

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590255

研究課題名(和文) 線条体ネットワークの状態遷移に対する自発カルシウムリズムの寄与

研究課題名(英文) Contribution of the spontaneous calcium rhythm to the state of the striatal network

研究代表者

小山内 実 (OSANAI, Makoto)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90286419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Ca²⁺ は重要なシグナル伝達分子である。線条体ニューロンとアストロサイトの双方で遅い自発 Ca²⁺ リズムを発見した。IP₃ 受容体、mGluR5 の阻害により Ca²⁺ リズムは阻害された。つまり、mGluR5-IP₃ 信号伝達経路が Ca²⁺ リズムに寄与している。この自発 Ca²⁺ リズムはニューロン・アストロサイトを含む多細胞間で同期していた。従って、Ca²⁺ リズムはニューロン-グリア相互作用に関連している可能性がある。また、シミュレーションにより、Ca²⁺ リズムが Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャネルを介して、線条体の投射ニューロンの発火特性を変化させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺ is a universal signal transduction molecule. To characterize Ca²⁺ signaling in striatal cells, spontaneous Ca²⁺ rhythms were examined in slice preparations. In both neurons and astrocytes of the striatum, spontaneous slow and long-lasting intracellular Ca²⁺ rhythms, which lasted up to 200 s, were found. Depletion of the intracellular Ca²⁺ store and the blockade of IP₃ receptors reduced the transient rate of the Ca²⁺ rhythm, and an mGluR5 antagonist blocked the Ca²⁺ rhythms in both neurons and astrocytes. Thus, the mGluR5-IP₃ signal cascade is the primary contributor to the Ca²⁺ rhythm in both neurons and astrocytes. The Ca²⁺ rhythm features multicellular synchrony, and both neurons and astrocytes participate in the synchronous activity. Therefore, the Ca²⁺ rhythm may involve in the neuron-glia interaction in the striatum. In the simulation study, we found that the Ca²⁺ rhythm can modulate the firing properties of the medium spiny projection neurons via Ca²⁺-activated K⁺ channels.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：カルシウム振動 大脳基底核 カルシウムイメージング 代謝型グルタミン酸受容体 IP₃ 受容体 ニューロン・グリア相互作用 パーキンソン病 細胞間相関

1. 研究開始当初の背景

これまでの神経回路に関する研究のほとんどが、活動電位依存的な神経活動に焦点を絞り行われている。しかし、記憶や学習あるいは神経疾患の過程では、神経回路の状態が活動電位よりはるかに遅い時間スケールで変化していることを鑑みると、この遅い状態変化をコードしているシグナルが必要である。黒質網様部では、発火頻度が数分間の周期で変化するオシレーションが報告されており (Yuan et al., 2004)、ニューロンでこのような遅い変化をコードするシグナルが存在することが示唆される。

細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、受容体やチャネルをはじめとする様々な細胞内タンパク質の活性を調節しており、細胞の状態遷移にとって重要である (Berridge et al., 2000 など)。例えば Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルを介した膜電位の変化が、神経細胞の入出力特性を変化させることが知られている (Hutcheon and Yarom, 2000; Vergara et al., 2003)。線条体では、強化学習中、あるいはパーキンソン病によりニューロンの活動性が変化することが知られているが (Samejima et al., 2005; Obeso et al., 2008 など)、これらの現象に密接に関わっているとされるドーパミン受容体は、細胞内 Ca^{2+} シグナルに関与していることが示唆されている (Bergson et al., 2003; Tang et al., 2004 など)。この Ca^{2+} シグナルは細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出によるものであるが、この Ca^{2+} ストアから放出された Ca^{2+} が Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルを制御しているとの報告もある (Locknar et al., 2004; Brennan et al., 2008)。

研究代表者は、ラットおよびマウスの大脳基底核線条体の細胞で、最大数百秒持続する自発 Ca^{2+} リズムを発見している (Osanai et al., 2006)。上述の点から、細胞内 Ca^{2+} は細胞の内部状態を規定する因子であると考えられるので、この自発 Ca^{2+} リズムにより、ニューロンの活動性 (入出力特性) あるいはグリアの状態が遷移し、結果的にネットワークの状態が遷移することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、線条体における自発 Ca^{2+} リズム - ネットワークの状態遷移の関係を明らかにするために、 Ca^{2+} イメージング、電気生理学実験、シミュレーション実験を組み合わせ、以下の研究を行う。

