

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19368

研究課題名（和文）脳内多階層ネットワーク間横断シグナルとしての浸透圧信号の機能解明

研究課題名（英文）Osmotic signal as an integrating signal in the multi level network of the brain

研究代表者

松井 広（Matsui, Ko）

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：20435530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脳内情報は、神経細胞の活動電位発火の羅列によってコード化されていると考えられてきたが、申請者は、グリア細胞からグルタミン酸が放出されており、このグリアの作用が、神経信号を強力にコントロールし、動物の行動や学習にも影響を与えていることを明らかにした。何らかの形の信号が維持でき、加算・減算することが可能で、細胞機能を左右しうるなら、何でも、情報処理の因子となり得る。本研究では、細胞内浸透圧が、脳機能を強力に左右する因子として働き、浸透圧変化を使った情報処理が行われているという仮説を提唱した。浸透圧変化に応じて開閉するチャンネルに注目し、それを介した伝達物質放出をひとつのアウトプットと捉えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体には、神経・血管・代謝・免疫など、多数のネットワークが張り巡らされ、各々が様々な機能を担っている。各ネットワークは、それぞれの法則で稼働しており、生体がひとつの個体として整合性のある活動をするには、これらのネットワークを束ねるシグナルが不可欠である。脳というひとつの臓器の中にも、上記のような複合ネットワークが存在している。この多階層性の複合ネットワークの中心にいて、全てのネットワークを束ねている存在こそ、グリア細胞である。本研究では、浸透圧信号から始まるシグナルカスケードを追跡し、異種細胞間をまたがる信号の受け渡しを解析し、生体脳システムの状態を左右しているグリアの働きを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Information in the brain is thought be encoded solely by the series of action potential firing of neurons. However, we have shown that glutamate is being released from glial cells and such glial actions strongly control neuronal signaling and ultimately affect behavior and learning in animals. Any type of signal that can be added and subtracted can be used as information unit. In this study, we hypothesized that osmotic signals in glial cells can have a strong influence on the brain function and such osmotic signals are actively used in the information processing in the brain. We have particularly focused on ionic channels that are opened and closed in response to osmotic changes and studied the transmitter release from these channels.

研究分野：脳生理学

キーワード：グリア細胞 アストロサイト 浸透圧 光遺伝学 陰イオンチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内情報は、もっぱら、神経細胞の活動電位発火の羅列によってコード化されていると考えられている。近年、私たちは、グリア細胞のうち、アストロサイトが、興奮性伝達物質グルタミン酸を放出し、グリアからの作用が、神経信号を強力にコントロールし、動物の運動や学習にも影響を与えていることを明らかにしてきた。また、このグリア放出は、細胞内浸透圧によって開閉するチャンネルを介して制御されている可能性も見えてきた。細胞の担う情報は、膜電位や Ca^{2+} だけによるものとは限らない。何らかの形で信号が維持でき、加算・減算することも可能で、かつ、細胞機能を左右するものなら、何でも、情報処理の因子になり得る。これまで、細胞内 pH が細胞内シグナルとして機能することを示してきたが、本研究では、細胞内浸透圧が、脳機能を強力に左右する因子として働き、浸透圧変化を使った情報処理が行われているという斬新な仮説を提唱した。この仮説を検証するため、細胞内浸透圧や細胞内 pH を人為的に操作する方法を開発し、これらのシグナルが制御するイオンチャンネルが脳情報処理に与える影響を明らかにすることを目的とした。

膜電位や Ca^{2+} だけでなく、細胞内浸透圧や細胞内 pH もシグナルと捉えると、ひとつの細胞が担い得る情報キャパシティの次元は、これまでの想定をはるかに越えて広がる。細胞内浸透圧が、グリア細胞においてシグナルとして機能していることは、これまでに全く想定されてこなかった。しかし、内耳組織を使った先行研究では、細胞の光透過度が刻々とダイナミックに変化する様子が観察され、これは、もっぱら内耳を構成する支持細胞の浸透圧変化に由来するものであると考えられている。また、当研究室の予備実験においても、神経の電気刺激や神経伝達物質の局所投与によって、組織光透過度が変化することを見出ししていた。

