

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：13501  
 研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
 研究期間：2016～2019  
 課題番号：15KK0340  
 研究課題名（和文）ペリシナプスグリアによるシナプス情報伝達制御機構の解明（国際共同研究強化）  
  
 研究課題名（英文）Regulation of synapses by perisynaptic glia(Fostering Joint International Research)  
  
 研究代表者  
 繁富 英治（Shigetomi, Eiji）  
  
 山梨大学・大学院総合研究部・助教  
  
 研究者番号：00631061  
  
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円  
 渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：ペリシナプスグリアは、シナプスからの情報受容能およびシナプスへの情報発信能の両方を有することから、シナプスにおける情報処理と密接に関連すると想定されている。このペリシナプスグリアの活動を詳細に計測し、その意義を明らかにするために、新規Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光タンパク質であるLck-GCaMP6fをアストロサイトに発現する遺伝子改変動物を用いた解析を行った。背外側線条体アストロサイトに着目して行った実験から、Lck-GCaMP6fはペリシナプスグリアの活動を鋭敏に検出すること、また、アセチルコリン及びドパミンという複数の神経伝達物質を介した新しいペリシナプスグリア活動制御機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
 ペリシナプスグリアの活動を鋭敏に測定することにより、シナプス活動とペリシナプスグリア活動の新たな情報処理メカニズムを明らかにした点に本研究の学術的意義がある。シナプスにおける異常及びグリア細胞機能の変調は様々な中枢神経疾患の原因と考えられている。本方法を用いた解析により、シナプス活動とペリシナプス活動の関係性、シナプスとペリシナプス活動間の情報伝達処理機構、病態メカニズムにおけるペリシナプス活動の意義を明らかにすることにより、中枢神経疾患の新たな治療標的の発見及び治療方法の開発に繋がる知見が得られると期待される。

研究成果の概要（英文）：Astrocytes extend many peripheral astrocytic processes (PAP) where astrocytes closely associate and communicate with synapses. Despite its importance for synapses, mechanism underlying information processing by PAPs is still unclear due to lack of methods to visualize their activities. Here, using a novel transgenic mouse whose astrocytes express Lck-GCaMP6f, we investigated the dynamic feature of PAPs in the dorsolateral striatum (DLS). Compared to cyto-GCaMP6f, Lck-GCaMP6f detected Ca<sup>2+</sup> signals in larger area in response to neuronal activities. Pharmacological experiments show that evoked Ca<sup>2+</sup> signals detected by Lck-GCaMP6f is mediated by dopamine D1/D5 receptor and muscarinic receptor. Overall data show a novel mechanism underlying Ca<sup>2+</sup> signal at PAPs which finely regulated by multiple neurotransmitters in DLS.

研究分野：神経生理学・神経薬理学

キーワード：ペリシナプスグリア アストロサイト 遺伝子改変マウス カルシウム感受性タンパク質 線条体 ドパミン アセチルコリン シナプス

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。

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳の情報処理・発信は、シナプスにおける情報伝達により精密に制御されている。シナプスは、シナプス前終末（プレ）からシナプス後要素（ポスト）への情報の授受により定義付けられてきたが、近年、第3の機能ドメインとして「ペリシナプスグリア」が注目されている。ペリシナプスグリアは、プレ及びポストを取り囲みその情報伝達を制御すると考えられている。従って、ペリシナプスグリアを加えた3種の要素をシナプスの基本単位とする「三者間シナプス」仮説が提唱された。すなわち、脳の情報処理過程であるシナプス伝達を理解する上で、第3の機能ドメイン、ペリシナプスグリアの機能的意義の理解は不可欠である。ペリシナプスグリアの本体は、主にアストロサイトの微細突起であるが、この微細突起の活動様式及びその動作原理が不明なことが課題となっている。申請者らは、ペリシナプスグリアの活動を可視化するための膜移行型  $Ca^{2+}$  蛍光プローブ、Lck-GCaMP3、を作出し、これによってペリシナプスグリアの新たな機能を明らかにしてきた。しかし、使用方法論には主に3つ問題点があった。第1に、遺伝子導入のためアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を注入するために脳に侵襲的な障害を与え、これがペリシナプスグリアの機能及び形態に影響を及ぼす可能性がある。第2に、AAVによる外来遺伝子の発現が長期にわたると、細胞の生存・応答性に影響を与える。第3に、Lck-GCaMP3は感受性・応答性の点で不十分である。以上の問題点を克服する方法論が必要となった。

