

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500475

研究課題名(和文) 生体脳内シナプス可塑性に伴うアストロサイト機能の観測

研究課題名(英文) Astrocyte dynamics in synaptic plasticity in vivo

研究代表者

三嶋 恒子 (Tsuneko, Mishima)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90415307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、シナプス可塑性におけるグリア細胞の役割を解明することを目的とし、特にグリア細胞(アストロサイト)の動態から in vivo の状態で可塑性が起こる神経回路における神経細胞の周辺環境の変化を解析した。期間内に 生理的条件化での可塑性誘導プロトコルおよび、変化を起こした神経細胞の周辺アストロサイトの可視化プロトコルの確立 二光子顕微鏡を用いた同一アストロサイトの微小形態を慢性計測・比較するための動物固定装置作成 計測結果の解析(プログラム作成含む)を行った。その結果アストロサイトは可塑性誘導により経時的に形態を変化させていることがわかり、そのタイムコースを現在解析中である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of glial cells in synaptic plasticity by analyzing a change in the microenvironment surrounding neurons occurs plasticity in vivo, in particular the dynamics of glial cells (astrocytes). Protocol for induce cortical plasticity under physiological conditions, and to visualize astrocytes surrounding synapses were examined and established. Animal fix device development for chronic imaging of astrocytic processes structure using two-photon microscope was achieved. Analyzing those imaging data (including making program in Matlab). Consequently astrocytes found to have varied over time form by plasticity induction, the time course is currently being analyzed.

研究分野：神経生理学

キーワード：アストロサイト 可塑性 二光子イメージング ウイルス 慢性計測 バレル

1. 研究開始当初の背景

動物の記憶や学習は、LTP や LTD に代表されるシナプス可塑性を中心とする神経回路の機能変化により実現される。このシナプスを微小突起で被覆するのが、グリア細胞の一つ、アストロサイトである。このアストロサイトとシナプスの機能的な相互作用、特にシナプス可塑性に関わるアストロサイトの動態（カルシウムシグナル等）に着目している。アストロサイト微小突起には、カリウムチャネルやグルタミン酸トランスポーターが発現しており、シナプスでの細胞外液環境を調節している。軸索側の前シナプス末端、樹状突起側の（後シナプス）スパイン、アストロサイトの微小突起の複合体は3者シナプス (tripartite synapse) と呼ばれ、構造的にも機能的にもアストロサイトはシナプスの重要な構成要素である。また、可塑性への密接に関与も、最近認知されつつある。我々の注目するアストロサイトとシナプスが機能的に相互作用している状態を観測するには *in vivo* (実験動物が生きたままの状態) で実験することが必須である。なぜなら、急性脳スライス標本の状態では、神経回路の大部分が切断され、ネットワークとしての神経活動が起こりにくく、しかもアストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞は脳の損傷に対して炎症反応を起こす。即ち、正常な脳の状態とは異なる反応性を示す可能性があるからである。また、培養細胞の状態でアストロサイトは本来の形態を保つことはない。以上より、本課題では *in vivo* 状態でのシナプス可塑性におけるアストログリアの機能変化を検証する。シナプス変化が起こる神経細胞で転写される即初期遺伝子 (immediate early gene)、*arc* (*arg3.1*) のプロモータ下流に PEST 配列を融合させた蛍光タンパク (destabilized dVenus = dVenus) を組みこんだ込んだ動物を

用い、可塑的变化を起こした神経細胞群と周辺のグリア細胞を観測する。

2. 研究の目的

本研究では、*in vivo* の状態で可塑性が起こる神経回路における神経細胞の周辺環境の変化、特にグリア細胞 (アストロサイト) の形態・機能変化を調べ、シナプス可塑性におけるグリア細胞の役割を解明することを目的とした。具体的には、①生理的条件化での可塑性誘導プロトコルの確立・検討および、可塑的变化を起こした神経細胞の周辺アストロサイトの可視化プロトコルの確立 ②可塑性誘導前後での同一アストロサイトの微小形態およびカルシウムシグナルを慢性計測により観察・比較するための装置作成 ③これらを利用した二光子顕微鏡による計測とその解析を行い、シナプス可塑性へのグリア細胞の関与を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

げっ歯類 (マウス) を用い、(1)、(2)、(3) を実施する。(3) 実施に伴い、カスタムメイドの頭部固定装置を作成する。

(1) 可塑性誘導プロトコルの検討を行う。whisker-barrel 系において、SWE (single whisker-experience) による可塑性誘導を行う。本プロトコルはマウスのヒゲ1本 (C2) を残し片側を全切除する操作で、残ったヒゲの感覚入力領域でシナプス増強が起こることが知られている。

