

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15213

研究課題名（和文）海馬神経細胞－アストロサイトによる4種類の三者間シナプスの形成機構

研究課題名（英文）Mechanisms of Formation of Four Types of Tripartite Synapses in Hippocampal Neurons and Astrocytes

研究代表者

塩谷 元 (Shiotani, Hajime)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20838338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：脳の複雑な神経ネットワークでは、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の軸索終末が同種または異種の神経細胞の樹状突起上に形成する4種類のシナプスに対し、アストロサイト突起がそれぞれに接着して形成される三者間シナプスによって神経伝達の調節が行われている。本研究では、海馬神経細胞とアストロサイトの二者共培養系を用いて4種類それぞれの三者間シナプスを形成する細胞間接着分子を同定した。興奮性神経細胞上の興奮性シナプス、また抑制性神経細胞上の興奮性シナプスについてはその成果を取りまとめ、残り2種類のシナプスについても概ねの知見を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプスの形成機構および機能については国内外で精力的に研究されている一方、シナプスとアストロサイトの微細突起間に形成される三者間シナプスの形成機構は不明な点が多かった。本研究では、形態学的にも機能的にも生体内のアストロサイトに近い培養が可能な神経細胞との二者共培養系を用い、三者間シナプスの形成機構、特にこれまでほぼ不明であった抑制性の三者間シナプス形成における細胞接着分子の役割を解明できた。細胞接着分子による神経回路の形成・維持機構が解明されれば、三者間シナプスが疾患の発症・進展に関与する精神神経疾患の新しい診断法や治療法の開発にも繋がる可能性があり、生物学的・医学的・社会的にも意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In the complex neural networks of the brain, neurotransmission is regulated by four types of synapses formed by axon terminals of excitatory and inhibitory neurons on dendrites of the same or different types of neurons, as well as by tripartite synapses formed by astrocyte processes attached to each. In this study, we identified cell adhesion molecules that mediate tripartite synapse formation using an in vitro neuron-astrocyte co-culture system. Our findings for excitatory synapses on excitatory neurons and on inhibitory neurons have been compiled, and the data for the other two types of tripartite synapses were also obtained.

研究分野：脳神経科学

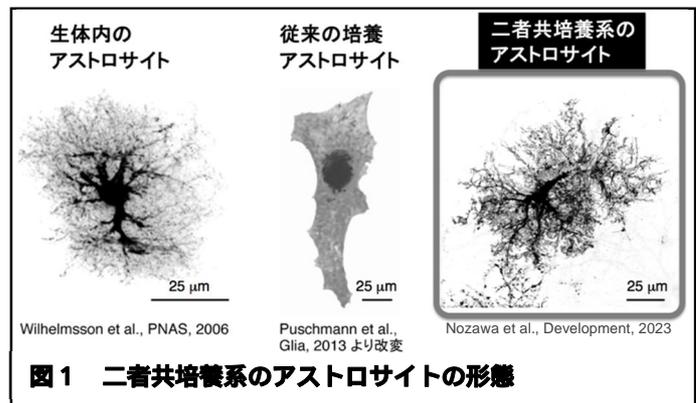
キーワード：三者間シナプス アストロサイト 神経細胞 海馬 細胞接着分子 Necl グルタミン酸輸送体 GABA 作動性神経細胞

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

シナプスは古くから研究されてきており、これまでにカドヘリンや免疫グロブリン様分子、ニューレキシンやニューロリギンなど多くの接着分子が同定され、その機能と作用機構が解明されてきた。代表者の所属する研究室では、海馬 CA3 領域における苔状線維シナプスの形成には、カドヘリンと共に免疫グロブリン様接着分子であるネクチン-1 と-3 が PAJ と呼ばれている接着装置を形成していることを解明している。一方、マウス嗅球外網状層の側方樹状突起間では、ネクチン-1 がホモフィリックに結合し、カドヘリン非依存的な接着装置(ネクチン-1 スポットと命名)を形成して、その樹状突起の枝分かれを制御していることも解明している。他方、ネクチン-2 は、主に上皮細胞や内皮細胞、心筋細胞などの同種細胞間対称性の接着で機能していることを解明していたが、その神経細胞での役割は長らく不明であった。代表者は、ネクチン-2 がマウス脳で内側手綱核のコリン作動性神経細胞に発現し、コリン作動性神経細胞体同士の接着装置として機能していることを見出した (*J. Comp. Neurol.*, 2018)。この接着装置はカドヘリン非依存的なネクチン-2 スポットであり、電位依存性カリウムチャンネル Kv4.2 の膜表面への集積を制御していた (*Mol. Cell. Neurosci.*, 2019)。さらに、ネクチン-2 は、中隔核や分界条から投射される軸索終末とコリン作動性神経細胞の樹状突起とで形成されるシナプス領域にも局在して、カドヘリンと共に樹状突起-樹状突起間に PAJ を形成し、樹状突起の走行を介してシナプスの数を制御していることも明らかにした (*J. Comp. Neurol.*, 2021)。

