

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650218

研究課題名（和文） グリア細胞が呼吸をトリガーする一新パラダイムの検証

研究課題名（英文） Astrocytes drive respiratory rhythm - testing a new paradigm

研究代表者

越久 仁敬 (OKU YOSHITAKA)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20252512

研究成果の概要（和文）：

吸息活動は、延髄内の pre-Bötzinger complex (preBötC) という場所で起こる。従来の説では、呼吸リズムは preBötC の神経細胞（ニューロン）が作り出しており、脳のもう一つの主要な構成細胞であるグリア細胞は、ニューロン周囲の細胞外環境を維持する程度の役割しか演じていないと考えられていた。本研究において、我々は、吸息時に活動するニューロンに先行して活動を開始するアストロサイト（グリア細胞の一種）を発見した。ニューロン活動のみを抑えるフグ毒のテトロドトキシンを投与すると、ニューロン活動および呼吸神経出力は消失したが、これらのアストロサイトの周期的な自発活動は残った。さらに、光を照射すると細胞を活性化させるイオンチャネルであるチャンネルロドプシン2を、アストロサイトにのみ発現させた遺伝子改変マウスを用い、preBötC 領域のアストロサイトを光照射で興奮させると、吸息性ニューロンの活動を惹起させることができた。これらの結果は、アストロサイトが preBötC 領域において呼吸リズム形成に積極的に関与していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

The inspiratory activity originates from a medullary region called the pre-Bötzinger complex (preBötC). Traditionally, it has been hypothesized that the respiratory rhythm is generated by the preBötC neurons. Glial cells, another major cellular component of the brain, are thought to maintain extracellular environment around neurons, playing less important roles on the respiratory rhythm generation. In the present study, we discovered astrocytes (a kind of glial cell) whose activity preceded inspiratory neuronal activity. After the application of tetrodotoxin, which suppresses only neuronal activity, respiratory neuronal output disappeared, but these astrocytes maintained their rhythmic activities. In addition, in transgenic mice that expressed channelrhodopsin2 only on astrocytes, photo-stimulation of preBötC astrocytes induced firing of inspiratory neurons. Channelrhodopsin2 is an ion channel that activates the cell when a light is emitted. These findings suggest that astrocytes in the preBötC are actively involved in the respiratory rhythm generation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：ニューロングリア相互作用

1. 研究開始当初の背景

呼吸リズムは、現在まで、脳幹内の興奮性および抑制性ニューロンから構成される神経回路網によって作られると考えられてきた。グリア細胞は、一般的に、ニューロンの物理的および代謝的支持組織と考えられていた。しかし今や、様々な神経伝達物質に対する受容体を発現し、グルタミン酸やATPといったグリア伝達物質 (gliotransmitter) を放出して、直接ニューロン活動に影響を与えることが明らかとなっている (Haydon and Carmignoto, *Physiol Rev*, 2006)。我々は、2000年に呼吸リズムを保持する脳スライス標本 (リズムスライス標本) において、グリア細胞のクレブス回路を特異的に阻害することによって呼吸活動が著しく抑制されることを見出し、グリア細胞が呼吸リズム生成機構において重要な役割を果たしていることを報告した (Hülsmann S, Oku Y et al., *Eur J Neurosci*, 2000)。当初、我々は、この呼吸抑制はグリア細胞によるグルタミン酸-グルタミンサイクルが遮断されることにより前シナプス終末において興奮性シナプス伝達物質であるグルタミン酸が枯渇することが原因と考えていた。最近の研究 (Huxtable et al., *J Neurosci*, 2010) では、グリア細胞機能を阻害することによって、ATPに対するグリア細胞のCa応答が减弱すると共に、呼吸リズム生成機構の応答性も低下することが示されている。

2. 研究の目的

グリア細胞活動がグリア伝達物質を介してニューロン活動に影響を与えることは知られているが、巨視的な神経回路出力にどのように関わっているかについては、ほとんど分かっていない。呼吸リズムを保持する脳スライス標本は、神経回路出力が自発的な呼吸活動として計測可能なため、神経回路レベルでのグリア細胞活動の機能的役割を解明するのに適した実験モデルである。本研究は、リズムスライス標本を用いてグリア細胞の呼吸リズム生成機構における役割を詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