シナプス変化を起こしている細胞はトランスジェニックマウス (*arc*-dVenus) を利用することで可視化が可能である。これはシナプス変化が起こる神経細胞で転写される即初期遺伝子、*arc*/*arg3.1* のプロモータの下流に PEST 配列を融合させた蛍光タンパク (dVenus) を組みこんだ込んだ動物である。

可塑性誘導後 dVenus の発現により可視化される神経細胞群は、シナプス変化を起こしてい

ると考えられる。よってこの dVenus 発現神経細胞の空間的分布より、実際の可塑性誘発部位を詳細に同定し、観測対象位置（層構造および脳前後左右位置）と時間を検討、可塑的变化部位および対照の非変化部位を明確にする。

(2) GFAP プロモータつき AAV9 ベクターを利用し、シナプス可塑性誘発部位および周辺アストロサイトを蛍光タンパクでのラベルにより可視化する。ウイルスを注入する領域は SWE の際、残されるヒゲ (C2) の感覚入力領域(バレル領域)付近に行く。この領域は脳内内因性光シグナルを計測することであらかじめ同定しておく。ラベルされた観測対象領域に *in vivo* 観察用の頭蓋窓を作成し頭部固定用のチェンバーをとりつけておく。

(3) 二光子励起顕微鏡で、アストロサイトを形態・カルシウムシグナルについて *in vivo* の状態で観測する。Fig. 1 に示した時間軸の①、②で計測を行う。同一アストロサイトについてイメージングを行い、可塑性の誘発 (SWE) 前後について同一のアストロサイトの形態・シグナルがどのように変化するのか、比較検討をおこなう。アストロサイトの形態変化の評価は、画像の類似性を示す相関係数を指標とした。相関係数の計算のためにはカスタマイズの Matlab プログラムを作成・使用した。

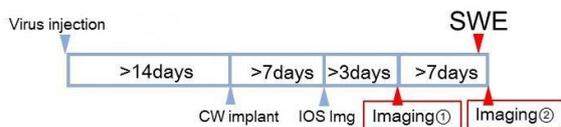


Fig. 1 実験タイムライン

(CW: 観測窓 IOS:内因性光シグナル)

4. 研究成果

(1) 可塑性誘導プロトコルの検討

Arc-dVenus トランスジェニックマウスの片側ヒゲ切除による、SWE (a single-whisker experience) プロトコルを適用し可塑性を誘導する。12 時間後、脳を灌流固定し、左右バ

レル野で顕著な dVenus の発現が認められるニューロンの分布を解析した。マウスの片側ヒゲ切除後 12 時間後で、対側 (即ち、ヒゲ切除側の感覚入力マッピングされている側) のバレル野浅層 (1-4 層) に有意に多くの dVenus を発現する神経細胞が見受けられた (Fig. 2, n=9)。以上よりこの実験系において、ヒゲ切除側の対側バレル野浅層の神経細胞に可塑的变化を誘発できることが分かった。ただしこれは動物の年齢に依存する。本プロトコルでは 8 週令~12 週令の動物では再現性の高い dVenus の発現が得られるが、4 ヶ月令を超える動物では個体差が大きくなり可塑的变化は起こりにくくなることが分かった。

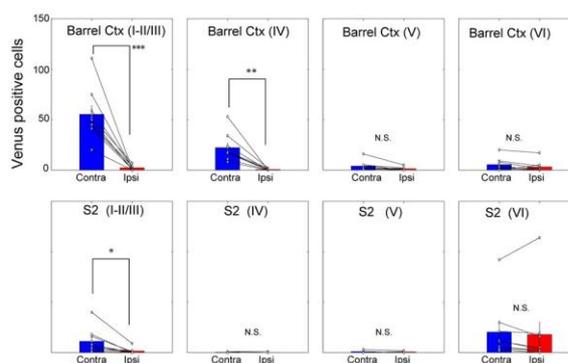


Fig. 2

SWE プロトコル適用 12 時間後の体性感覚野における dVenus 発現神経細胞数 (8-10 週令マウス)