代表者は、その後これらの成果に基づいて、三者間シナプスの形成機構の解析を進めていた。三者間シナプスは多くのシナプスにおいてアストロサイトの微細突起(PAP)と接着して形成される。この PAP は、シナプスの形成と機能に関与していると共に、シナプス間隙に過剰に放出されたグルタミン酸をそのトランスポーターである EAAT1/2 を介して回収する。その結果、近傍のシナプスへのグルタミン酸の空間的拡散を阻止すると共に、



シナプス間隙のグルタミン酸濃度を調節し、シグナル持続時間を制限して恒常的に正確なシグナルを伝達する。さらに、PAP の EAAT1/2 は過剰なグルタミン酸による神経細胞死を抑制している。また、PAP にはシナプスから放出される K^+ をアストロサイトに取り込む K^+ チャンネルである Kir4.1 も集積しており、この Kir4.1 は過剰 K^+ によるてんかんの発症とそれによる神経細胞死を防いでいる。しかし、PAP とシナプスとの接着の機構と役割については、生体内に近い形態を示すアストロサイトの培養法が確立されていなかったため、十分には理解されていなかった。代表者は、神経細胞とアストロサイトをマウス脳から調製して、形態学的にも機能的にも生体内と酷似した三者間シナプスを形成する *in vitro* 二者共培養系を開発した(図1、*Development*, 2023)。この神経細胞-アストロサイト二者共培養系では、神経活動により個々のシナプスから分泌されたグルタミン酸が、グルタミン酸受容体 mGluR5 を介してアストロサイトの複雑な枝分かれを誘導して PAP を形成した。また、興奮性と抑制性の三者間シナプスがそれぞれ興奮性と抑制性の神経細胞上に計4種類が形成されており(図2)、興奮性神経細胞上の興奮性三者間シナプス形成にはネクチン様細胞間接着分子 Necl ファミリー(Necl-1 から-5 の5種類のメンバーから構成されている)のうちアストロサイトの Necl-2 と神経軸索の Necl-3 が、興奮性神経細胞上の興奮性の三者間シナプスの形成に関与していることを見出した。しかし、興奮性神

神経細胞上の興奮性の三者間シナプス以外の三者間シナプスの形成機構は未解明であった。脳の神経回路の形成機構を総合的に理解するためには、4種類すべてのシナプスの形成機構の解明が必要である。そこで本研究では、この二者共培養系に加え、当研究室の保有する各種 *Necl* 遺伝子欠損マウスの組織学的解析を組み合わせ、4種類のうち、残る3種類の三者間シナプスについてその形成機構を解析したいと考えた。

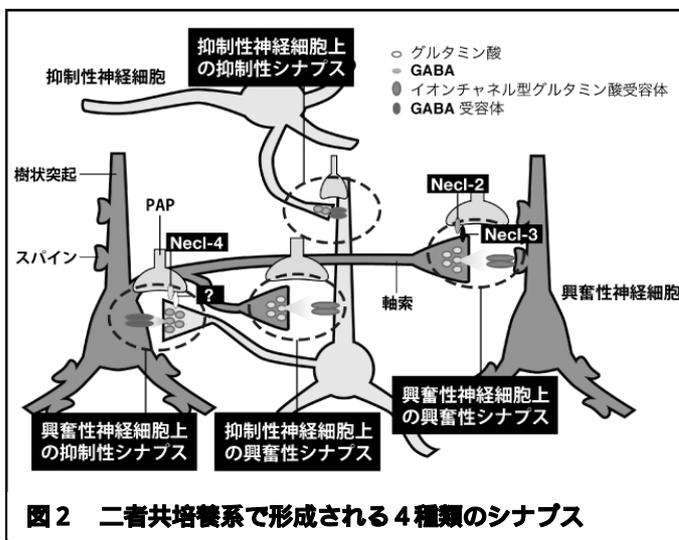


図2 二者共培養系で形成される4種類のシナプス

2. 研究の目的

本研究では、海馬での神経回路の形成機構を理解するために、4種類の三者間シナプスすべての形成機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **神経単独培養での4種類のシナプスに局在する *Necl* の同定と機能の解明** : *Necl* ファミリーメンバーのどの *Necl* がどのシナプスに局在するのには十分に明らかになっていない。そこでまず、マウス海馬から神経細胞を単独培養して、計4種類のシナプスすべてのシナプスにおける各 *Necl* の局在を解析した。すでに4種類のシナプスそれぞれを同定する染色マーカーは確定済みであり、さらに前シナプス、後シナプス、PAPの位置も染色により同定可能となっていた。まず、野生型の培養系で各シナプスにおける *Necl* の同定を行い、位置関係を明らかにした上で、各トランスミッターの受容体やトランスポーター分子の阻害剤や拮抗薬を用いて機能を詳細に分析した。また、各種 *Necl* 遺伝子欠損マウスの海馬から調製した神経細胞を単独培養し、野生型培養系との比較や遺伝子の強制発現実験を通して各 *Necl* のそれぞれの種類におけるシナプスでの機能を決定した。