### 2. 研究の目的

(1) ペリシナプスグリアの活動への影響を最小限に抑えつつ、その活動を鋭敏に検出するために、新たな戦略に基づいた方法が必要である。脳に非侵襲的かつ長期間に安定して  $Ca^{2+}$  プローブを発現させるためには遺伝子改変動物の作出が有用である。また Lck-GCaMP3 よりも感受性・応答性で優れた Lck-GCaMP6f を用いることで、ペリシナプスグリアの活動を鋭敏に検出可能となる。本研究課題では、ペリシナプスグリアの主要な細胞であるアストロサイト選択的に Lck-GCaMP6f を発現する遺伝子改変マウスを用いて、ペリシナプスグリアの活動の計測を行い、本研究方法の有用性の検討、並びに、本研究法を用いたイメージング解析を通じてペリシナプスグリアの活動様式及びその動作原理の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) ペリシナプスグリア選択的に Lck-GCaMP6f を発現する遺伝子改変マウスを得るために、アストロサイト特異的な Cre 系統である AldH11-CreERT2 と Floxed Lck-GCaMP6f マウス（共に共同研究先であるカリフォルニア大学ロサンゼルス校生理学部門・Khakh 教授の研究室において作出）を交配させ得られた産仔にタモキシフェンを投与した[1]。成熟マウスから急性脳スライス標本を作成し、二光子励起レーザー顕微鏡下においてペリシナプスグリアの活動を観察した。背外側線条体に着目し、大脳皮質由来の入力線維の電気刺激によるペリシナプスグリア応答を観察した。膜移行型  $Ca^{2+}$  蛍光タンパク質である Lck-GCaMP6f の対照群として細胞質型である cyto-GCaMP6f をアストロサイト選択的に発現するマウスを用いた。刺激誘発  $Ca^{2+}$  応答の発生メカニズムを薬理学的手法で解析した。

### 4. 研究成果

(1) アストロサイト選択的に Lck-GCaMP6f を発現するマウスから背外側線条体を含む急性脳スライス標本を作成し、二光子励起顕微鏡によって観察したところ、Lck-GCaMP6f の発現はほぼ一様に観察され、AAVによる遺伝子導入で見られるような細胞毎に発現量に増減のあるモザイク状の発現パターンとは異なっていた。Cyto-GCaMP6f でもほぼ一様の発現パターンを示した。背外側線条体には、主要な入力線維として大脳皮質由来と視床由来があるが、このうち大脳皮質由来の入力線維に対する応答について検討した。大脳皮質由来入力線維を電気刺激（4 pulses, 10Hz）したところ、およそ数十秒持続する  $Ca^{2+}$  応答が観察された。この  $Ca^{2+}$  応答が発生する領域面積を計測したところ、cyto-GCaMP6f と比較して Lck-GCaMP6f においてその領域面積は有意に大きかった。すなわち、Lck-GCaMP6f においてより広範囲で  $Ca^{2+}$  応答が観察された。このことから、神経由来の情報を受け取って起こるペリシナプスグリアの活動を Lck-GCaMP6f はより鋭敏に検出すると解釈された。従って、微細な構造であるペリシナプスグリアの活動を計測する技術として、アストロサイト選択的 Lck-GCaMP6f 発現マウスは有用なツールであると考えられる。AAV を用いた遺伝子導入により Lck-GCaMP6f が cyto-GCaMP6f と比較してペリシナプスグリアの活動を検出する上で優位であることは既報でも指摘されているが[2]、AAV を用いない本法はより生理的な条件における解析を可能にする点で優れている。

(2) 大脳皮質由来の神経活動に応じたペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答発生メカニズムを薬理的に検討した。この  $Ca^{2+}$  応答は、テトロドトキシンやカドミウムによってほぼ消失することから、活動電位依存的に放出された神経伝達物質を介していると解釈された。細胞内  $Ca^{2+}$  ストアを枯渇させる CPA によって消失することから、細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  動員を介すると解釈された。アストロサイトには多岐にわたる神経伝達物質に反応する受容体が発現しており、これらの多くは活性化によって  $Ca^{2+}$  応答を引き起こされる。グルタミン酸、ATP、ノルアドレ

