

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350988

研究課題名(和文) シナプス形成に重要なアストロサイトの拡張領域制御とシナプス動態の相関解析

研究課題名(英文) Excitatory synaptic transmission is regulated by the number of regional astrocytes in single cultured hippocampal neuron

研究代表者

桂林 秀太郎 (Katsurabayashi, Shutaro)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：50435145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 高次脳機能を有する高等動物ほど、脳内のグリア細胞の数が多いいわれる。しかし、1) どれだけの数のアストロサイトが必要なのか、2) アストロサイトの占有面積(拡張領域)とシナプス機能は関連するのか、などは不明である。本研究では、培養アストロサイトの形成領域の制御に基づいたシナプス動態(情報伝達)とシナプス形態(形成秩序)変化の作動原理を検討した。結果、アストロサイト領域の面積を変えても興奮性シナプス伝達には影響しないことが分かった。ところが、1ニューロン当たりのアストロサイト数を変えてみると、アストロサイト数が1-5個では興奮性シナプス伝達は低下する傾向を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Neural circuit is composed of mainly neuron and glial cell. Astrocyte is a major glial cell which plays key roles in brain function including formation and maturation of synapses. In this study, we utilized primary co-culture system of autaptic single hippocampal neuron with dot-cultured cortical astrocytes, where experimentally modified the density of astrocytes. Excitatory synaptic transmission was decreased by lower density of astrocytes (the number of astrocytes = 1-5), which was accompanied by a decrease of readily releasable pool of synaptic vesicles but not of the vesicular release probability. Distribution analysis of synaptic puncta stained with FM styryl dye and VGLUT-1 antibody revealed that a proportion of presynaptically silent synapses on dendrites was increased by a small density of astrocytes. These findings indicate that synaptic transmission and a position of presynaptically active synapse are varied by the number of astrocytes surrounding neuron.

研究分野：神経生理学

キーワード：アストロサイト シナプス伝達 グリア

## 1. 研究開始当初の背景

脳の神経回路は、神経細胞（ニューロン）とグリア細胞で構成される。哺乳類の進化の過程において、高次脳機能を有する高等動物ほど脳内のグリア細胞の数が多いといわれる。グリア細胞には、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトの3種類があり、グリア細胞の半数はアストロサイトである（Allen & Barres, *Nature*, 2009）。そのアストロサイトが存在しないと神経回路の架け橋である『シナプス』の数は激減し、伝達物質放出機能は低下する（Pfrieger & Barres, *Science*, 1997; Ullian et al., *Science*, 2001; Hama et al., *Neuron*, 2004）。

最近、アストロサイトは学習・記憶に関与することが報告され（Takata et al., *J Neurosci*, 2011）、脳内のニューロン新生やシナプス形成を制御することも明らかになった（Ashton et al., *Nat Neurosci*, 2012）。それに加えて申請者らは、アストロサイトが加齢するとシナプス伝達は低下することを最近報告した（Kawano et al., *PLoS ONE*, 2012）。

これまでの背景に鑑みると、アストロサイトは複雑な高次脳機能を生涯に亘って保持するために極めて重要な存在として位置付けられる。正に、『アストロサイト機能 脳機能』であり、アストロサイトはシナプス機能を制御する主役として考えられる（Eroglu & Barres, *Nature*, 2010）。

## 2. 研究の目的

アストロサイトの機能や有無に付随するシナプス動態変化は解明されつつあるが、アストロサイトの密度や占有面積、すなわちアストロサイトの領域的要素（拡張性）の重要性を考察したシナプス研究は殆ど皆無であり、その概念でさえも明らかではない。有限である脳内領域において、アストロサイトが脳内を占める割合は、人類が最も高い。すな

わち、高次脳機能を獲得した人類の進化の謎を解く鍵は、『アストロサイトの領域的拡張性』が握っている可能性が考えられる。

そこで本研究では、アストロサイトの領域的要素（数と占有面積）に着目し、アストロサイトの領域変化に対するシナプスの形成秩序と情報伝達機能の作動原理を *in vitro* レベルで段階的に追究し明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 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

生後0日目のICRマウスから大脳皮質を取り出し、アストロサイトを2週間培養した。その培養アストロサイトを回収し、小さな島状（Micro island）にパターン培養した。そして生後0日齢ICRマウスの海馬ニューロンと共培養した。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した。本標本は、他ニューロンからのシナプス入力がかく無いので、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200-500 $\mu\text{m}$ 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、それを利用した（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、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た。具体的には、一辺が200 $\mu\text{m}$ （面積40,000 $\mu\text{m}^2$ ）、300 $\mu\text{m}$ （面積90,000 $\mu\text{m}^2$ ）もしくは500 $\mu\text{m}$ （面積250,000 $\mu\text{m}^2$ ）の正方形ドットを多数配列して区分培養できる『マイクロ培養デバイス』をPolyethylene Ether Ether Ketone (PEEK)を用いて作製した。

