

## 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 4 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700476

研究課題名(和文) 神経保護作用を担うアストロサイトの発達に伴うシナプス伝達変化に関する研究

研究課題名(英文) Long-Term Culture of Astrocytes modulates the Synaptic Machinery

研究代表者

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：50435145

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは脳内における主要なグリア細胞であり、シナプスの形成、発育、安定化、除去に関与している。従って、アストロサイトの状態変化や老化は、シナプスにおける情報伝達に影響を与え得る。本研究では、アストロサイトを長期培養し、老化モデルとしての有用性と、シナプス伝達に対する影響を検討した。結果、培養9週目以降において、*in vitro*における老化様症状を呈することを発見し、興奮性シナプス伝達は低下することを明らかにした。シナプス伝達の低下は、幼若期におけるシナプス伝達に類似していたことから、アストロサイトの老化は、シナプス機能を脆弱すると結論した。

研究成果の概要(英文)：The astrocyte is a major glial cell type of the brain, and plays key roles in the formation, maturation, stabilization and elimination of synapses. Thus, changes in astrocyte condition and age can influence information processing at synapses. This study investigated the effects of prolonged culture on the ability of astrocytes to induce synapse formation and to modify synaptic transmission. By 9 weeks in culture, astrocytes exhibited characteristic of aging *in vitro*, and showed a smaller amount of release of the excitatory neurotransmitter glutamate. Given that the pool of readily releasable vesicles is also small at immature synapses, our results are consistent with astrocytic aging leading to retarded synapse maturation.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：アストロサイト、老化、シナプス伝達

## 1. 研究開始当初の背景

脳は、多数の神経細胞(ニューロン)が結合することでネットワークを形成し、情報を伝導・伝達している。ニューロンの架け橋である『シナプス』では、化学伝達物質を介して情報が伝達される。このような脳の機能を解明するためには、神経細胞の特性とネットワーク構造の特性とともに、ネットワークの要となるシナプスの階層的ダイナミズムの解析が必要不可欠である。すなわち、シナプスの可塑的变化を時系列で考えると、シナプス

の発達変化を理解することは、脳におけるシナプス伝達の時・空間ダイナミクスを知るための第一歩となる。

事実、シナプス小胞の開口放出確率は発達とともに低下する。この発達依存的な変化は、シナプス後膜にある NMDA 受容体が NR2B サブユニット構成型にスイッチし、細胞接着因子の Integrin に作用するためである (Chavis & Westbrook, Nature, 2001)。

一方で、シナプス開口放出動態の発達変化に関しては不明な点が多かった。研究代表者

は、シナプス開口放出の発達変化に着目し、培養細胞を用いて定性実験を行ってきた。

しかし、我々の発見やシナプスの発達に関する従来の報告は、シナプスのみに着目した知見であり、シナプスを取り囲むアストロサイトの加齢的要因や、老化したアストロサイトがシナプス伝達に如何なる影響を与えるのかは不明のままである。

## 2. 研究の目的

脳の老化に伴って、アストロサイトにも加齢的变化が生じる。しかし、シナプスを取り囲むアストロサイトの加齢が、シナプス伝達にどのような影響を与えるのか不明な点が多い。本研究では、アストロサイトを長期培養した加齢（発達）モデルを作出し、シナプス周辺に加齢型アストロサイトが、シナプス伝達とシナプス形成にどのような影響を与えるか調べる。

アストロサイトの老化現象には、『脳の加齢に伴う正常老化』と『疾病に伴う異常老化』の二種類に大別されている。本研究課題は、前者の正常老化に着目している。アストロサイトが正常に老化する場合、アストロサイト選択的に発現する線維性酸性タンパク質 (GFAP, Grial fibrillary acidic protein) は増加し、アストロサイトのマーカーである S100 $\beta$  も増加する。これまでの報告によると、GFAP は、シナプス活性や神経細胞の生存に関わっていることが示唆されている。