(1) ニューロン及びグリア細胞における Ca^{2+} リズムの発生機構の解明。

(2) モデル細胞を用いた Ca^{2+} -clamp シミュレーション実験。

(3) 自発 Ca^{2+} リズムと細胞の入出力特性との関係の解明。

神経回路の遅い状態遷移は、ニューロン単独で生じているのか、ニューロン - グリア相互作用も含めた細胞間相互作用により生じているのかは分からない。そこで本研究では、

細胞種特異的に蛍光タンパク質 GFP を発現しているマウスを用い、ニューロンあるいはグリア細胞を可視化した上で、 Ca^{2+} リズム計測とネットワーク活動計測を行う。これにより、自発 Ca^{2+} リズムの細胞種間相互作用を明らかにすることができるだけでなく、どの種類の細胞の自発 Ca^{2+} リズムが状態遷移と関わっているのか明らかにすることができる。

3. 研究の方法

全ての動物実験は、東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会ならびに、遺伝子組換え実験安全専門委員会の規程に従い、実験許可を受けた上で行った。

(1) Ca^{2+} イメージング

ニューロンとグリア細胞を区別するために、グリア細胞の多くを占めるアストロサイトにのみ蛍光タンパク質である GFP を発現しているマウス (GFAP-GFP マウス, Zhuo et al., 1997) を実験動物として用いた。標本には、この GFAP-GFP マウスの大脳皮質 線条体スライスを用いた (厚さ 300 μm)。このスライス標本に、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura-PE3 のアセトキシメチルエステル体を負荷し (産業財産権)、冷却 CCD と高速波長切替え装置を備えた、正立落射蛍光顕微鏡に設置した灌流チャンバー上に静置した (図 1)。この実験系を用い、340 nm と 380 nm の二波長で交互に励起し、510 nm 付近の蛍光を測定した。得られた蛍光画像の細胞体に相当する複数の領域に関心領域 (ROI) を設定し、ROI 中の 340 nm で励起した際の蛍光強度と 380 nm で励起した際の蛍光強度の比 (R) を求め、ベースラインからの R の変化 (ΔR) を細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化とした (Grynkiewicz et al., 1985)。この方法により、線条体における自発細胞内 Ca^{2+} リズムのイメージング計測を行った。

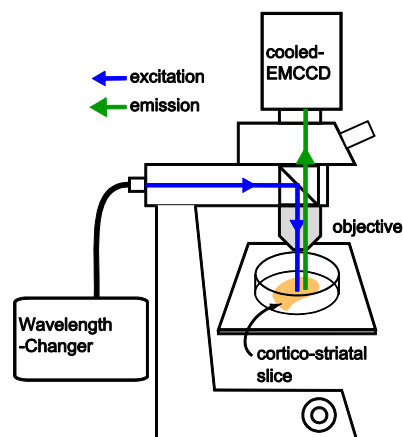


図 1. Ca^{2+} イメージングシステム。

落射蛍光顕微鏡に励起光源として高速波長切り替え装置 (Wavelength-Changer) と蛍光観察用の冷却電子増倍型 CCD (cooled-EMCCD) を取り付け、蛍光像を観察した。

