機能が大きく変化する時期の神経回路の変化に重要な役割を持っていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the synapse remodeling and its underlying mechanisms, e.g. glial contribution, mainly by using *in vivo* multiphoton microscopy. 1) glutamate could be an attractant on ly to activated microglia, 2) microglia could rescue the damaged neurons by direct contact onto the damage d site. 3) in developing cortex, microglia contribute to the generation of synapses. In addition, in the mature cortex, there are two subclasses of synapses, stable synapses with a larger head size, and unstable synapses with a smaller size in head. In case of pathological condition, such as chronic pain model, unstable synapse were preferentially eliminated and new spines were replaced with such a preexisting unstable synapses.

研究分野：総合領域

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：シナプス 再編 2光子励起顕微鏡 生体観察 グリア

1. 研究開始当初の背景

脳の発達最終段階において神経回路の再編成が観察される。発達期および障害回復期の脳機能の変化はシナプス結合の変化に伴う機能ネットワーク自体の変化に起因していることが示唆される。形態的なネットワークの変化として、発達期における余剰なシナプスの除去 (synapse elimination) が代表的な変化として挙げられる (神経筋接合部; 申請者 Science 1997, 小脳登上線維; 狩野 Mol Neurobiol. 2001)。神経細胞ネットワーク再編の生体における経時的観察は神経筋接合部などの末梢神経シナプスで20年前確立されて以降、脳へのアプローチという技術的な制約のため中枢神経での生体内経時観察は、近年の2光子励起顕微鏡によるイメージングによってようやく可能となってきた。そのため、長期神経回路再編という見知からは、神経筋接合部で得られているようなシナプス競合・除去や再生過程を凌駕する情報は圧倒的に少ない。

申請者は非線形光学系多光子励起レーザー顕微鏡による *in vivo* 2光子励起観察の技術改良を行い、マウス大脳皮質において、世界トップクラスの脳表面から1mm深部(皮質全層)の微細構造をサブミクロンレベルで観察する技術の構築を行うとともに、同じ動物で同一微細構造の2ヶ月以上の長期繰り返しイメージング技術も構築した。この2光子顕微鏡の生体応用により、中枢シナプス結合の可塑的長期変化(ターンオーバー: 消失・新生)の観察が可能となった。

2. 研究の目的

中枢神経における長期シナプス再編とその制御機構について、特にグリア細胞の関与について、生体イメージングを主な手法として検討を行う。

(1) シナプスタンオーバーの機序:

シナプス消失(除去)の動的メカニズムについては発達期神経筋接合部において神経終末のシュワン細胞による包括(Lichtman 2004)や、マクロファージの関与が示唆されている(Akasaka, 2004, Watt 2004)が、中枢シナプスでは未解決であった。グリア細胞は易活性化のため、*in vitro* 標本では生体内現象を再現することは困難であり、生体内イメージングによる観察が不可欠である。障害・正常脳においてマイクログリアによって除去された部位に再びシナプス新生が起こるのか検討する。

(2) シナプスタンオーバーの解明の検討:

同一個体で同一シナプスの繰り返し観察(1st image/2nd image)に基づいて得られたターンオーバー率は、1日間で約5%である(マウス、申請者ら Neurosci 2009, Gan 2007)。これに対し、長期間インターバル(1ヶ月間)でもターンオーバー率は10%以下である(Grutzendeler 2002, Zuo 2005)および我々の予備実験(1ヶ月; 8%)。このインターバルに依存せずにスパインおよびブートンターンオーバー率が近似である理由として、成熟動物では可変シナプスと固定シナプスの存在が考えられる。シナプスのターンオーバーが興奮性全シナプスに共通な現象であるのか、長

期安定シナプスと可塑性を担う不安定シナプスが存在するのか、慢性疼痛モデルマウスなど、シナプスタンオーバーの亢進したマウス大脳皮質において検討する。

(3) 未熟期脳においては生後2-3週目のマウス大脳皮質ではターンオーバー率が10日インターバルで70%である(Holtmaat 2005)。シナプスの急激な増加時期に係わるグリア細胞の役割について、特に、マイクログリアの関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 神経回路活動を生体で亢進・減弱させ、マイクログリアのシナプス接触回数および時間を検討する。予備実験で体温低下、感覚入力遮断で接触頻度が有意に減少している結果を得ている。