呼吸スライス標本において、ニポードディスク共焦点スキャナ (CSU-X1; 横河電機製) にて preBötC 領域の Ca イメージングを行い、preBötC 領域の吸息性リズム活動に関連する細胞の Ca 動態を解析した。具体的には、幼若マウス脳幹より、preBötC を含み、呼吸活

動を維持するリズムスライス標本を作成する (Oku et al., *J Physiol*, 2007; Okada et al., *Eur J Neurosci*, 2007)。Ca イメージング実験では、preBötC 領域に Ca 指示薬 (Oregon Green 488 BAPTA-1 AM, OGB1) を注入し、呼吸活動に伴う preBötC グリア細胞/ニューロンのイメージングを行った (図 1)。

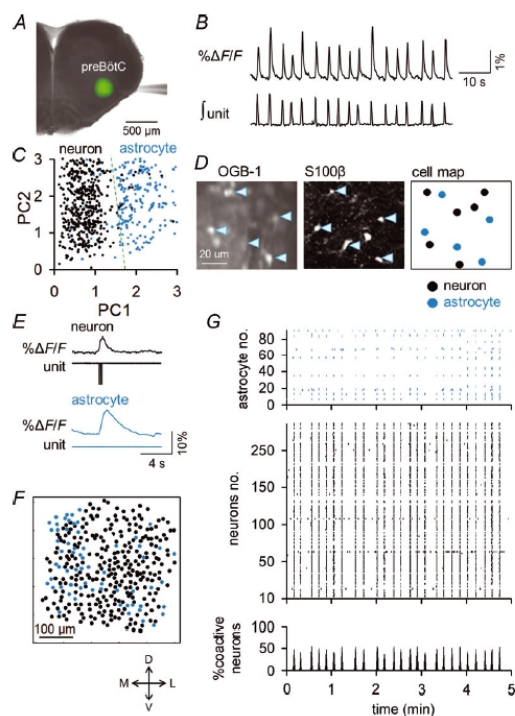


図 1. preBötC 領域における多細胞 Ca イメージング (Okada et al. *J Physiol*, 2012 より引用) **A**: リズムスライス標本の preBötC 領域に OGB1 (緑色) をボラス注入。**B**: preBötC 領域の平均蛍光 (上段) の変動は吸息性ユニット活動積分波形 (下段) と相関した。**C**: Ca 信号の主成分 (PC) 分析によるニューロンとアストロサイトの機能的分類。**D**: OGB1 イメージング (左) 後の S100β 免疫反応 (中) に基づくニューロンとアストロサイトの免疫化学的分類。**E**: ニューロン (上段) とアストロサイト (下段) からの Ca イメージング ($\Delta F/F$) とセルアタッチ (unit) の同時記録。**F**: ビデオ画面におけるニューロンとアストロサイトの局在。**G**: F で記録されたニューロンとアストロサイトのラスタプロット。下段のヒストグラムはニューロンの同期率を示す。図 C-G において、ニューロンとアストロサイトは、それぞれ黒色、青色で示される。

ニューロンとグリア細胞（アストロサイト）の判別は、細胞の大きさ（アストロサイトは細胞体が小さい）とCa動態（アストロサイトは明るく、rise timeが長く、応答が大きく、減衰時定数が長い）によって行った。さらにデータの次元を主成分分析法によって低次元化した後に、サポートベクターマシンを適用（図1Cの点線）することで、判別の自動化を行った。しかし、この判別法は複雑で、高度の技術を要するため、よりシンプルな判別法として、(1) Sulforhodamine 101 に対する染色性（グリア細胞特異的とされる）を指標とする方法、(2) phenylephrineや高濃度（13mM）K⁺に対する反応性を指標とする方法、(3) グリア細胞特異的のプロモーター（GFAP）制御下に蛍光蛋白質EGFPを発現したトランスジェニックマウス（Tgマウス）を用いる方法、(4) GFAP制御下にCa感受性蛍光蛋白質を発現させたTg動物を作成して用いる方法を検討した。得られたCa信号は、吸息性バーストの開始点を基準としてcycle-triggered averagingし、Ca $\Delta F/F$ 活動と呼吸活動との関連性について検討した。

さらに、tetracycline transactivator (tTA) マウスと tet0-channelrhodopsin-2 (ChR2) マウスを使った”KENGE-tetシステム”によりアストロサイト選択的に改変型ChR2を発現させたTgマウス (Tanaka K et al, Cell Rep, 2012) を用いて、preBötC領域アストロサイトの光刺激（optogenetic stimulation）を行い、preBötCアストロサイトの脱分極が呼吸性ニューロンの脱分極を惹起させるか否かを検討した。