(2) コンピューターシミュレーション
 コンピューターシミュレーションには、イオンチャネルだけでなく、細胞の形態及び、細胞内イオン濃度変化に関わるメカニズムも導入することが可能な、ニューロンシミュレーター NEURON (Carnevale and Hines, 2006) を用いた。細胞形態には、ラットの線条体投射ニューロンの形態 (Bishop et al., 1982.) を参考に、形態モデルを作成した (図 2)。このニューロンモデルに対して、線条体投射ニューロンで存在が確認されている以下のイオンチャネルを生理学実験から得られた電流特性を基にモデル化し導入した; 電位依存性 K^+ チャネル (Shen et al., 2004, 2005, 2007; Tkatch et al., 2000), 電位依存性 Na^+ チャネル (Budelli et al., 2009), Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル (BK channel and SK channel: Bargas et al., 1999 など), 漏れ電流チャネル (Shen et al., 2007)。加えて、 Ca^{2+} 排出機構並びに細胞内拡散モデルも導入した。このモデルニューロンの樹状突起に、興奮性のランダムシナプス入力を与え (Destexhe et al., 2001)、自発発火が起こっている状態を再現した。このニューロンの細胞体中心部を、 Ca^{2+} イメージングで得られた細胞内 Ca^{2+} 変動の時系列データを用いて “ Ca^{2+} -clamp” することにより、自発 Ca^{2+} リズムが細胞の発火特性に与える影響を推定した。

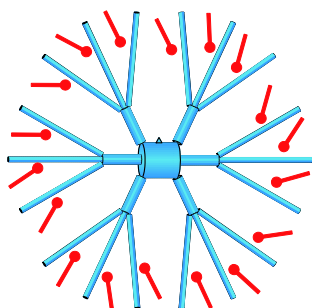


図 2. モデル線条体投射ニューロンの形態 (青) 及びシナプス入力 (赤) の模式図。

4. 研究成果

細胞内情報伝達物質である Ca^{2+} が細胞の状態遷移を引き起こす因子であるという仮説の基に、線条体で発見された非常に遅い時間経過を持つ自発 Ca^{2+} リズムの発生機構及び、状態遷移との関係を明らかにするために、 Ca^{2+} イメージング実験、シミュレーションを行い、以下の成果を得た。

(1) ニューロン及びグリア細胞における Ca^{2+} リズムの発生機構の解明

GFAP-GFP マウスの線条体スライス標本を用いて、細胞種を同定した上で Ca^{2+} イメージング実験を行ったところ、ニューロン・アストロサイトの双方で Ca^{2+} 振動が発生していることが明らかとなった (図 3)。この Ca^{2+} 振動は、IP₃ 受容体の阻害、代謝型グルタミン酸受容体 5 型 (mGluR5) の阻害により抑制されたことから、mGluR5 - IP₃ 受容体