(2) 2光子観察下(大脳皮質2/3層)でIba1 GFPマウス第2/3層の錐体細胞内にパッチ電極でCaged Ca²⁺をAlexa594(赤)とともに投与する。可視下で神経細胞に脱分極通電により活動電位を発生させマイクログリア突起が神経細胞へ近づくのか、観察する。

(3) Caged グルタミン酸(DMNP-EGTA 波長2光子励起波長730nm)を利用して、シナプス以外の極局所でグルタミン酸 uncaging を行い、マイクログリア突起が同部位へ伸展するのか観察する。

(4) 幼若期マウスシナプスタンオーバー率が成熟期と比較し高いことが予測されるが幼若期への2光子顕微鏡応用の困難さから生後1-3週目での報告は非常に少ない。大脳皮質シナプスが爆発的に増大する生後1-2週目のマウス大脳皮質においてマイクログリアの除去が可能な遺伝子改変マウスをtet0システムを用いて作成する。同マウスにおいてマイクログリアとシナプス新生・除去の生体イメージングによる検討を行う。

(5) シナプス再編が亢進している慢性モデルマウスを用いて、グリア細胞、特に、シナプス新生に関与することが報告されているアストロサイトについて、アストロサイト活性を制御する手法の開発を行い、および生体への適用と生体イメージングを組み合わせて行う。

4. 研究成果

(1) マイクログリアの誘引物質の検討。

マイクログリアのシナプスへの誘引物質として、これまでATPのみが報告されている。一方で、グルタミン酸については、誘引物質として、賛否両論があるため、まず、光感受性 caged グルタミン酸をマウス大脳皮質スライス標本に適用し、2光子励起顕微鏡を用いてマイクログリア突起の近傍においてグルタミン酸の uncaging を行い、マイクログリア突起の同部位への伸展の有無を確認した。その結果、細胞体が大きくかつ突起数の少ない活性型マイクログリアはグルタミン酸への突起伸展応答が見られる一方、非活性型マイクログリア(resting microglia)はグルタミン酸応答を示さなかった。この結果から、マイクログリアは活性化状態により、グルタミン酸への応答が変化することが判明した。現在、その受容体(AMPA受容体や代謝型受容体)について、免疫組織法および免疫電子顕微鏡法を用

いて検討を加えているが、まだ明確な結果を得るのはもう少し時間が必要である。

一方、ミクログリアに GFP が発現しているマウス) 大脳皮質から作成した脳薄切片において、大脳皮質錐体細胞にパッチクランプ法を用いて電流通電を行い、過剰な脱分極を行った結果、軸索の膨張に伴う、異常な脱分極が観察され、しばしば細胞死または、軸索の異常膨張 (Bulb) が観察された。

軸索膨張により容量依存性陰イオンチャンネル (VACC) が開口し、ATP およびグルタミン酸が放出される。ミクログリアがこれらを検知し、膨張した軸索を wrapping する。ミクログリアによる wrapping 自体、またはしばしばその後に観察されるミクログリアの軸索貪食により、神経細胞の膜電位は静止膜電位へ回復した。容量依存性陰イオンチャンネルブロッカー存在下では、軸索膨張部位へのミクログリアの集積は抑制され、その結果、異常脱分極の持続、それに引き続く神経細胞死が観察された。これらの結果から、ミクログリアはこれまで数多く報告されている死滅した細胞の除去の他に、障害部位自体へのアプローチと同部位の wrapping による修復、または障害部位の除去を行い、神経細胞を過剰活動による死から保護しているという新しい機能を提示することができた。

(2) ミクログリアによるシナプス新生。

我々の先行報告 (Wake et al 2009) において、障害脳においてミクログリアはシナプスの除去にかかわることを報告して以来、発達期や障害脳におけるシナプス除去へのミクログリアの寄与に関する報告が多くなされている。一方で、未熟期にはミクログリアは活性型と類似した形態を示しており、また活性型は脳由来成長因子やトロンボスポンジンなどのシナプス形成関連因子を放出することが知られている。このため、未熟期におけるミクログリアがシナプス新生にかかわる可能性について、2 光子顕微鏡を用いて生後 1 - 2 週目のマウス大脳皮質一次感覚野におけるミクログリア動態を観察した。