ナリン、ドパミン、アセチルコリン、エンドカンナビノイドに反応する受容体アンタゴニストを投与したところ、ドパミン D1/D5 及びムスカリン型アセチルコリン受容体のアンタゴニストによって、ペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答が有意に減弱した。このことから、ドパミンもしくはアセチルコリンによってペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答が起こると考えられた。一方、GABA<sub>B</sub> 受容体アンタゴニストによってペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答は増強された。

(3) 大脳皮質入力線維の電気刺激によって、アセチルコリンが放出されるのかを調べるために、新規アセチルコリンセンサーをアストロサイトに発現させて計測した[3]。その結果、入力刺激直後に数秒間続くアセチルコリン応答を検出した。アセチルコリン応答が観察された領域は、空間的にペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答が生じた領域と類似していた為、おそらく、入力線維刺激によって放出されたアセチルコリンがペリシナプス応答に寄与すると考えられた。しかし、アストロサイトにムスカリン型アセチルコリン受容体受容体の発現は報告されているものの、背外側線条体において、アセチルコリンはアストロサイトの  $Ca^{2+}$  応答を惹起しなかった。このことから、電気刺激によって放出されたアセチルコリンが直接ペリシナプスグリアの受容体に作用しているわけではないと考えられた。一方、背外側線条体アストロサイトはドパミン投与により非常に大きく、また、持続的な  $Ca^{2+}$  応答を示した。これらの結果より、ペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答は、ドパミン神経からのドパミン放出によって起こっており、アセチルコリンによってドパミンの放出が増強されると解釈された。すなわち、大脳皮質由来の入力を介してアセチルコリン及びドパミンが放出され、その結果ペリシナプスグリア応答が惹起される。ペリシナプスグリアの応答は複数の神経伝達物質を介して制御される事実はこれまでに報告がなく、これは新しいペリシナプスグリア活動制御機構である。ノルアドレナリン、ATP 受容体、代謝型グルタミン酸受容体のアゴニストは、大きな  $Ca^{2+}$  応答を示したことから、これらの受容体は発現し機能しているものの、大脳皮質由来の入力応答には寄与しない。(2) 及び(3) の研究成果により、ペリシナプスグリア活動は特定の神経伝達物質を介して制御されると考えられた。側坐核においてアストロサイトにおけるドパミンを介した  $Ca^{2+}$  シグナルがシナプスを制御することが報告された[4]。本研究は、背外側線条体という異なる神経構造での知見であり、またこれまで得られた現象にも相違がある。引き続き Khakh 研究室と共同研究を進め、背外側線条体におけるペリシナプスグリアのドパミンを介したシグナル伝達の意義について解明する。

(4) アストロサイトは存在する脳領域毎に形態が異なることから機能及び役割が異なる可能性が指摘されていた。しかし、実際にどの程度異なるのか、更にはニューロンとの相互作用も異なるのか不明であった。この問題に取り組むため、受け入れ先研究室では、海馬及び線条体という異なる2つの脳領域に着目し、それぞれの領域のアストロサイト違いを網羅的に調べた[5]。具体的には、アストロサイトの光学顕微鏡レベルの形態及びペリシナプスグリアの電子顕微鏡レベル微細形態、電気生理学的特性、 $Ca^{2+}$  シグナル、遺伝子発現、タンパク質発現を網羅的に解析した。このプロジェクトの一端に参画し、線条体アストロサイトと比較して、海馬アストロサイトはニューロン情報を受けて  $Ca^{2+}$  シグナルを発生しやすいこと、また、ニューロン由来のグルタミン酸を受容しやすいことを見出した。この結果は、電子顕微鏡での微細形態解析結果と一致する結果であった。電子顕微鏡での解析では、海馬のペリシナプスグリアは線条体のペリシナプスグリアよりも、より近接しているため、ニューロン情報を受けやすい位置関係にあり、そのため、ペリシナプスグリアの活動も生じやすいと解釈された。すなわち、海馬アストロサイトは線条体アストロサイトよりもニューロンとより密接な情報伝達を行っていると考えられる。本研究成果は、アストロサイトの多様性を多面的な角度から解析した初めての論文であり、高い引用回数(2020年6月10日において177回)からも研究分野に大きな影響を与えたことがわかる。また、アストロサイトの機能はそれぞれの神経構造毎において異なる可能性があり、ある神経構造で見られたアストロサイトの知見がほかの神経構造のアストロサイトに単純に外挿することはできないことを明示した点で非常に大きな意義がある。