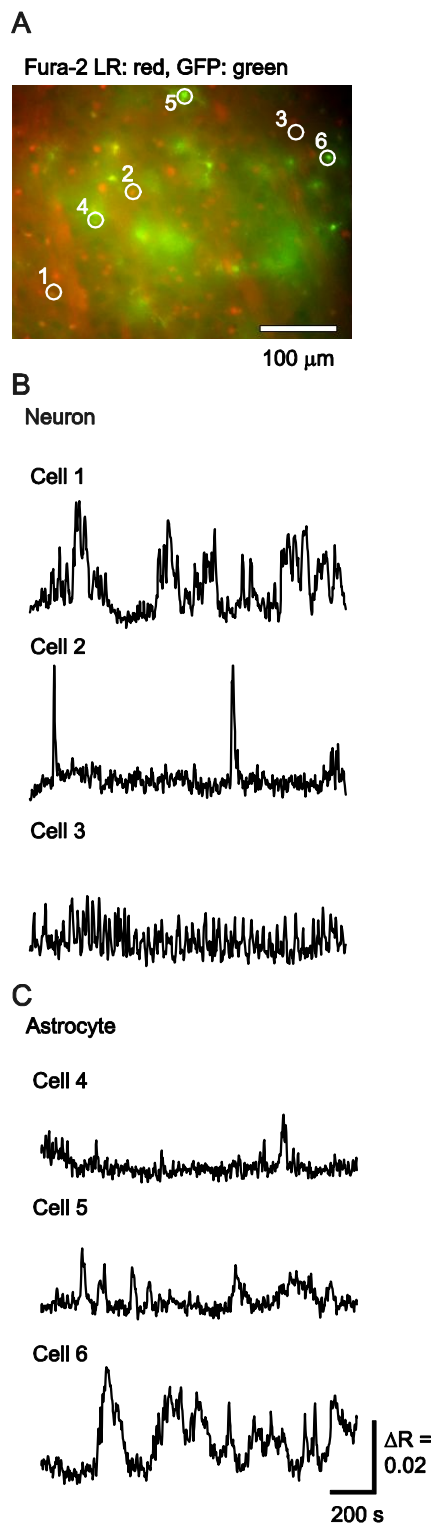


図 3. 線条体ニューロン・アストロサイトにおける自発 Ca^{2+} リズム。(A) Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura-PE3 を負荷した GFAP-GFP マウスの線条体スライス標本の蛍光画像。緑が GFP 蛍光、赤が Fura-PE3 の蛍光を示しており、緑の細胞がアストロサイト、赤の細胞がニューロンである。(B, C) ニューロン (B)、アストロサイト (C) における自発 Ca^{2+} リズムの代表例 (細胞の番号は A 図と対応している)

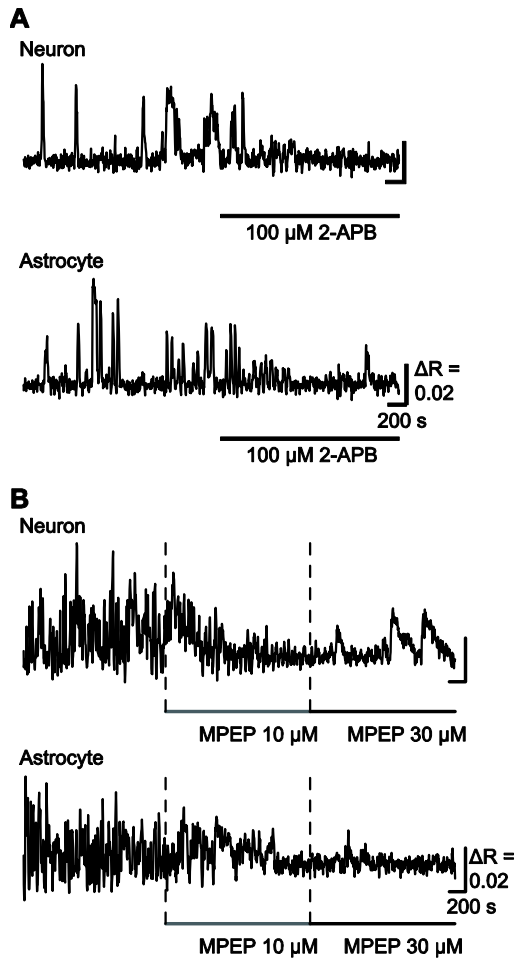


図 4. 自発 Ca^{2+} リズムの発生メカニズム。(A) IP_3 受容体の阻害剤 2-APB の投与により、ニューロン、アストロサイトの双方で自発 Ca^{2+} リズムは消失した。(B) ニューロン、アストロサイトの双方で、mGluR5 の阻害剤 MPEP の濃度依存的に自発 Ca^{2+} リズムは減少した。

のシグナル伝達経路が自発 Ca^{2+} リズムの発生に参与していることが明らかとなった (図 4; 雑誌論文)。近年複数の論文で、mGluR5 がパーキンソン病の症状に参与していることが報告されている (Ambrosi et al., 2010; Bonsi et al., 2007; Oueslati et al., 2005)。mGluR5 の阻害により、自発 Ca^{2+} リズムが消失するという結果は、線条体における自発 Ca^{2+} リズムがパーキンソン病と何らかの関係があることを示唆している。

(2) モデル細胞を用いた “ Ca^{2+} -clamp” シミュレーション実験

自発 Ca^{2+} リズムは Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルを介して、ニューロンの発火特性を変化させていることが考えられる。この仮説を検証するために、生理学的に尤もらしい線条体投射ニューロンモデルを作成し、実験で得られた自発 Ca^{2+} リズムの時系列データにより細胞体の Ca^{2+} 濃度を固定する “ Ca^{2+} -clamp”