生後 8 - 10 日目においてはミクログリアは大きな細胞体、少ない数の突起を有しており、いわゆる“活性型”に近い形態であることが判明した。ミクログリアと神経樹状突起との相互作用を観察すると、ミクログリアが接触すると、高頻度 (接触の約 50%) でシナプス後構造の前構造であるフィロポディアの形成が認められた。このミクログリアにより形成されるフィロポディアが実際のシナプス構造になる確率は、非接触で形成されるフィロポディアがシナプスになる確率と同等であった。

このミクログリアによるシナプス形成が長期的な神経回路形成・維持に関連する可能性について、ミクログリア特異的および時期特異的にジフテリア毒素 (DTX) を発現させる遺伝子改変マウスの作成を行った。DTX-tet0 マウスと Iba-1 tTA マウスを交配したマウス (DTX-tet0-Iba1 tTA マウス) において、生後 5 - 8 日目において母親のえさからドキシサイクリンを除外した。その結果、仔マウスの大脳皮質のミクログリアの数を半減させる

ことができた。同マウスにおいて、生後 2 週目、2 ヶ月目において、シナプス密度を検討した結果、有意に減少が認められた。形態的な数の減少に加えて、機能的な変化を検討するために、生後 2 ヶ月齢のマウスから脳薄切片を作成し、大脳皮質第 2・3 層の錐体細胞からパッチクランプ法を用いてシナプス電流の記録を行った。興奮性シナプス電流の発生 (観察) 頻度も優位に減少していたが、シナプス電流の大きさは対象群と有意差は観察されなかった。この結果から、生後 1 週目に見られるミクログリアによるシナプス新生は、単に同時期におけるシナプスタンオーバーに寄与するばかりではなく、長期的に維持されるシナプスの形成に関与している可能性が示唆される。

(3) 成熟期における長期的なシナプス可塑性と維持の観察。

成熟期におけるシナプス新生・消失、維持について、すべてのシナプスがターンオーバーに関与するのか、または、変化しやすいシナプス群が存在するのかを検討するために、脳自体には障害はないが、末梢からの入力が増進しておりシナプス再編が増進している慢性疼痛モデルマウスの大脳皮質感覚野のシナプスの長期観察を行った。正常・成熟動物では、シナプスの約 7% (シナプス後構造であるスパインの変化を計算) が新生消失を繰り返している (ターンオーバー)。慢性疼痛モデルマウス (坐骨神経の軽度結紮) において、坐骨神経損傷後、シナプスタンオーバー率の大幅な増加が見られた。しかし、シナプス密度の変化は見られなかった。

損傷前後において消失するシナプスの形状を検討した結果、スパイン頭部のサイズ (直径) が小さいものが優位に除去され、その大きさの大きいものは、坐骨神経による入力活動の増大 (脳内活動環境の変化) によっても除去されず、むしろ大きさの増大が見られた。さらに、このシナプスは数週間以上の長期にわたり残存した。一方、サイズの小さいシナプスは除去される確立が高い傾向にあった。

加えて、末梢神経損傷直前に新生した未熟なシナプスは、脳内環境が変化した後にはそのサイズは漸減し除去され、環境の変化後に新生したシナプスの残存率は優位に高いことが判明した。

この結果から、サイズの大きい強いシナプスは長期的に維持され、サイズの小さい弱いシナプスがおもに入れ替わっていることが判明した。このことは易可変シナプスと定常固定シナプスが存在し、学習などにおけるシナプス強化にはこの可変シナプスが関連している可能性が示唆された。また、新生したばかりの未熟シナプスは脳内環境により容易に除去され、新しい環境で新生されたシナプスが環境に適応した神経回路を作成する可能性も示唆された。

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 13 件)

Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura

J. Microglia: Actively Surveying and Shaping Neuronal Circuit Structure and Function. Trends in Neuroscience 36;209-217, 2013. 査読有り

Takatsuru Y, Eto K, Kaneko R, Masuda H, Shimokawa N, Koibuchi N, Nabekura J. Critical Role of the Astrocyte for Functional Remodeling in Contralateral Hemisphere of Somatosensory Cortex after Stroke. Journal of Neuroscience, 33;4683-4692, 2013. 査読有り

Ishibashi H, Witt MR, Nabekura J, Nielsen M. Modulation of diazepam-insensitive GABA(A) receptors by micromolar concentrations of thyroxine and related compounds in vitro. Brain Research, 1490:1-8, 2013. 査読有り