これらを踏まえて、本研究では、(1) アストロサイトを長期的に培養することで、GFAP の過剰発現に着目した新たな階層的加齢モデルを確立する。(2) 加齢型アストロサイトとニューロンを共培養することで、シナプス周辺環境 (=アストロサイト) の加齢 (老化) 時におけるシナプス開口放出の動態変化とシナプス形成過程を明らかにする。

## 3. 研究の方法

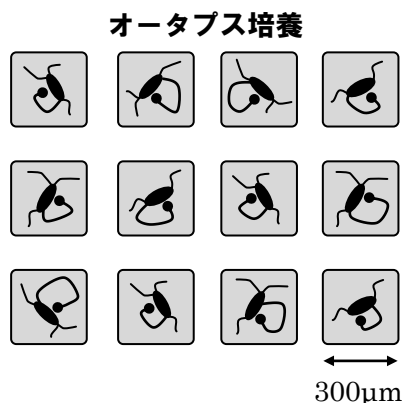
### (1) 長期培養による“加齢型アストロサイト-シナプスモデル”の開発

#### ① In vitro 環境における老化の定義に関する基礎検討

生後 0 日齢 ICR マウスから大脳皮質を摘出し、アストロサイトを培養する。5 週培養 (通常期間)、9 週培養 (1 ヶ月延長)、13 週以上培養 (2 ヶ月以上延長) 時における  $\beta$  ガラクタシターゼ活性 (加齢マーカー) と GFAP 活性を検討項目とし、正常老化条件を決定する。尚、下記オータプス標本作製するには 5 週間を要するため、5 週培養をコントロールとして老化の閾値を定める。

### ② 自己にシナプスを投射する海馬オータプス初代培養標本の作製

長期培養したアストロサイトを小さな島状 (Micro island) にパターン培養し、生後 0 日齢 ICR マウスの海馬ニューロンと共培養する (下図)。



播種されたニューロンは、区分化した領域内でのみ自己にシナプスを形成しながら成長するので、シナプス形成が安定する 2 週間をニューロンの培養期間とする。本標本は、他ニューロンからのシナプス入力に全く無いので、単一ニューロンに由来するシナプス動態を詳細に解析できる利点がある。尚、安定したパターン形成を得るために、一辺が 300  $\mu$ m の正方形領域を多数配列して区分培養できる「コーティングスタンプ」を開発したので、それを利用する (東北大学 庭野道夫教授との共同開発)。これにより、培養細胞の成長範囲を制御できるので、オータプス標本の安定性向上と実験の効率化を図れるように工夫している。

### (2) アストロサイトの正常老化によるシナプス伝達の修飾作用の解明

#### ① アストロサイトの加齢過程と正常老化時におけるシナプス伝達変化の解析

アストロサイトを長期間培養したオータプス標本と、通常のオータプス標本を準備し、アストロサイトの加齢に伴うシナプス伝達変化を、パッチクランプ法にて定性する。具体的には、パッチしたニューロンに高頻度電気刺激を与え、シナプス小胞開口放出の動態変化を調べる。また、単一ニューロン当たりのシナプス小胞数は、0.5M Sucrose 溶液を 10 秒間投与した時の強制開口放出反応から算出する (高浸透圧刺激法)。加えて、シナプスを FM1-43 で蛍光標識し、シナプス小胞に取り込まれた FM1-43 を定量することで、開口放出できないシナプス (サイレントシナプス) の割合を算出する。

## ② アストロサイトの加齢（老化）によるシナプス形成およびシナプス密度の解析

オートプス標本は電気生理学的なシナプス解析に適しているだけでなく、形態学的解析にも適している。その利点を活用し、シナプスを VGlut1 (Vesicular glutamate transporter 1) 抗体、アストロサイトを GFAP 抗体で免疫染色し、コンフォーカル顕微鏡を用いて蛍光観察する。シナプス形態と数は、Image J を用いて定量する。GFAP は加齢とともに増加する事が報告されているので、それを踏まえて、長期培養したアストロサイトの形態を観察する。