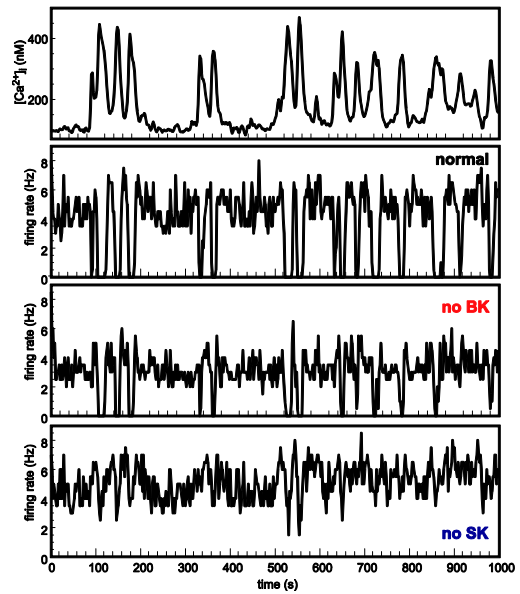


図 5. “ Ca^{2+} -clamp” シミュレーション。図 2 で示した線条体投射ニューロンの細胞体をイメージング実験で得られた自発 Ca^{2+} リズムの時系列データ (上段; 横軸: 時間, 縦軸: 細胞内 Ca^{2+} 濃度) により “ Ca^{2+} -clamp” を行った際の自発発火頻度 (横軸: 時間, 縦軸: 発火頻度)。(normal) 正常な線条体投射ニューロンの場合。(no BK, no SK) Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルのうち BK チャンネル (no BK) あるいは SK チャンネル (no SK) を取り除いた線条体投射ニューロンの場合。

シミュレーションを行った。その結果、自発 Ca^{2+} リズムが Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルの一種である SK チャンネルを介して、ニューロンの発火特性を変化させているという結果が得られた (図 5)。この結果は同じ入力でも、細胞内 Ca^{2+} の状態に応じて出力が変化することを示唆している。

(3) 自発 Ca^{2+} リズムと細胞の入出力特性との関係の解明

上記シミュレーション実験の結果より、自発 Ca^{2+} リズムが、ニューロンの入出力関係に影響を与えていることが示唆されたが、自発 Ca^{2+} リズム自身が細胞間で相関があるのか、活動電位依存の神経入力により自発 Ca^{2+} リズムにどのような変化が起こるのかを線条体スライス標本を用いて解析した。

モンテカルロ法による多細胞間の相関解析を行った結果、自発 Ca^{2+} リズムは多細胞間で同期していることが明らかとなった (図 6)。また、この同期は活動電位の阻害によりほとんどなくなった (図 6)。このことは、本研究で対象としている代謝型受容体を介した遅い Ca^{2+} 濃度変化でも細胞間で同期していることを示しただけでなく、活動電位依存性のプロセスが、自発 Ca^{2+} リズムを調節し

ていることを示唆している。

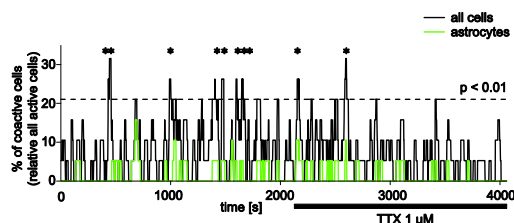


図 6. 多細胞間での自発 Ca^{2+} リズムの同期。ある標本で、自発 Ca^{2+} リズムが観察された細胞数に対して、どの程度の割合の細胞が同期していたかを示している (縦軸: 同期細胞数の割合、横軸: 時間)。* はモンテカルロ法により、有意に同期していることが示されたイベントであり、破線 ($p < 0.01$) は危険率が 0.01 の同期細胞割合を示している。グラフ下の黒線 (TTX) は活動電位を阻害するためにテトロドトキシン (TTX) を投与した期間を示している。TTX 投与時には多細胞間同期がほとんど消失していることが分かる。なお、黒線 (all cells) はすべての細胞を示しており、緑線 (astrocyte) は同期細胞中にアストロサイトが含まれる割合を示している。

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 17 件)

Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Machida Y, Mori I, Osanai M, Both neurons and astrocytes exhibited tetrodotoxin-resistant metabotropic glutamate receptor-dependent spontaneous slow Ca^{2+} oscillations in striatum, PLoS ONE, 査読有, 9(1), 2014, e85351, DOI:10.1371/journal.pone.0085351