4. 研究成果

preBötC領域における多細胞Caイメージングデータにおいて、個々の細胞を同定し、上記方法によってニューロンとアストロサイトを判別した結果、アストロサイトのCa $\Delta F/F$ 活動は、前吸息性 (type 1)、吸息性 (type 2)、非呼吸性 (type 3)、非活動性 (type 4) の4タイプに分類された (図2)。前吸息性アストロサイトでは、吸息性のニューロン活動より約2秒早く活動が起きた。前吸息性アストロサイトは、全アストロサイトの10.5%を占めたが、その空間分布には何ら特徴を見いだせなかった。また、3.2%のアストロサイトは吸息性活動とは無関係な自発的活動をしており、残りの86.3%のアストロサイトでは、吸息性の $\Delta F/F$ 応答が見られるか、全く活動が見られなかった。

吸息性アストロサイトと分類されたものの中には、蛍光の混入によって非活動性のものが吸息性と分類されたケースがある可能性も完全には否定できないため、吸息性アストロサイトと非活動性アストロサイトの厳密な区別は行わなかった。

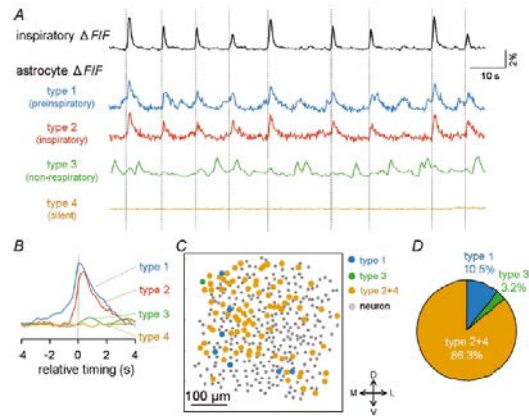


図2. アストロサイトと考えられる細胞の呼吸性活動 (Okada et al. J Physiol, 2012 より引用) **A**: 前吸息性 (type 1)、吸息性 (type 2)、非呼吸性 (type 3)、非活動性 (type 4) アストロサイトの代表的な Ca $\Delta F/F$ トレース。上段は preBötC 領域の平均蛍光変動。**B**: 吸息相開始時で 20 回の cycle triggered averaging を行った前吸息性、吸息性、非呼吸性、非活動性アストロサイトの吸息相付近での $\Delta F/F$ 応答。**C**: ニューロンと 4 タイプのアストロサイトの代表的な局在。**D**: 14 動画から 541 個のアストロサイトをタイプ分けした結果。

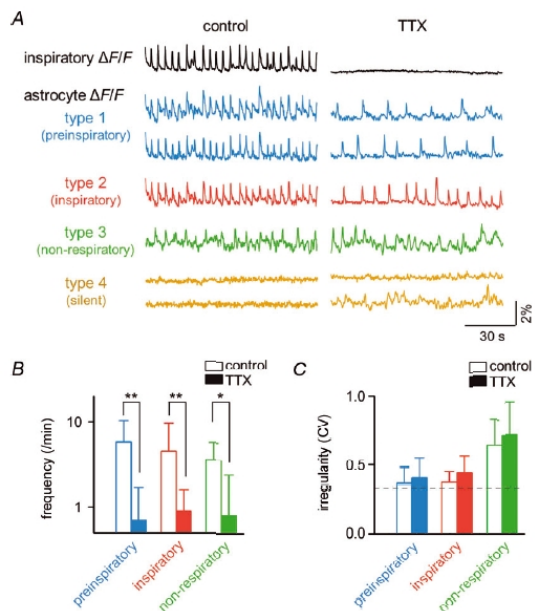


図3. アストロサイトの内因性周期性活動 (Okada et al. J Physiol, 2012 より引用) **A**: TTX 投与前後の preBötC 領域全体の $\Delta F/F$ トレース (上段) と前吸息性、吸息性、非呼吸性、非活動性アストロサイトの Ca $\Delta F/F$ トレース。**B**: TTX 投与前 (白抜き) と投与後 (塗りつぶし) の前吸息性 (青)、吸息性 (赤)、非呼吸性 (緑) アストロサイト周期性 Ca 活動の平均周波数。**C**: TTX 投与前後のアストロサイト周期性活動の変動係数。 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, paired t-test.