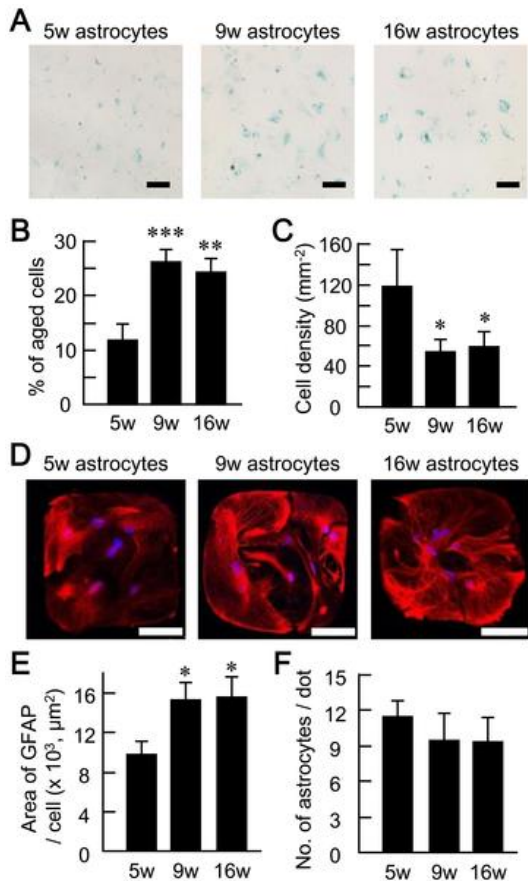
### 4. 研究成果

#### (1) アストロサイト長期培養による加齢モデルの検証

アストロサイトの老化は、『脳の加齢に伴う正常老化』と『疾病に伴う異常老化』の二種類に大別される。アストロサイトが正常に老化する場合、アストロサイト選択的に発現する線維性酸性タンパク質 (GFAP) は増加する。

そこで、アストロサイトを長期間培養することで、それらが加齢型として定義できるか  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色法を用いて検証した。

結果、5 週間培養では染色像の青色で示される  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の上昇がほとんど認められなかったが、1 ヶ月間培養期間



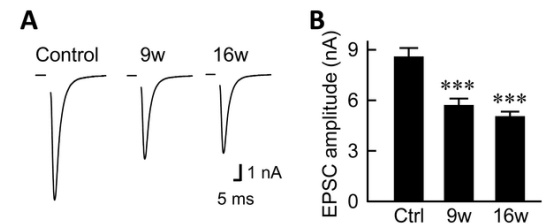
を延長した 9 週間培養、さらに長期間培養した 16 週間培養では培養期間に応じて青く染まる細胞数の増加、すなわち  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が上昇していることが確認できた。一方、培養が長期化するにつれて、アストロサイト数は有意に減少した。

次に、ドット状に区分培養したアストロサイト内における GFAP 占有率を、GFAP 面積を指標にして定量した。結果、培養 9 週目以降においてアストロサイト 1 細胞当たりの GFAP 面積は増加した。

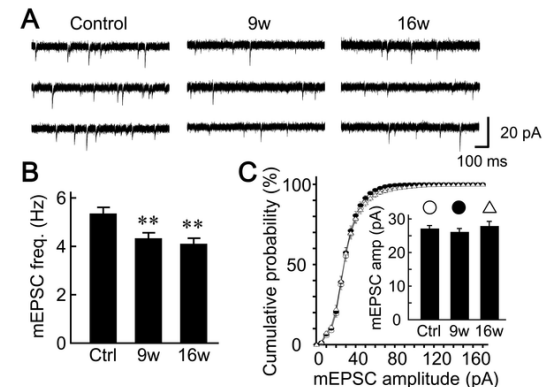
以上、アストロサイト 9 週間培養と 16 週間培養は同程度の傾向を示したことから、in vitro 環境における長期培養系においては 9 週間培養が老化モデルとして有用であると結論した。

#### (2) アストロサイトの老化によるシナプス機能の変化に関する検討

前項の実験から通常型、加齢型、老化型アストロサイトを定義できたので、それらと海馬ニューロンを共培養し、アストロサイトの加齢がシナプス機能にどのような影響を及ぼすかを、パッチクランプ法にて解析した。EPSC amplitude はアストロサイトの加齢により減少した (通常型:  $8.52 \pm 0.49$  nA, n=80、加齢型:  $5.65 \pm 0.34$  nA, n=82、老化型:  $4.95 \pm 0.28$  nA, n=86)。