こういった細胞内浸透圧によって開閉する陰イオンチャンネルのひとつに VSOR (もしくは VRAC) が挙げられる。グルタミン酸は陰イオンであり、細胞質内にはある程度の濃度のグルタミン酸が常にあるため、孔径の大きな陰イオンチャンネルが開けば、チャンネルを介してグルタミン酸は放出され得る。本研究では、浸透圧シグナルや pH を光操作し、グリア伝達物質放出の主要な出口として、VSOR 等の陰イオンチャンネルに注目して研究を進めた。

2. 研究の目的

脳の半分以上を占めるグリア細胞には、これまで、単に、神経細胞構築を構造的に支えたり、栄養補給をしたりするくらいの役割しか想定されていなかった。しかし、本研究者の研究を通して、グリア細胞が、神経情報処理そのものに深く関与していることが明らかになってきた (Sasaki et al., PNAS, 2012; Beppu et al., Neuron, 2014)。確かに、グリア細胞には、神経回路網をミリ秒単位で刹那的に通り過ぎる信号を処理する能力はないのかもしれない。しかし、数十ミリ秒～数分のタイムコースで、周囲の神経回路の動作モードを規定しているのは、むしろ、グリア細胞の活動である可能性がある。グリア活動次第で、神経細胞間の信号の伝わりやすさや、シナプス伝達の可塑性の起こりやすさなどが変化することが解明されつつある。私たちの意識は、ゆっくりしたタイムコースで変遷するものであり、グリア活動の方が、神経活動よりも、意識との相関が高いと言えるかもしれない。本研究では、グリア細胞内浸透圧のコードする情報が、神経機能にいかに関与しているのかを明らかにし、脳が統合したシステムとして成立する機序を解明することを究極の目標とした。

細胞内浸透圧は、様々なイオンの出入りによって、常に調整されていて、いったん通常の値から少しずれてしまうと、元に戻るまでに数秒以上の時間がかかるため、確かに、一定時間、情報を記憶する因子となり得る。この浸透圧変化が何らかのアウトプット生んで初めて、浸透圧を利用した情報処理が脳機能に関わっていると言える。浸透圧変化に応じて開閉するチャンネルがあり、これを介して、神経に作用する伝達物質が放出されるので、これはひとつのアウトプットと言える。一方、浸透圧変化によってもたらされるもうひとつの効果は、細胞容積の変化である。細胞容積が変化すれば、必然的に、細胞間隙の広さも変化し、神経細胞間のシナプス伝達効率やシナプス可塑性に影響を受ける。神経細胞でもなく、グリア細胞でもない、ただの間隙が、脳内情報処理モードを強力に支配しているのかもしれないのである。本研究では、神経細胞・グリア細胞・血管をまたぎ、神経系・代謝系・免疫系を束ねる統合的シグナルのひとつとして、浸透圧信号の役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

脳の急性スライス標本を用いて、グリア細胞のひとつにパッチクランプ法を適用することで、細胞内に蛍光物質を導入し、細胞の形態を可視化する方法を用いた。細胞形態を二光子顕微鏡で観察することで、小脳バーグマングリア細胞の微細突起の形態が刻々と変化する様子が捉えられる。この方法を用いることで、細胞容積自体の変化を光計測する方法を用いた。また、細胞容積の変化にともない、赤外線微分顕微鏡像の赤外線透過率が変化することも明らかになってい

る。これらの方法を用いて、どのような刺激にともなって、浸透圧が変化して細胞容積が変化するかを調べた。また、グリア細胞膜にオプトジェネティクス分子である、ChR2 や ArchT を発現する遺伝子改変マウスを利用。光刺激にともない細胞内 pH を変化させると、細胞容積がどのように影響を受けるのかを上記 2 つの方法で検証した。