#### 参考文献

1. Srinivasan, R., Lu, T. Y., Chai, H., Xu, J., Huang, B. S., Golshani, P., Coppola, G. & Khakh, B. S. (2016) New Transgenic Mouse Lines for Selectively Targeting Astrocytes and Studying Calcium Signals in Astrocyte Processes In Situ and In Vivo, *Neuron*. **92**, 1181-1195.
2. Stobart, J. L., Ferrari, K. D., Barrett, M. J. P., Gluck, C., Stobart, M. J., Zuend, M. & Weber, B. (2018) Cortical Circuit Activity Evokes Rapid Astrocyte Calcium Signals on a Similar Timescale to Neurons, *Neuron*. **98**, 726-735 e4.

3. Borden, P. M., Zhang, P., Shivange, A. V., Marvin, J. S., Cichon, J., Dan, C., Podgorski, K., Figueiredo, A., Novak, O., Tanimoto, M., Shigetomi, E., Lobas, M. A., Kim, H., Zhu, P. K., Zhang, Y., Zheng, W. S., Fan, C., Wang, G., Xiang, B., Gan, L., Guang-Xian, Z., Guo, K., Lin, L., Cai, Y., Yee, A. G., Aggarwal, A., Ford, C. P., Rees, D. C., Dietrich, D., Khakh, B. S., Dittman, J. S., Gan, W.-B., Koyama, M., Jayaraman, V., Cheer, J. F., Lester, H. A., Zhu, J. J. & Looger, L. L. (2020) A fast genetically encoded fluorescent sensor for faithful in vivo acetylcholine detection in mice, fish, worms and flies, *bioRxiv*.
4. Corkrum, M., Covelo, A., Lines, J., Bellocchio, L., Pisansky, M., Loke, K., Quintana, R., Rothwell, P. E., Lujan, R., Marsicano, G., Martin, E. D., Thomas, M. J., Kofuji, P. & Araque, A. (2020) Dopamine-Evoked Synaptic Regulation in the Nucleus Accumbens Requires Astrocyte Activity, *Neuron*. **105**, 1036-1047 e5.
5. Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J. C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P. S., Vondriska, T. M., Whitelegge, J. P., Coppola, G. & Khakh, B. S. (2017) Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence, *Neuron*. **95**, 531-549 e9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Octeau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP, Coppola G, Khakh BS.	4. 巻 95
2. 論文標題 Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 531-549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2017.06.029	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 繁富英治、小泉修一	4. 巻 37
2. 論文標題 グリア ニューロン間情報発信・受信イメージング技術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 182-188
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Yukiho Hirayama, Kazuhiro Ikenaka, Kenji F Tanaka, Haruhiko Bito, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Spatiotemporal analysis of neuron-astrocyte interaction by dual-color calcium imaging
3. 学会等名 Cold Springs Harbor Conference: Novel Insights into Glia Function & Dysfunction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Discovery of novel calcium signals of astrocytes in health and disease
3. 学会等名 The second international symposium for frontend brain science of the University of Yamanashi (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Yukiho J Hirayama, Kazuhiro Ikenaka, Kenji F Tanaka, Haruhiko Bito, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Dynamic feature of bidirectional communication between neurons and astrocytes
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eiji Shigetomi, Yukiho J Hirayama, Fumikazu Sano, Kenji F Tanaka, Haruhiko Bito, Schuichi Koizumi
2. 発表標題 Neuronal hyperexcitability mediated by GqPCR-mediated signaling in astrocytes
3. 学会等名 The 93rd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2020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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カーク バルジット  (Khakh Baljit)	カリフォルニア大学ロサンゼルス校・生理学部門・教授	
その他の研究協力者	チャイ ファ  (Chai Hua)	カリフォルニア大学ロサンゼルス校・生理学部門・MD-PhD student	
その他の研究協力者	ディアズーカストロ ブランカ  (Diaz-Castro Blanca)	カリフォルニア大学ロサンゼルス校・生理学部門・Postdoc	