この EPSC amplitude の減少が神経終末側のグルタミン酸放出量が減少した結果なのか、それともシナプス後膜側の AMPA 受容体数の減少もしくは感受性が低下した結果なのかを区別するために、 $0.5 \mu$ M TTX 存在下における自発的な興奮性シナプス電流 (mEPSC) を記録した。結果、アストロサイトの加齢により、神経伝達物質放出頻度に対応する mEPSC frequency は減少したが (通常型:  $5.28 \pm 0.30$

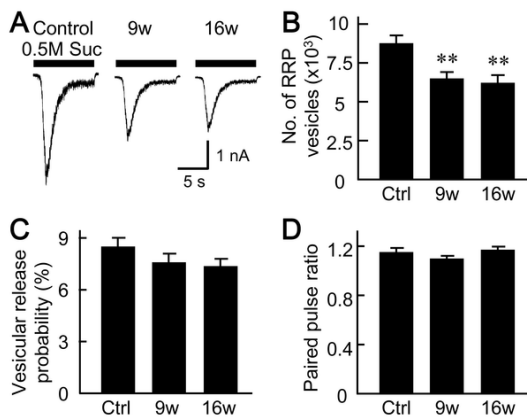


Hz, n=64、加齢型:  $4.25 \pm 0.27$  Hz, n=58、老化型:  $4.02 \pm 0.27$  Hz, n=58)、AMPA 受容体の数や感受性に対応する mEPSC amplitude は変化しなかった (通常型:  $26.93 \pm 1.00$  pA, n=64、加齢型:  $25.94 \pm 1.02$  pA, n=58、老化型:  $27.66 \pm 1.43$  pA, n=58)。

以上の結果から、アストロサイトの加齢によるシナプス伝達の減少は神経終末側のグルタミン酸放出量の減少か、或いはシナプス数の減少であることが示唆された。

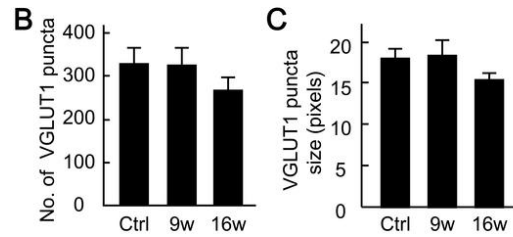
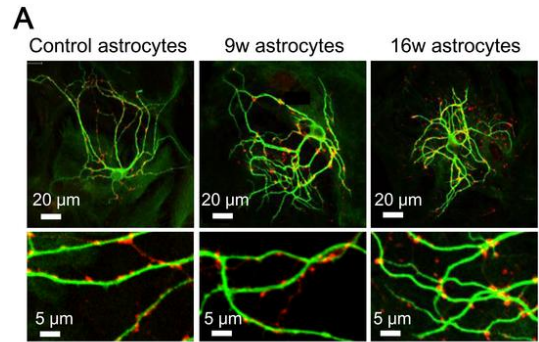
次に、アストロサイトの加齢によりシナプス機能に影響があるかを検討した。アストロサイトの加齢により即時開口放出可能なシナプス小胞数は減少した (通常型:  $8646 \pm 592$  vesicles, n=64、加齢型:  $6369 \pm 452$  vesicles, n=58、老化型:  $6133 \pm 509$  vesicles, n=58)。

一方で、放出確率 (Pvr) はアストロサイトの加齢により若干の減少傾向を示したが、その差は有意ではなかった (通常型:  $8.43 \pm 0.49\%$ , n=80、加齢型:  $7.48 \pm 0.51\%$ , n=82、老化型:  $7.25 \pm 0.45\%$ , n=86)。加えて、EPSC amplitude を 2 回続けて記録した時の Paired pulse の比率も一定であった (通常型:  $1.14 \pm 0.032$ , n=64、加齢型:  $1.09 \pm 0.024$ , n=58、老化型:  $1.16 \pm 0.029$ , n=58)。