本研究では、浸透圧変化が引き金となって、グリア細胞の陰イオンチャネルの開閉が引き起こされ、この陰イオンチャネルを介して、グルタミン酸等の伝達物質が放出されるとの仮説を立てた。そこで、高張液 / 低張液等の浸透圧刺激やオプトジェネティクスを用いた細胞内 pH 操作法を用いて、細胞内浸透圧を制御し、それによって惹起されるグリア細胞から神経細胞へと向かうシグナルを検出した。浸透圧依存性のチャネルに対する薬理的阻害剤 (DCPIB) は存在するので、これを投与することでグリア細胞からのシグナルがどのように影響を受けるのかを調べた。また、近年、浸透圧依存性チャネルの分子実態が明らかになったので、分子メカニズムを明らかにするため、細胞種特異的にこの分子をロックアウトする動物を設計して作出することに取り組んだ。

4 . 研究成果

脳内グリア細胞は、Ca²⁺、pH、浸透圧の形で、細胞内の信号を短期的に保ち、それぞれの信号は、様々なグリア細胞機能に影響する。本研究では、特に、この浸透圧信号に注目し、グリア浸透圧変化を起点とした、グリア形態変化、および、グリア伝達物質放出が神経の機能に与える影響を解析した。

(1) 細胞容積変化の可視化法の開発 急性脳スライス標本を用い、パッチクランプ法を用いて、ひとつの小脳バーグマングリア細胞に Alexa594-dextran を導入し、細胞微細形態変化を二光子顕微鏡を用いてライブ観察した。Dextran のついた蛍光色素を用いることで、ギャップ結合を介して、他のグリア細胞に蛍光色素が拡散していくことを防ぎ、ひとつの細胞の形態だけをくっきりと浮かび上がらせる工夫をした。しかる後に、ケージドグルタミン酸を二光子励起することで局所的にグルタミン酸を投与し、それによる微細突起の形態変化や細胞容積の変化を観察した。興奮性グルタミン酸刺激によって細胞容積が瞬時に増大することが明らかになった。

また同様の急性スライス標本を用いて、高張液 / 低張液による細胞内浸透圧操作を行い、赤外線微分干渉顕微鏡を用いて、組織光透過度が変化するかどうかを検証した。興味深いことに、神経線維を電気刺激すると組織透過度は増大するが、抑制性伝達物質の GABA を投与すると組織透過度が減少することが明らかになった。

(2) グリア伝達物質放出の計測 グリア細胞内浸透圧変化は、浸透圧に依存して開閉する VSOR チャネルを通して、伝達物質の放出を引き起こす可能性がある。既に、グリア細胞内 pH 低下によってグルタミン酸が放出される過程については、詳細に調べている。VSOR が、浸透圧変化と pH の両方を検知している可能性を検証した。まず、グリア細胞に発現させた ChR2 を光刺激して、細胞内の pH を酸性化すると、上記イメージング法を用いて、細胞が膨張することが明らかになった。この細胞膨張時にともない、グリア細胞からグルタミン酸が放出されるが、VSOR 特異的な阻害剤 DCPIB 投与によってグルタミン酸放出が抑制されることが明らかになった。また、同様のメカニズムは、グルタミン酸トランスポーターが活性化される際にも発動され、また、シナプス前細胞の頻回刺激でもグリア細胞からのグルタミン酸放出は、VSOR 依存的に生じた。したがって、グリア細胞はシナプスからの入力を受け、浸透圧や細胞内 pH 反応が引き起こされ、これによって、グルタミン酸放出が引き起こされ、神経細胞へと興奮性のフィードバック回路が働くことが明らかにされた。