Osanai M, Suzuki T, Tamura A, Yonemura T, Mori I, Yanagawa Y, Yawo H, Mushiaki H, Development of a micro-imaging probe for functional brain imaging, Neuroscience Research, 査読有, 75, 2013, 46-52, DOI:10.1016/j.neures.2012

菊田 里美, 田村 篤史, 菊地 琴美, 柳川 右千夫, 森 一生, 小山内 実, 大脳基底核線条体における自発カルシウム濃度変化によるカルシウムストア依存性チャンネルの開口 $-\text{Mn}^{2+}$ 造影 MRI に向けた検討-, 東北大学医学部保健学科紀要, 査読有, 21, 2012, 77-86, <http://ir.library.tohoku.ac.jp/re/bitstream/1009/754391/1/1348-8899-2012-21%282%29-77.pdf>

Osanai M, Yaguchi Y, Yamada N, Oboshi F, Yagi T, Spontaneous calcium changes in striatal cells, Electronics and Communications in Japan, 査読有, 94(7), 2011, 43-52, DOI:10.1002/ecj.10242

[学会発表](計 52 件)

Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Osanai M, Metabotropic glutamate receptor-dependent slow Ca^{2+} oscillations in striatal neurons and astrocytes, 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16-18 日, 鹿児島

Osanai M, Visualization of the brain state using calcium imaging useful for the drug screening, 6th International Conference on Drug Discovery and Therapy, February 10-12, 2014, Dubai, UAE

Osanai M, Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Oboshi F, Cortical activity regulates the tetrodotoxin-resistant slow Ca^{2+} oscillation in the striatum, The sixth International Neural Microcircuit Conference "Functional Mechanism of Cortical Microcircuit", 2013 年 6 月 24-26 日, 岡崎

Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Machida Y, Mori I, Osanai M, Multicellular synchrony of the mGluR5-PLC-IP3 pathway dependent spontaneous Ca^{2+} rhythms in the striatum, Neuro2013, 2013 年 6 月 20-23 日, 京都

Osanai M, Slow calcium oscillation in striatum, 第 90 回日本生理学会大会シンポジウム「基底核・辺縁系のリズムと持続」, 2013 年 3 月 27-29 日, 東京

Kikuta S, Yanagawa Y, Mori I, Osanai M, Involvement of the store operated calcium channels in the spontaneous calcium transients in striatal GABAergic neuron, 第 90 回日本生理学会大会, 2013 年 3 月 27-29 日, 東京

Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Machida Y, Mori I, Osanai M, Both neurons and astrocytes in striatum exhibited the long-lasting Ca^{2+} rhythms triggered by mGluR5-IP3 pathway, 2012 Annual Meeting of Society for Neuroscience, October 13-17, 2012, New Orleans, USA

Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Machida Y, Mori I, Yanagawa Y, Osanai M, Long-lasting spontaneous Ca^{2+} rhythms in astrocytes and GABAergic neurons in striatum, 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18-21 日, 名古屋

Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Yanagawa Y, Machida Y, Mori I, Osanai M, Long lasting spontaneous Ca^{2+} rhythms in striatal GABAergic neuron, 第 89 回日本生理学会大会, 2012 年 3 月 29-31 日, 松本

小山内 実, カルシウムイメージングによる神経活動の可視化, 平成 23 年度生理学研究所研究会「大脳皮質局所回路の機能原理」, 2011 年 12 月 1 日, 岡崎

Tamura A, Yamada N, Yaguchi Y, Machida Y, Mori I, Osanai M, Metabotropic glutamate receptor type 5 contributes to the spontaneous Ca^{2+} rhythms in the striatal neurons and astrocytes, 第 34 回日本神経科学大会,

2011 年 9 月 14-17 日, 横浜

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：細胞内イオンイメージング法、生体サンプルの細胞への細胞内イオンイメージング用色素の導入方法及び細胞内イオンイメージング用色素導入用容器

発明者：小山内 実

権利者：国立大学法人 東北大学

種類：特許

番号：特開 2013-215114

出願年月日：2012 年 4 月 5 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rii.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小山内 実 (OSANAI, Makoto)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90286419