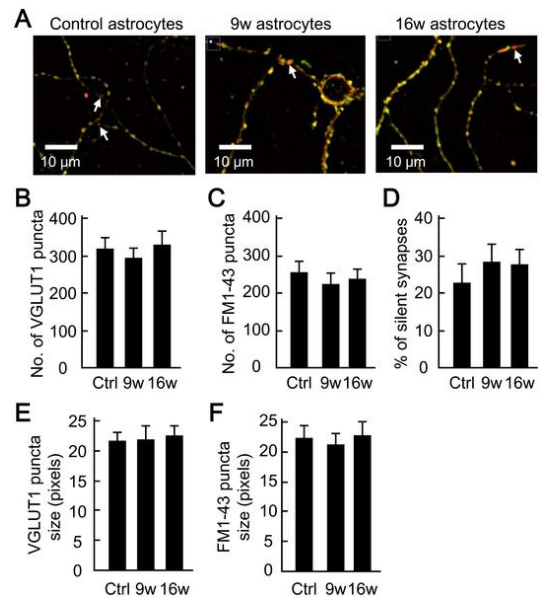


### (3) アストロサイトの老化によるシナプス形成の変化に関する検討

前項で明らかとなったシナプス小胞数の減少が、シナプス数の減少に起因するものなのかを検討した。実験は、興奮性シナプス小胞に特異的に存在する小胞型グルタミン酸トランスポーター-1 (VGlut-1) を指標にして免疫染色を行った。結果、単一ニューロンに発現する興奮性シナプス数に変化は認められなかった (通常型:  $326.0 \pm 33.3$  個, n=33、加齢型:  $322.0 \pm 37.2$  個, n=36、老化型:  $264.2 \pm 26.7$  個, n=41)。また、個々のシナプスサイズ (二次元上の解析) にも変化は認められなかった (通常型:  $17.88 \pm 1.07$  pixel, n=33、加齢型:  $18.19 \pm 1.80$  pixel, n=36、老化型:  $15.28 \pm 0.70$  pixel, n=41)。



次に FM1-43 と VGLUT1 を同一ニューロンで染色し、単一ニューロンが占めるサイレントシナプスの割合を定量した。結果、アストロサイトが加齢しても、サイレントシナプスの割合は変化しなかった (通常型:  $22.11 \pm 4.81\%$ , n=27、加齢型:  $27.75 \pm 4.71\%$ , n=20、老化型:  $27.12 \pm 3.84\%$ , n=22)。



本研究により、シナプス保護作用を有するアストロサイトが老化するとシナプス小胞数が減少することが明らかとなった。このことは、高齢者の記憶力の低下のメカニズムの一端を模倣しているかもしれない。

しかし、その原因となる詳細なメカニズムは明らかにできていない。今後は、シナプス小胞数を制御するアストロサイト由来の分泌因子やグリオトランスマッターを同定したいと考えている。

## 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 1 件)

- (1) Kawano H, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Yamashita Y, Kubo N, Kubo M, Okuda H, Takasaki K, Kubota K, Mishima K, Fujiwara M, Harata NC, Iwasaki K., Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. PLoS One. 2012;7(10):e48034. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0048034

[学会発表] (計 4 件)

- ① 桂林秀太郎、脳内環境を考慮した in vitro 加齢モデルの作出とその応用、第 14 回七隈アルツハイマー病・パーキンソン病研究会、2012 年 4 月 28 日、福岡
- ② 桂林秀太郎、長期培養アストロサイトとシナプス機能、第 2 回九州エリア薬理・生理学若手研究会、2011 年 12 月 26 日、福岡
- ③ 桂林秀太郎、アストロサイト長期培養によるニューロンのサイレントシナプス発現、生理学研究所研究会「シナプス伝達の概念志向型研究」、2011 年 12 月 5 日、岡崎
- ④ 桂林秀太郎、アストロサイトの加齢によるサイレントシナプス発現、第 13 回ブレインサイエンス研究会、2011 年 5 月 28 日、熊本

[その他]

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/user/ohyaku/web/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号：5 0 4 3 5 1 4 5

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し