

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(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300136

研究課題名(和文)興奮性および抑制性アストロサイトの局在と発生機序解明

研究課題名(英文)Localization of excitatory and inhibitory astrocytes, and their generation mechanism

研究代表者

池中 一裕 (IKENAKA, Kazuhiro)

生理学研究所・分子生理研究系・教授

研究者番号：00144527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：我々のATPイメージングが海馬などのスライスでも可能であるかどうか検討した結果、海馬スライスのみならず、大脳皮質でもATP放出を観察することができた。この放出は領域特異的であり、アストロサイトがATPを放出し神経回路を制御していることを示唆した。また、チャンネルや開口放出の阻害剤を用いた薬理学実験の結果、どの薬剤を用いても放出イベント数は減少しなかったことから、この放出は薬理的に多様なものであることが分かった。そこで複数の阻害剤を混合して添加したときのATP放出の変化を調べた結果、このATP放出は、開口放出でなくチャンネルからの放出が主要な放出機構であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in observing ATP release from astrocytes in brain slices. This release occurred in a region specific manner, suggesting that ATP-releasing astrocytes regulate neural circuit activity. Pharmaceutical analysis indicated that this ATP release from astrocytes induced by the glutamate addition does not depend on the exocytosis but more depends on the release through channels.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：ATP グルタミン酸 イメージング アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞は神経細胞にエネルギーを供給し、神経伝達物質を除去することによって神経細胞の働きを助ける役割をしていることは従来良く知られていたことである。近年グリア細胞は神経細胞の興奮性に直接影響を与えるグルタミン酸、ATP、D-セリンなどを放出することによって、神経回路機能を積極的に調節していることが明らかとなり注目を集めている。これらグリア細胞から放出され、神経細胞興奮性を調節する物質はグリオトランスミッターと呼ばれている。グルタミン酸は神経活動を興奮させ、ATP (およびその代謝物であるアデノシン) は神経活動を抑制することにより、直接神経活動を修飾できるのである。グリオトランスミッターがどのような時期に、どのような場所から放出されているかを知ることは、それらが神経回路機能を調節している機序を理解するうえで必須なことであり、そのためグリオトランスミッターのイメージングが望まれている。しかし十分な時間、空間分解能が得られる手法がなかったため、グリア細胞がグリオトランスミッターを放出する前に細胞内カルシウムを上昇させることを利用して、カルシウムイメージングを持って代用しているのが現状である。しかし、カルシウムイメージングだけではグリア細胞の興奮が神経活動にどのように反映されるか全く答えることができない。そこで、申請者はグリオトランスミッター、その中でもグルタミン酸と ATP のイメージングに取り組んでいる。

最近申請者は分散培養系でアストロサイトからのグルタミン酸や ATP 放出のイメージングに成功し、放出部位、頻度、時間などの基本的な様式を明らかにした (平成 22 年度 Neuro2010 にて発表、論文投稿中)。その結果、驚くべきことにアストロサイトの 10% 程度しかグルタミン酸を放出しないこと、ATP に至っては 1-2% 程度しか放出しないことが明らかになった。このことから、アストロサイトはグリオトランスミッター放出に関して多様性を有していることが明らかとなった。グルタミン酸を放出し、ATP を放出しないアストロサイト、いわゆる「興奮性アストロサイト」が存在することが今回の結果から明らかとなった訳である。神経細胞はその放出する神経伝達物質により分類されているが、グリア細胞にもこのことがあてはまることを意味する。このことから類推すると、ATP だけを放出する「抑制性アストロサイト」の存在も強く示唆される。しかし、このことを証明するためにはグルタミン酸と ATP の double imaging が必要であり、今回の申請内容の一つである。ごく最近、海馬スライスにおいても細胞外 ATP のイメージングに成功し、ATP 放出性の細胞の数は極めて少ないこと、またそれらは海馬スライスにおいて偏った分布をしていることを明らかにした。