Eto K, Ishibashi H, Yoshimura T, Watanabe M, Miyamoto A, Ikenaka K, Moorhouse AJ, Nabekura J. Enhanced GABAergic Activity in the Mouse Primary Somatosensory Cortex Is Insufficient to Alleviate Chronic Pain Behavior with Reduced Expression of Neuronal Potassium-Chloride Cotransporter. Journal of Neuroscience, 32:16552-16559, 2012. 査読有り

Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, Yanagawa Y, Fukuda A, Nabekura J. GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. PLoS One, 6(12): e27048, 2011. 査読有り

Kim SK, Kato G, Ishikawa T, Nabekura J. Phase-specific plasticity of synaptic structures in the somatosensory cortex of living mice during neuropathic pain. Molecular Pain 7:87, 2011(open access on-line Journal). 査読有り

Eto K, Kim SK, Nabekura J, Ishibashi H. Taltirelin, a thyrotropin-releasing hormone analog, alleviates mechanical allodynia through activation of descending monoaminergic neurons in persistent inflammatory pain. Brain Research, 1414; 50-57, 2011. 査読有り

Sawada M, Kaneko N, Inada H, Wake H, Kato Y, Yanagawa Y, Kobayashi K, Nemoto T, Nabekura J, Sawamoto K. Sensory input regulates spatial and subtype-specific patterns of neuronal turnover in the adult olfactory bulb. Journal of Neuroscience, 31; 11587-11596, 2011. 査読有り

Eto K, Wake H, Watanabe M, Ishibashi H, Noda M, Yanagawa Y, Nabekura J. Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. Journal

of Neuroscience, 31; 7631-7636, 2011. 査読有り

Kim SK, Nabekura J. Rapid, phase-specific and size-dependent remodeling of synapses in the adult somatosensory cortex during development of neuropathic pain. Journal of Neuroscience, 31;5477-5482, 2011. 査読有り

Takatsuru Y, Koibuchi N, Nabekura J. Unilateral infarction of the visual cortex (VC) induced an increase in dendritic spine turnover in contralateral VC. Neuroscience Letter 488:97-100, 2011. 査読有り

Marumo T, Eto K, Wake H, Omura T, Nabekura J. The inhibitor of 20-HETE synthesis, TS-011, improves cerebral microcirculatory autoregulation impaired by middle cerebral artery occlusion in mice. British Journal of Pharmacology 161:1391-402, 2010. 査読有り

Nakahata Y, Miyamoto A, Watanabe M, Moorhouse AJ, Nabekura J, Ishibashi H. Depolarizing shift in the GABA-induced current reversal potential by lidocaine hydrochloride. Brain Research 1345:19-27, 2010. 査読有り

[学会発表](計 28 件)

石川達也, 石橋仁, 鍋倉淳一. 大脳皮質一次体性感覚野のミラーイメージペイン発症における役割. The role of primary somatosensory cortex in causing mirror-image pain, 鹿児島市, 2014年3月18日

宮本愛喜子, 江藤圭, 村越秀治, 柴田圭輔, 小泉修一, 鍋倉淳一. 発達期マウス大脳皮質一次体性感覚野におけるミクログリアによるシナプス形成: 生体2光子顕微鏡による観察. 第91回日本生理学会大会, 鹿児島市, 2014年3月18日

中村佳代, 和氣弘明, 鍋倉淳一. 脳血管障害後の神経回路再編成に対する K⁺-Cl⁻-cotransporter (KCC2) の役割. 第91回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014年3月17日

石川達也, 石橋仁, 鍋倉淳一. The role of primary somatosensory cortex in causing mirror-image pain. 第2回シナプス再編におけるグリア戦略研究会, 熱海, 2014年1月26日

鍋倉淳一, 金善光, 和氣弘明, 江藤圭. グリアによる大脳皮質一次体性感覚野シナプス再編. 第36回日本神経科学大会 Neuro2013, 京都, 2013年6月21日

宮本愛喜子, 江藤圭, 鍋倉淳一. 大脳皮質一次体性感覚野におけるミクログリアによるスパイン形成. Dendritic spine formation by microglia in immature barrel cortex. 第36回日本神経科学大会, 京都, 2013年6月21日