## (2) ニューロン形成およびシナプス形成の形態観察

オータプスニューロンの樹状突起は MAP2 抗体、軸索は Tau 抗体、興奮性シナプスは VGLUT1 抗体を用いて免疫染色し、共焦点顕微鏡にて三次元 (z-stack) 解析した。樹状突起の伸展と形態は、MAP2 イメージにおける細胞体を中心に同心円を等間隔で描き、それぞれの同心円と交差する樹状突起の回数を計測して定量した (Sholl analysis 法)。軸索の伸展と形態は、Tau 抗体が樹状突起も一部染めることから、Tau イメージから MAP2 イメージを差し引いたイメージを用いて Sholl analysis 法で定量を行った。シナプス数とサイズは、VGLUT1 イメージをガウシアンブロー処理し、ノイズ除去して S/N 比を疑似的に増加させたイメージから定量した。

次に、シナプス小胞に FM1-43® を取り込ませ、シナプス小胞の開口放出可能なアクティブシナプスを蛍光観察した。そして連続してホルマリン固定をし、シナプスを VGLUT1 抗体で免疫染色を行った。

## (3) パッチクランプ法を用いたシナプス解析

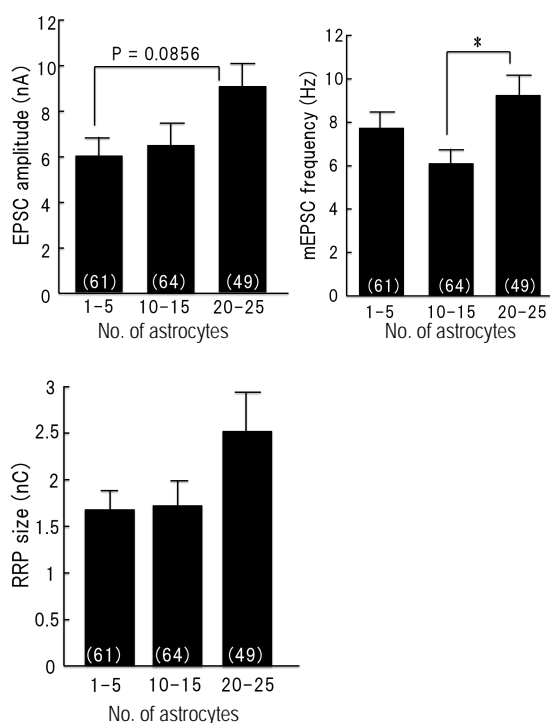
培養領域の異なるアストロサイトと海馬 CA1 単一ニューロンを 2 週間共培養し、シナプス形成可能領域を制御した時のシナプス伝達変化を、膜電位固定下にてパッチクランプ法にて解析した。パッチしたオータプスニューロンから、神経伝達物質放出量 (evoked EPSC amplitude)、放出確率 (Pvr)、自発的開口放出量 (mEPSC amplitude)、自発的開口放出頻度 (mEPSC frequency)、開口放出即時可能シナプス方法数 (No. of readily releasable pool) を求めた。

## 4. 研究成果

アストロサイトの形成領域が変化しても

EPSC amplitude、mEPSC frequency、mEPSC amplitude いずれも各群において差はみられなかった。よって、シナプス伝達物質放出量 (シナプス伝達) は不変であると結論した。加えて、興奮性シナプス数も変化しなかった。

次にアストロサイトの培養領域を 90,000  $\mu\text{m}^2$  に統一し、そこに含まれるアストロサイトの数を変えながら作製したオータプス培養標本を作製して、パッチクランプ法を用いてシナプス伝達を定量化した。結果、アストロサイト数がニューロン 1 個に対し、1-5 個ではシナプス伝達は減少傾向を示した。



以上の結果から、ニューロンの周囲に共存するアストロサイトの数に影響せず興奮性シナプスは形成されるものの、シナプス機能は影響を受けることが分かった。また、アストロサイト数を厳密に制御するために、生細胞の核を染色できる NucBlue® を用いて同様の実験を行い、シナプス解析データの再現性があることも確認できた。

VGLUT1 染色の結果では、興奮性シナプス数は不変であったことから、シナプス伝達の低下はアクティブシナプスの比率が低下

している可能性が考えられた。そこでシナプス開口放出可能なシナプスを FM1-43<sup>®</sup>、興奮性シナプスを VG LUT1 で染色し、アクティブシナプスの比率を求めた。結果、アストロサイト数が減るとアクティブシナプスの比率が低下することを明らかにした。

以上の結果から、ニューロンを取り巻くアストロサイト数の変化はシナプス形成には影響せず、シナプス伝達に影響を与えることが明らかとなった。

## 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8件)

1. Katsurabayashi S, Kawano H, Ii M, Nakano S, Tatsumi C, Kubota K, Takasaki K, Mishima K, Fujiwara M, Iwasaki K. Overexpression of Swedish mutant APP in aged astrocytes attenuates excitatory synaptic transmission.