スライスにおいても分散培養系と同様に「抑制性アストロサイト」の数が少ないことが示されただけでなく、「興奮性」あるいは「抑制性」アストロサイトの生理的意義を考える上でその分布を調べることが極めて重要であることを示すものである。実際、ATP 放出性細胞の分布は海馬 CA2 領域で高いが、この領域は神経活動が抑制されていること、その抑制はアデノシンのアンタゴニスト投与により解除されることが示されている (関野祐子、私信)。この現象は CA2 領域で大量に放出されている ATP がアデノシンに分解され、神経伝達物質の放出を抑制していると考えれば説明がつく。このように、アストロサイトのグリオトランスミッター放出様式による多様性を明らかにし、グルタミン酸や ATP を放出するアストロサイトが脳内のどこに分布しているのか知ることは極めて重要なことであり、神経回路機能の新たな調節機構を示すものである。また、グリア多様性が発生時からの系譜に基づくものか環境により可逆的に変化できるものかを明らかにすることも、その生理的意義を考慮する上で重要である。

2. 研究の目的

「興奮性」「抑制性」アストロサイトの脳内局在と、その産生機序を明らかにする、ことが究極の目標である。現在のグリオトランスミッターイメージングでは固定標本における局在を知ることができない。そこで、

- (1) アストロサイトからのグルタミン酸、ATP の放出機構を明らかにし、それらの放出に関わる分子の中で、「興奮性」および「抑制性」アストロサイトのマーカーとなる分子を同定する。
- (2) それらマーカーを用いて「興奮性」および「抑制性」アストロサイトの脳内局在マップを作製する。
- (3) また、それら分子マーカー発現機構解析よりグリア多様性産生機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) **海馬などの脳スライスにおける ATP とグルタミン酸同時イメージング装置の開発。** 現在古家の所属している名古屋大学において海馬スライスにおける ATP イメージングに成功した。これと同等以上の性能を有する装置を生理学研究所において構築した。この機種に、現在東京大学で並木らが稼働させているグルタミン酸イメージング機能を付加し、さらにスライス標本でも観察可能なように開発する。

(2) **グリオトランスミッター (ATP, グルタミン酸) 放出機構の解明。** 分散培養系でアストロサイトからのグルタミン酸放出のイメージングを行った結果、グルタミン酸を放出するアストロサイトは全体の 10% 程度しかいないこと、さらにその放出時間は数秒程度のもの

のから 20 秒程度のものでいろいろあることを明らかにした。また、分散培養系においてアストロサイトからの ATP 放出もイメージングしたところ、ATP 放出性のアストロサイトは全体の 1 - 2% 程度であり、またその放出時間は 200 秒を超えるものもあり、極めて長いことを示した。ATP、グルタミン酸放出に共通して観察されたことは放出パターンが一樣でなく、多様性のあることであった。すなわち、ATP もグルタミン酸もその放出機構は一つ以上存在する可能性がある。今まで ATP やグルタミン酸の放出機構解明を目指した研究は数多くあるが、結果がそれぞれ異なっていた。この原因として、放出機構そのものに多様性があると考えると説明がつく。われわれは個々のアストロサイトからのグリオトランスミッター放出を様式別に分類し、それぞれの放出機構をまず薬理的に明らかにする。ついで、該当する放出機構関連遺伝子欠失マウスあるいは shRNA 等を用いて当該遺伝子発現を抑制し、その結果を確認する。

4. 研究成果

(1) ATP とグルタミン酸同時イメージング装置の開発

これまで生理学研究所において構築された ATP イメージング装置を用いて培養アストロサイトによる実験を行ってきたが、これをさらに改良し、海馬などの脳スライスにおける ATP とグルタミン酸同時イメージング装置の開発を検討した。まずグルタミン酸イメージングについては、東京大学の並木らの方法を用いて培養アストロサイトでのグルタミン酸イメージングを行い、観察が可能であることを確認した。同時イメージングに向けて、様々な刺激を行い ATP とグルタミン酸を放出するアストロサイトの分布を調べたが、ATP、グルタミン酸ともに放出するアストロサイトの数が少なかった。

次にこれまで培養アストロサイトで ATP イメージングを行ってきたが、神経回路でのアストロサイトからの ATP 放出の役割について調べるために、海馬などのスライスでも可能かどうか検討した。その結果、海馬スライスのみならず、大脳皮質でも ATP 放出を観察することができた(図 1)。また海馬スライスにグルタミン酸を添加したときの ATP 放出は海馬スライスで神経細胞が分布する細胞層から離れたところで放出が見られた。またこの放出は領域特異的で、薬理学実験によりその