次にニューロン活動の影響を除去した時にアストロサイトがどのような活動をするかを検討するために、リズムスライス標本の灌流液中に電位依存性Na⁺チャンネル阻害薬であるテトロドトキシン (TTX, 1μM) を添加したところ、ニューロンの活動は停止し、type 1-3のアストロサイトの活動頻度は著しく減少したが、変動係数で評価した活動周期の規則性は変わらなかった (図3)。

我々は、さらに preBötC アストロサイトの機能的役割を検討するために、ChR2 (C128S)-YFP Tg マウスを用いて、preBötC 中心部のアストロサイトの選択的な光刺激を行い、preBötC アストロサイトが吸気性ニューロンを脱分極させることができるかどうかを検討した。ChR2 は光刺激を止めるとすぐに不活性化されるので、我々は C128S 点変異を施し、二つの異なる波長でステップ状に膜電位を活性化/不活性化できるよう工夫した。この光学特性により、アストロサイトの遅い Ca 動態を模した刺激を与えることが可能となった。

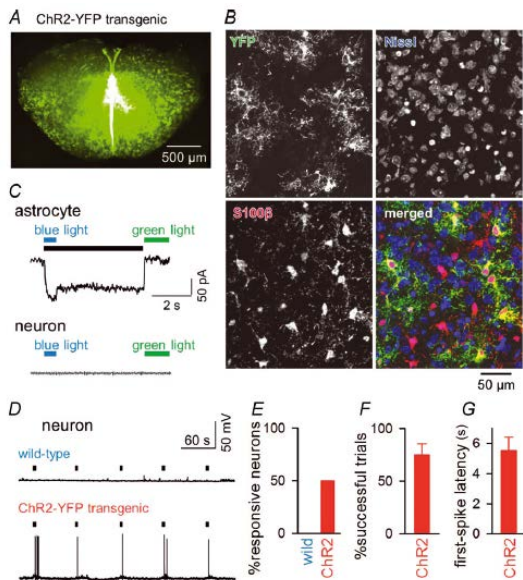


図 4. アストロサイト活動により励起された吸気性ニューロン活動電位 (Okada et al. J Physiol, 2012 より引用) **A:** Mlc1-tTA::tet0-ChR2(C128S)-YFP Tg マウス。**B:** ChR2 発現細胞を示す YFP 免疫染色 (緑)、ニューロン細胞体を示すニッスル染色 (青)、アストロサイトを同定する S100β 免疫染色 (赤) の 3 重蛍光染色。ChR2-YFP1 は S100β 陽性細胞のみに認められ、ChR2 がアストロサイト特異的に発現していることを示す。**C:** -70mV に電位固定された細胞における持続的内向き電流のスイッチオン (青色光) とスイッチオフ (緑色光) は ChR2 を発現するアストロサイト (上段) のみで見られ、ニューロン (下段) では認めない。

図 4 (続き) . D: アストロサイトの光刺激は ChR2(C128S)-YFP Tg マウスにおいて、preBötC 吸気性ニューロンの活動電位を引き起こした (上段) が、wild 動物では起こさなかった (下段)。**E:** wild 動物 (n=9) と ChR2(C128S)-YFP Tg 動物 (5 匹、n=16) におけるアストロサイト光刺激のニューロン発火誘発率。**F:** 発火が誘発されたニューロン (n=8) における発火誘発成功率。**G:** 光刺激から最初の発火までの潜時 (n=8 ニューロン)。

”KENGE-tet システム”によりアストロサイト選択的に改変型 ChR2 を発現させた Tg マウスにおいて、ニューロンの細胞体を特異的に染色するニッスル染色と YFP および S100β 蛋白質の免疫染色を同時に行ったところ、45% の S100β 陽性細胞は YFP も発現していたのに対して、YFP とニッスル染色のオーバーラップは全くなかった。さらに 1μM TTX と 50μM CNQX 存在下にニューロンとアストロサイトをランダムにホールセルパッチクランプ記録したところ、アストロサイトのみ (5/9 細胞) に光刺激に応答した内向き電流が観測された。これらの結果は、ChR2 (C128S)-YFP が (一部の) アストロサイトに選択的に発現していることを示している。この Tg マウスを用いて preBötC 中心部のアストロサイトの選択的な光刺激を行ったところ、8/16 の preBötC 吸気性ニューロンにおいて単発性あるいはバースト性の活動電位が観測された。以上の結果は、リズムスライス標本において preBötC アストロサイトが呼吸リズム形成に積極的に関与している可能性を示している。従来の preBötC におけるリズム生成メカニズムとしては、preBötC の興奮性ニューロンが相互に影響し合っ て樹状突起の Ca⁺⁺ 濃度を上昇させ、非特異的陽イオン電流を活性化させて吸気活動を引き起こす、というグループペースメーカー説 (Rekling & Feldman, Ann Rev Physiol, 1998) が注目されていた。我々の実験結果は、樹状突起の Ca⁺⁺ 濃度上昇の少なくとも一部がアストロサイト由来であることを示唆している。本研究成果は J Physiol に報告した。