(2) **神経細胞-アストロサイト二者共培養系での4種類の三者間シナプスの PAP に局在する *Necl* の同定と機能の解明** : 神経細胞-アストロサイト二者共培養系で形成される興奮性神経細胞上の興奮性三者間シナプス以外の3種類の三者間シナプスの PAP における、*Necl*-2 と *Necl*-4 の局在とその局在機構は不明である。*Necl*-3 は神経細胞のみに発現しており、アストロサイトに発現していないので、神経細胞の *Necl*-3 が PAP の *Necl*-2 と *Necl*-4 と結合して共局在している可能性があった。この可能性を *Necl*-3 遺伝子欠損マウスから調製した神経細胞とアストロサイトとの二者共培養系で、あるいは神経細胞と *Necl*-2 あるいは *Necl*-4 遺伝子欠損マウスから調製したアストロサイトとの二者共培養系で解析した。*Necl*-1 は神経細胞にもアストロサイトにも発現しているが、その局在と機能は不明である。この分子についても同様に解析した。*Necl* はシナプスにも PAP にも発現しているため、免疫電子顕微鏡法を用いて解析した。また、グルタミン酸トランスポーター-*EAAT*1/2 と GABA トランスポーター-*GAT*1/2/3 および *Kir*4.1 などの PAP の機能性分子局在における *Necl* の関与と機能および作用機構を解析した。

(3) **海馬での4種類の三者間シナプスに局在する *Necl* の同定と機能の解明** : (1) と (2) の解析の結果に基

づいて、4種類それぞれの三者間シナプスで同定される Necl の局在と機能が実際生体内でも認められるかを各種 *Necl* 遺伝子欠損マウスの海馬において解析した。

4. 研究成果

- (1) **二者共培養系における興奮性神経細胞上の興奮性シナプス (A シナプス) の解析**：マウス海馬で A シナプスの顕著な集積が見られる CA3 野透明層における局在解析から、細胞接着分子 Necl-1 から Necl-4 のうち、Necl-2 と Necl-3 に強い集積が観察された。そこで、培養細胞の神経細胞とアストロサイトでタンパク質の発現を解析したところ、Necl-2 はいずれの細胞にも発現していたが、Necl-3 は神経細胞のみで発現していることが明らかとなった。培養環境下で、Necl-2/-3 が局在している A シナプスには高頻度で EAAT2 のシグナルも共局在しており、このことから機能分子の局在への関与を解析した。Necl-2 欠損アストロサイトを野生型神経細胞、または Necl-3 欠損神経細胞と共培養したところ、いずれの場合も EAAT1/2、Kir4.1 の局在が極端に減少した。また、Necl-3 欠損神経細胞を野生型アストロサイトと共培養したところ、EAAT1/2、Kir4.1 の局在がシナプス近傍から離れた場所に変化することが確認された。これらの結果から、Necl-2/-3 いずれの分子も機能分子のシナプス近傍へのリクルートに重要であることが明らかとなった。また、野生型神経細胞と野生型アストロサイトを共培養したものと、野生型神経細胞と Necl-2 を強制発現させたアストロサイトを共培養したものを電気生理学的に解析したところ、微小シナプス電流の振幅幅に違いはなかったものの、後者の組み合わせにおいてその頻度が増加していることがわかった。この結果から、アストロサイトの Necl-2 の増加が軸索の Necl-3 との相互作用によってシナプスにおける AMPA 受容体およびグルタミン酸放出部位などを増加させる可能性が示唆され、実際に細胞染色によっても VGLUT1 などのマーカー分子の増加が確認された。
- (2) **海馬組織における A シナプスの解析**：前述のように、マウス海馬組織において Necl-2 と Necl-3 は、CA3 野透明層に特に顕著な集積が確認される。免疫電子顕微鏡解析により、Necl-2 は錐体細胞樹状突起に面したアストロサイトや、苔状繊維軸索終末に面した錐体細胞の樹状突起に局在し、Necl-3 はアストロサイトまたは錐体細胞樹状突起に面した苔状繊維軸索終末への局在することが認められた。これらの結果から、Necl-2 と Necl-3 の局在については共培養下での観察結果と齟齬がないことが改めて確認された。次に、各種遺伝子欠損マウスにおいて CA3 野透明層での解析を行った。Necl-2 欠損マウスの解析では、予想に反して Necl-3、さらに EAAT2 などの機能分子のシグナル減弱が観察されず、培養下での観察結果と異なる結果となった。その理由として、生体内では Necl-2 機能の発達の補填がある可能性や、Necl-2 の代わりに Necl-3 と相互作用する未同定の因子が代替しているなどの可能性が考えられた。Necl-3 欠損マウスでは、CA3 野透明層での Necl-2 の局在の顕著な減少が認められ、また、EAAT2 のシグナル陰性の空間占有率の増加が認められたものの、シナプス近傍からの位置的な変化などは認められなかった。Necl-2 と Necl-3 を両方とも欠損させると、シナプス周囲を覆っている EAAT2 の断片化が認められ、シナプスそのものの大きさには変化が認められなかったものの近傍の EAAT2 被覆面積の有意な減少が認められた。以上から、生体内では発達に伴う冗長性が認められるものの、Necl-2 と Necl-3 の A シナプスにおける機能について、培養下での観察結果と概ね矛盾しない結果を得ることができた。
- (3) **二者共培養系における抑制性神経細胞上の興奮性シナプス (B シナプス) の解析**：A シナプスで得た知見から、VGLUT1 のシグナル近傍の PAP および後シナプスには Necl-2 が局在している可能性が考えられた。