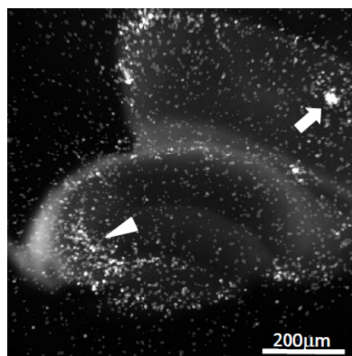


図 1: 脳スライスにグルタミン酸を添加したときの海馬(矢頭)と大脳皮質(矢印)での局所的 ATP 放出

放出する領域が変化することがわかった。このことはアストロサイトが ATP を放出し神経回路を制御していることを示唆している。

(2) グリオトランスミッター (ATP、グルタミン酸) の放出機構の解明

これまでに培養アストロサイトにグルタミン酸を添加することにより、ATP 放出の強度や持続時間に多様性があること、またチャンネルや開口放出の阻害剤を用いた薬理学実験の結果、どの薬剤を用いても放出の持続時間は減少するが放出イベントの数は減少しなかった。そこでさらに実験を進め複数の阻害剤を混合して添加したときの ATP 放出の変化を調べた。その結果チャンネルや開口放出のすべての阻害剤を混合すると、放出イベントの数は顕著に減少した。チャンネルの阻害剤のみを混合しても放出イベントの数は顕著に減少した。このことはグルタミン酸添加による培養アストロサイトからの ATP 放出は、開口放出でなくチャンネルからの放出が主要な放出機構であることを示唆している。つまり薬理学実験の結果は ATP がヘミチャンネル、P2X7 レセプター、マキシアニオンチャンネルの 3 種類のチャンネルから協調的に放出されることを示している。3 種類のチャンネルの阻害剤のうち 2 種類を混合したときの放出イベントの数を調べた。その結果ヘミチャンネルの阻害剤があると有意に放出イベントの数が減少した。このことはヘミチャンネルが他のチャンネルとの協調的な放出に重要であることを示している。また開口放出がこの系で観察される ATP 放出に関与しないことをさらに補強するため、ATP を分泌顆粒に輸送する分子の発現を抑えた培養アストロサイトで ATP 放出を調べた。その結果やはり放出のイベント数は抑制されなかった。

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 4 件)

Lee HU, Yamazaki Y, Tanaka KF, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K, Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus., *Glia*, 査読有、61 巻、2013、210-224

Inamura N, Kimura T, Tada S, Kurahashi T, Yanagida M, Yanagawa Y, Ikenaka K, Murakami F Intrinsic and extrinsic mechanisms control the termination of cortical interneuron migration, *Journal of Neuroscience*, 査読有、32、2012、6032-42

Inamura N, Sugio S, Macklin WB, Tomita K, Tanaka KF, Ikenaka K, Gene induction in mature oligodendrocytes with a PLP-tTA mouse line., *Genesis*,

査読有、50、2012、424-8
Inamura N, Ono K, Takebayashi H,
Zalc B, Ikenaka K, Olig2-lineage cells
generate GABAergic neurons in the
prethalamic nuclei, including the zona
incerta, ventral lateral geniculate
nucleus and reticular thalamic
nucleus.、査読有、33 巻、2011、118-29

〔学会発表〕(計 4 件)

Inamura N、Mechanism underlying
gliotransmitter release from astrocytes、
NIPS-Chulalongkorn Joint Symposium、
2013.10.21、Chulalongkorn University
Bangkok Thailand
Inamura N, Lee HU, Tanaka KF,
Furuya K, Sokabe M, Ikenaka K、
Mechanism underlying ATP release
from astrocytes、Neuro2013、2013.6.20、
京都府 国立京都国際会館
池中一裕、Mechanism underlying ATP
Release From Cultured Astrocyte.、第
34 回日本神経科学大会、2012.9.20、愛
知県名古屋市 名古屋国際会議場
池中一裕、Mechanism underlying ATP
Release From Cultured Astrocyte.、
ISN-ESN 2011 23rd Biennial Meeting、
2011.8.29、ギリシャ

〔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

池中 一裕 (IKENAKA, Kazuhiro)
生理学研究所・分子生理研究系・教授

研究者番号：00144527

(2) 研究分担者

古家 喜四夫 (FURUYA, Kishio)
名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・
研究員
研究者番号：40132740

並木 繁行 (NAMIKI, Shigeyuki)
東京大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号：90452193

(3) 連携研究者

田中 謙二 (TANAKA, Kenji)
生理学研究所・分子生理研究系・助教
研究者番号：30329700