研究をさらに発展させるためには、ニューロンとアストロサイトがよりシンプルに判別できる実験系が必要と考え、以下の検討を行っている。

(1) Sulforhodamine 101 に対する染色性を指標とする方法—海馬ではグリア細胞特異的とされているが、我々が検討したところ、延髄ではグリア細胞特異的ではないことが判明した。ゲッティンゲン大学のグループも同様の結論を示している (Schnell et al, Plos One, 2012)。

(2) phenylephrine や高濃度 (13mM) K⁺ に対する反応性を指標とする方法—phenylephrine

に対するニューロンとアストロサイトの応答性の差は定性的特徴がなく、それによって判別することは困難と判断した。高濃度 (13mM) K⁺に対する反応性には、定性的な差違がみられるため有望と考え、現在検討中である。

(3) グリア細胞特異的プロモーター (GFAP) 制御下に蛍光蛋白質 EGFP を発現した Tg マウスを用いる方法については今後検討する予定である。

(4) GFAP 制御下に Ca 感受性蛍光蛋白質を発現させた Tg 動物を作製する方法—GFAP 制御下に赤色蛍光蛋白質は発現するが、GCaMP2 ではうまく機能しなかった。改変した GFAP 制御下で Case12 の発現と機能は確認できおり、現在、この Tg 動物の作製を進めている。

参考文献：

Haydon PG & Carmignoto G (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* **86**, 1009-1031.

Hülsmann S, Oku Y, Zhang W & Richter DW (2000). Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur J Neurosci* **12**, 856-862.

Huxtable AG, Zwicker JD, Alvares TS, Ruangkittisakul A, Fang X, Hahn LB, Posse de Chaves E, Baker GB, Ballanyi K & Funk GD (2010). Glia contribute to the purinergic modulation of inspiratory rhythm-generating networks. *J Neurosci* **30**, 3947-3958.

Okada Y, Masumiya H, Tamura Y & Oku Y (2007). Respiratory and metabolic acidosis differentially affect the respiratory neuronal network in the ventral medulla of neonatal rats. *Eur J Neurosci* **26**, 2834-2843.

Oku Y, Masumiya H & Okada Y (2007). Postnatal developmental changes in activation profiles of the respiratory neuronal network in the rat ventral medulla. *J Physiol* **585**, 175-186.

Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K & Yamanaka A (2012). Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep* **2**, 397-406.

Rekling JC & Feldman JL (1998).

PreBötzing complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol* **60**, 385-405.

Schnell C, Hagos Y & Hülsmann S (2012). Active sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes. *PLoS One* **7**, e49398.

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1件)

1. Okada Y, Sasaki T, Oku Y, Takahashi N, Seki M, Ujita S, Tanaka KF, Matsuki N & Ikegaya Y (2012). Preinspiratory calcium rise in putative pre-Bötzing complex astrocytes. *J Physiol* **590**, 4933-44. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.231464

[学会発表] (計1件)

1. Okada Y. Respiratory rhythm is driven by astrocytes in the preBötzing complex. (Symposium) The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan 2013. 3. 27-29, Tokyo.

[その他]

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/phs1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越久 仁敬 (OKU YOSHITAKA)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20252512

(2) 研究分担者

岡田 泰昌 (OKADA YASUMASA)
独立行政法人国立病院機構村山医療センター (臨床研究センター)・内科・医長
研究者番号：80160688

平田 豊 (HIRATA YUTAKA)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：10441247

(3) 連携研究者

池谷 裕二 (IKEGAYA YUJI)
東京大学・薬学系研究科(研究院)・准教授
研究者番号：10302613