抑制性神経細胞の後シナプスにも同様の局在が見られるかどうかを調べるために、Necl-2欠損またはNecl-3欠損神経細胞とNecl-2欠損アストロサイトなどの組み合わせで共培養を行い、局在解析を行った。その結果、Bシナプスにおいても後シナプスのNecl-2、前シナプスのNecl-3、およびPAPのNecl-2が相互作用することが明らかになり、本質的にはAシナプスと同様の局在を示すことを明らかにした。また、野生型のアストロサイトと神経細胞の共培養下でNecl-2の細胞外領域のフラグメントを添加することによって、AシナプスとBシナプスの両方においてアストロサイト突起のシナプスへの到達率が顕著に減少したことから、Nec-2とNecl-3の相互作用が三者間シナプスの形成に重要であることが示された。さらに、BシナプスにおいてもAシナプスと同様に、Necl-2とNecl-3の相互作用がEAAT1やEAAT2、Kir4.1などの機能分子のリクルートに寄与することが確認された。

- (4) **海馬組織におけるBシナプスの解析**：海馬CA1野放線状層におけるシャフアー側枝の軸索末端とPV陽性神経細胞の樹状突起上に形成されるシナプスを観察対象として、生体でのBシナプスの解析を行った。培養下での解析結果と同様に、生体におけるBシナプスでもVGLUT1シグナルの近傍にNecl-2とNecl-3のシグナルの局在が観察された。PV陽性細胞の樹状突起上のEAAT1のシグナルは、錐体細胞の樹状突起上のAシナプスと同様に70%以上がその近傍で局在が確認されたが、Bシナプス近傍のNecl-2シグナルと共局在するEAAT1の割合は、Aシナプスに比べて部分的であった。免疫電子顕微鏡解析により、Necl-2は軸索末端に面したアストロサイト突起と、軸索末端に面したPV陽性細胞の樹状突起に、Necl-3はアストロサイト、または樹状突起に面した軸索末端にその局在が確認された。これらの結果から、Bシナプスの三者間シナプスにおけるNecl-2とNecl-3の局在について、培養細胞や組織切片の観察結果と齟齬がないことが確認された。Necl-2とNecl-3の両方を遺伝子欠損させた個体の組織解析を行ったところ、まずCA1野全体においてEAAT1のシグナルの縮小が確認された。また、SIMでBシナプス周囲の詳細な観察を行ったところ、VGLUT1と共局在するEAAT1の割合が、野生型と比較して遺伝子欠損マウスで顕著に減少していることも確認された。これらの結果から、培養細胞下で観察されたNecl-2とNecl-3の相互作用による機能分子の局在の制御機構が、生体でも確認された。

Aシナプスに関する(1)と(2)の知見については論文として発表し(*Development*, 2023)、Bシナプスに関する(3)と(4)の知見については論文投稿中である。興奮性神経細胞上の抑制性シナプス(Cシナプス)、抑制性神経細胞上の抑制性シナプス(Dシナプス)についても並行して解析を進め三者間シナプスを形成する接着分子をすでに同定し、また一部の機能についても明らかにしつつある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nozawa Osamu, Miyata Muneaki, Shiotani Hajime, Kameyama Takeshi, Komaki Ryouhei, Shimizu Tatsuhiro, Kuriu Toshihiko, Kashiwagi Yutaro, Sato Yuka, Koebisu Michinori, Aiba Atsu, Okabe Shigeo, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi	4. 巻 150(4)
2. 論文標題 Nec12/3-mediated mechanism for tripartite synapse formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 12-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.200931	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------