(3) 浸透圧に依存して開閉する陰チャネルの分子実態として LRRC8 が近年発見された。そこで、本研究では、グリア細胞のうち、アストロサイトに特異的に LRRC8 をロックアウトする動物を設計して作出することにした。LRRC8 は、全身の多くの細胞で発現しており、全身性のロックアウトでは致死率が高いことが知られているためである。また、アストロサイト特異性を出すプロモーターには、GLAST や GLT-1 などが知られているが、いずれも胎生期・幼弱期では、神経幹細胞でも発現を誘導することが知られているため、アストロサイトだけに特異性を出すのは容易ではない。そこで、タモキシフェンによって発現誘導される遺伝子を組み込むことで、細胞種特異的かつ時期特異的のロックアウト動物を作出することに成功した。設計等に時間がかかったため、本研究期間がちょうど終了する時期に動物が作出されたが、今後、この動物を使って、浸透圧シグナルのアウトプット過程について、分子過程を含めた研究を進めることを検討している。また、遺伝子改変動物での浸透圧アウトプットを制御できるようになったので、これを用いた *in vivo* での行動実験や病態モデルへの適用なども可能になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takata N, Sugiura Y, Yoshida K, Koizumi M, Hiroshi N, Honda K, Yano R, Komaki Y, Matsui K, Suematsu M, Mimura M, Okano H, Tanaka KF	4. 巻 66
2. 論文標題 Optogenetic astrocyte activation evokes BOLD fMRI response with oxygen consumption without neuronal activity modulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2013-2023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/glia.23454	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 Igarashi H, Ikeda K, Onimaru H, Kaneko R, Koizumi K, Beppu K, Nishizawa K, Takahashi Y, Kato F, Matsui K, Kobayashi K, Yanagawa Y, Muramatsu S, Ishizuka T, Yawo H	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeted expression of step-function opsins in transgenic rats for optogenetic studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-018-23810-8	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 常松 友美、森澤 陽介、松井 広	4. 巻 36
2. 論文標題 睡眠の光操作とグリア細胞機能の役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 925-928
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11件（うち招待講演 10件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Ko Matsui
2. 発表標題 Glial optogenetics for understanding the cross talk between metabolism and information processing
3. 学会等名 9th FAOPS（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Morizawa, Ko Matsui
2. 発表標題 Role of glial phagocytosis of synapses in physiological memory engravement process
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Glial Biology) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ko Matsui
2. 発表標題 Glial control of neuronal information processing
3. 学会等名 TU-UCL Neuroscience Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ko Matsui
2. 発表標題 Glial control of neuronal information processing
3. 学会等名 Heinrich-Heine-University Dusseldorf Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Onodera, Jan Meyer, Christine Rose, Ko Matsui
2. 発表標題 Malfunction of potassium extrusion as a major cause of chronic epilepsy
3. 学会等名 Japanese-German YoungGlial collaborative meeting for mutual research exchange (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ko Matsui
2. 発表標題 Glial control of neuronal information processing
3. 学会等名 Japanese-German YoungGlial collaborative meeting for mutual research exchange (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井広
2. 発表標題 代謝機能の光操作 / 光計測による脳情報解析と病態制御
3. 学会等名 第二回 ニコン顕微鏡イメージングフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井広
2. 発表標題 Cross talk between metabolism and information processing
3. 学会等名 第23回グリア研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ko Matsui
2. 発表標題 Multimodal expression and control of brain information
3. 学会等名 The 2nd FRIS-TFC Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井広
2. 発表標題 グリア細胞の光操作で探る脳の機能と心の成り立ち
3. 学会等名 第3回 感性・身体性感性技術分科会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井広
2. 発表標題 オプトジェネティクスによる神経発振制御とグリア細胞の役割
3. 学会等名 第15回てんかん包括医療東北研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本基礎心理学会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 608
3. 書名 基礎心理学実験法ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学・超回路脳機能分野 http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/</p>

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
--	---------------------------	-----------------------	----