**Physiological Reports**, 4 (1) e12665, 2016. (査読有り)

2. Sugiura H, Yasuda S, Katsurabayashi S, Kawano H, Endo K, Takasaki K, Iwasaki K, Ichikawa M, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K. Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of synenin in tuberous sclerosis complex.

**Nature Communications**, 6:6842, 2015. (査読有り)

3. Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Shimada T, Tanaka H, Takasaki K, Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K. Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in

tuberous sclerosis complex.

**Scientific Reports**, 4:5155, 2014. (査読有り)

4. Kubota K, Nogami A, Takasaki K, Katsurabayashi S, Mishima K, Fujiwara M, Iwasaki K. Pharmacological study of the ameliorative effects of Yokukansan on memory impairment and the behavioral and psychological symptoms of dementia in AD models.

**Nihon Yakurigaku Zasshi**, 143(3):110-4, 2014. (査読無し)

5. Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells.

**Molecular Brain**, 6:19, 2013. (査読有り)

6. Uchida N, Katsurabayashi S, Mishima K, Fujiwara M, Nishimura R, Iwasaki K et al., Cholinergic Involvement and Synaptic Dynamin 1 Expression in Yokukansan-mediated Improvement of Spatial Memory in a Rat Model of Early Alzheimer's Disease.

**Phytotherapy Research**, 27(7):966-72, 2013. (査読有り)

7. Nogami A, Takasaki K, Kubota K, Katsurabayashi S, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M, Iwasaki K et al., Effect of Yokukansan on memory disturbance in an animal model of cerebrovascular dementia. **Journal of Traditional Medicines**, 30(4):164-175, 2013. (査読有り)

8. Kubota K, Sano K, Katsurabayashi S, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M, Iwasaki K et al., Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, promotes neurite outgrowth in PC12 cells through the activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt.

**Journal of Traditional Medicines**, 30(3):102-113, 2013. (査読有り)

〔学会発表〕(計8件)

1. Relationship between density of local astrocytes and excitatory synaptic transmission in vitro., Hideto Okuda, Takashi Hoshiyama, Saori Iwamoto, Kotomi Takeda, Shutaro Katsurabayashi, Katsunori Iwasaki, 生理研シナプス研究会, 2015年12月, 生理学研究所, 愛知県岡崎市

2. アストロサイトの培養環境制御によるシナプス伝達のパラダイム, 星山貴志, 岩本沙緒里, 武田琴水, 青沼有紀, 庭野道夫, 野田百美, 桂林秀太郎, 岩崎克典, 第67回日本薬理学会西南部会, 2014年11月, 産業医科大学, 福岡県北九州市

3. アストロサイト領域の条件変化とシナプス伝達, 桂林秀太郎, 第20回BMIRC研究会【センサーと神経工学】, 2014年8月, 九州工業大学, 福岡県北九州市

4. 長期培養型アストロサイトによるシナプス伝達の低下, 桂林秀太郎, 河野洋幸, 岩崎克典, 第24回日本病態生理学会, 2014年8月, 北九州国際会議場, 福岡県北九州市

5. アストロサイトによるシナプス伝達の修飾, 桂林秀太郎, 分子解剖学セミナー,

2014年6月, 琉球大学, 沖縄県那覇市

6. シナプス伝達を得るために必要なアストロサイト環境の模索, 桂林秀太郎, 第16回ブレインサイエンス研究会, 2014年6月, 沖縄かりゆしアーバンリゾート・ナハ, 沖縄県那覇市

7. アストロサイト数の制御に伴うシナプス伝達の変化～脳細胞移植医療の可能性への夢物語～, 桂林秀太郎, 星山貴志, 青沼有紀, 庭野道夫, 岩崎克典, 生体制御・創薬研究ワークショップ, 2014年3月, プラザNヴァリエホール, 鹿児島県鹿児島市

8. The number of astrocytes is critical for the synaptic transmission in a single cultured neuron, S. Katsurabayashi, T. Hoshiyama, S. Iwamoto, Y. Aonuma, N. Kubo, M. Kubo, K. Takasaki, K. Kubota, K. Mishima, M. Fujiwara, M. Niwano, K. Iwasaki, The 2nd RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer (Tohoku University), 2014年2月, 東北大学, 宮城県仙台市

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/rinyaku/>

## 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・准教授

研究者番号：50435145

### (2)研究分担者

木村 康男 (KIMURA YASUO)

東京工科大学・工学部・教授

研究者番号：40312673

(平成26年5月14日削除)

馬 騰 (MA TENG)

東北大学・電気通信研究所・助教

研究者番号：10734543

(平成26年5月14日追加)

(3)連携研究者

無し