石橋仁, 江藤圭, 石川達也, 鍋倉淳一. 慢性痛による大脳皮質一次体性感覚野の GABA_A 受容体機能の変化. 第36回日本神経科学大会,

- Neuro2013, 京都, 2013年6月21日
Kim SK, Ishikawa T, Koizumi S, Nabekura J. Causal role of astrocyte-induced cortical synapse remodeling in neuropathic mechanical hypersensitivity in mice. Neuro2013, 京都, 2013年6月20日
- 鍋倉淳一 (2012.12.13) シナプス再編とグリア動態の生体内ダイナミクス。第35日本分子生物学会(福岡)
Nabekura J (2012.12.5) Glia and neuron interactions: their role in synapse remodeling in vivo. 2012 Joint Australian Physiological Society, The Physiological Society of New Zealand, and the Australian Society for Biophysics (Sydney, Australia)
宮本愛喜子, 江藤 圭, 鍋倉淳一 (2012.11.16) 発達期におけるミクログリアの形態的及び機能的特性の解明。第59回中部日本生理学会(岡崎)
Nabekura J (2012.11.2) Visualization of chronic pain-induced cortical plasticity. International Conference of Physiological Sciences 2012 (Sozhou, China)
稲田浩之, 渡部美穂, 内田 琢, 福田敦夫, 柳川右千夫, 鍋倉淳一 (2012.10.1) GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. 第55回日本神経化学大会(神戸)
Nabekura J (2012.9.14) Chronic pain-induced somatosensory cortical plasticity. NIPS International Workshop: Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link (岡崎)
石川達也, 石橋 仁, 金 善光, 加藤 剛, 鍋倉淳一 (2012.9.3) 大脳皮質が慢性疼痛の形成および維持に果たす役割とその機序の解明。第14回応用薬理シンポジウム(甲府)
Nabekura J (2012.6.1) Microglia surveillance of Synapses. 2012 Annual Meeting of Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (Seoul, Korea)
鍋倉淳一, 江藤 圭, 金善光 (2012.3.30) 慢性疼痛に伴う大脳皮質体性感覚野神経回路再編。第89回日本生理学会大会(松本)
鍋倉淳一, 加藤 剛, 宮本愛喜子, 江藤圭 (2012.3.26) ミクログリアによるシナプス監視再編。第117回日本解剖学会総会(甲府)
Nabekura J, (2012.3.12) Dynamics of synapse remodeling and glia motility in vivo. Internal symposium" Neocortical Organization" (岡崎)
Nabekura J (2012.3.6) GABA accelerates the migration of cortical interneurons in vivo. 42nd NIPS International Symposium (岡崎)
- ②① Nabekura J (2012.2.25) Remodeling of Cortical Synapses in vivo. The 1st NIPS/Tubingen University Joint Neuroscience Symposium (岡崎)
- ②② Nabekura J (2012.1.17) Visualization of cortical circuits in vivo. WCI Seminar in Korean Institute of Science Technology (Seoul, Korea)
- ②③ Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, Yanagawa Y, Fukuda A, Nabekura J (2011.11.15) GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. 第41回北米神経科学会
- ②④ Nabekura J (2011.10.8) Remodeling of Neuronal Circuits in vivo. The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (広島)
- ②⑤ 石橋 仁, 江藤 圭, 金 善光, 鍋倉淳一 (2011.9.17) TRH の慢性疼痛に対する作用とその機序。第34回日本神経科学大会 (Neuroscience 2011) (横浜)
- ②⑥ 江藤 圭, 和氣弘明, 石橋 仁, 渡部美穂, 鍋倉淳一 (2011.9.16) 一次体性感覚野と前帯状回の皮質間リモデリングにより慢性疼痛行動が_ 亢進する。第34回日本神経科学大会 (横浜)
- ②⑦ Nabekura J (2011.8.1) Microglia Surveillance of Synapses and fate of damaged synapse. 第11回中国神経科学会(鄭州, 中国)
- ②⑧ Nabekura J (2011.6.8) Microglia Surveillance of Synapses. Interaction of the immune and neuroendocrine systems in health and disease (St. Petersburg, Russia)
- [図書](計0件)
[産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)
[その他]
ホームページ: <http://www.nips.ac.jp/hsdev/>
6. 研究組織
(1)研究代表者
鍋倉 淳一 (NABEKURA, Junichi)
生理学研究所・発達生理学研究室・教授
研究者番号: 50237583
(2)研究分担者
住本 英樹 (SUMIMOTO, Hideki)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 30179303
(3)連携研究者
渡部 美穂 (WATANABE, Miho)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10399321
江藤 圭 (ETO, Kei)
生理学研究所・発達生理学研究室・特別協力研究員
研究者番号: 30545257
(4)研究協力者
金 善光 (KIM Sun Kwang)
KyoungHee 大学、韓国