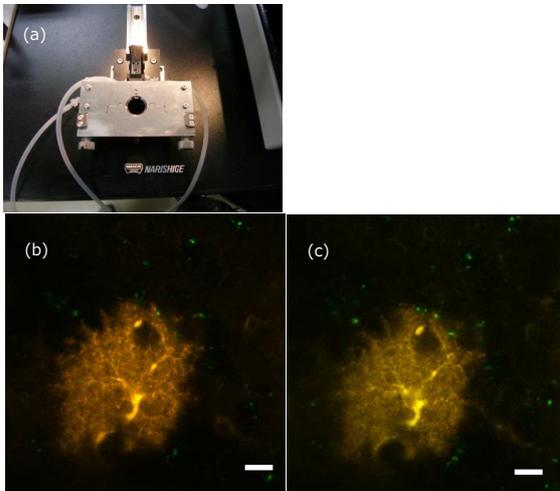
(n=9, **p<0.005, ***p<0.001)

1) で得られた結果を踏まえ、シナプス可塑性を誘発した神経細胞周辺でのアストロサイトを観測するため、GFAP プロモータつき AAV9 ウイルスベクターを用いてアストロサイトを蛍光タンパクによりラベル・可視化した。可視化したアストロサイトのイメージングはガス麻酔下で行うが、微小領域の慢性計測を行うに当たり、可塑性誘導前後で、正確な計測位置再現の必要がある。そこで新たに頭部定位固定装置を作成し、これにより精度の高い計測位置の再現が可能となった (Fig. 3)。

Fig. 3

(a) カスタムメイド頭部固定装置 (b, c) 蛍光ラベル (memCerulean) を発現した同一固体のアストロサイトの *in vivo* イメージ例. c) は b) の 9 日後にイメージング

Scale bar=10 μ m



(3) 神経細胞群の可塑的变化に伴うグリア (アストロサイト) の形態的变化

既述の (1)、(2) を元に、二光子励起顕微鏡をもちいて可塑性誘導 (SWE) の前後で、大脳皮質浅層 (I-IV 層) の、SWE の際残すヒゲ (C2) の入力領域に確認できる蛍光ラベルされたアストロサイトを、880nm の励起波長でイメージングした。SWE (神経細胞の可塑的变化誘導) の前後でのアストロサイトの形態の変化を定量するため、2つの画像の相関係数を画像の類似性を示すインデックス (指標値) として採用し、Matlab のカスタムメイドプログラムにより計算した。このインデックスは2つの画像の類似性が高いほど1に近い値を示す。すなわちアストロサイトの形態変化が大きいほどより小さいインデックス値となって現れる。可塑性誘導前後の画像を比較したところ、可塑性誘導後に dVenus の発現が見られる関心領域 (ROI サイズ 5 μ m \times 5 μ m) について、コントロール動物 (SWE 適用なし: 平均 0.547 \pm 0.078SD) に対し実験群 (SWE 適用) はより低いインデックス値 (平均 0.179 \pm 0.090SD) を示した。これはアス

トロサイトが神経細胞の可塑性誘発にともなって形態変化を起こしていることを示しており、先行研究の結果と一致する。同手法を用いて、以下興味深いいくつかの示唆が得られている。①アストロサイトは可塑性刺激の誘導がない状態でも、わずかながら変化しており、一細胞内でその変化量は領域ごとになる ②アストロサイトの可塑性誘導刺激後の変化は徐々に始まり、12時間以内に定常化する 等である。いずれも現在実験群を更に増やし統計的に解析をする必要がある。

以上、神経細胞群の可塑的变化にともなうアストロサイトの形態的变化をイメージング・解析した。以降これを更に推し進めた解析を行い、アストロサイトの動態を明らかにするとともに、可塑性誘導の刺激前後でアストロサイトのカルシウムシグナルの動態にも変化があるのかどうかをイメージング・解析していきたい。

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)

Hirase H, Iwai Y, Takata N, Shinohara Y, Mishima T. (2014) Volume transmission signalling via astrocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Oct 19;369(1654). Review. (査読有)
DOI: 10.1098/rstb.2013.0604

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

N Takata, Y Shinohara, M Ohkura, T Mishima, J Nakai, H Hirase (2014) *Imaging of Astrocytic Activity in Living Rodents. Optical Imaging of Neocortical Dynamics*, 191-207 Humana Press
DOI: 10.1007/978-1-62703-785-3_12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三嶋 恒子 (MISHIMA, Tsuneko)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・
研究員

研究者番号: 90415307

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

平瀬 肇 (HIRASE, Hajime)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・神
経グリア回路研究チームリーダー

研究者番号：90392084