

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25702054

研究課題名(和文) グリアの発する信号が神経活動・行動に及ぼす影響を探る

研究課題名(英文) Glial influence on neuronal activity and behavior

研究代表者

松井 広 (MATSUI, Ko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20435530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グリア細胞のうち、アストロサイト内でのpHやCa²⁺イオン濃度変化を検出するため、それぞれのイオン濃度に応じて蛍光が変化するタンパク質を発現する遺伝子改変マウスを作製した。これらの動物から急性脳スライス標本作製し、細胞内pHやCa²⁺計測を高精度に行った。従来の色素を用いた方法と比較して、はるかに感度良く応答が記録できるとともに、細胞種特異性が維持できるため、細胞の細かい突起状の箇所での変化を計測することが可能になった。また、生きているマウスの頭蓋骨に小さな窓を開け、そこに光ファイバーを通すことで、覚醒時行動中のマウスのグリア細胞内イオン濃度変動を実測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have generated transgenic mice that express, in astrocytes of the glial cell population, fluorescent proteins that are sensitive to changes in intracellular pH or calcium. Compared to methods using synthetic dyes, these proteins are specifically expressed in astrocytes. Therefore, using acute brain slice preparations, local changes in the fine processes of the cells can be readily identified. In addition, small cranial window was created and optical fiber was inserted to observe the intracellular ionic changes in vivo. These methods along with the methods to optically control intracellular ionic changes using ChR2 and ArchT, we would be able to understand how astrocytes function affect neuronal activity and animal behavior.

研究分野：脳生理学

キーワード：脳科学 グリア細胞 光遺伝学 オプトジェネティクス グルタミン酸 細胞内イオン

1. 研究開始当初の背景

脳には二つの回路が存在する。ひとつは神経回路で、神経細胞間を信号が次々と伝わることで、心の機能が成立している。一方で、脳の容積の大半を占めるグリア細胞も、信号を伝え合う回路を形成していることが明らかになりつつある。とはいえ、その活動の意味となると、現時点では皆目見当がつかない。ある種の麻酔薬を投与すると、神経の活動は続くのに、グリアの活動だけが抑制されるといふ報告もあり、意識や心の状態を左右しているのは、実はグリアなのではないかという仮説も浮かび上がってきた。しかし、神経こそが筋肉に接続して、目に見える行動を直接支配しているので、グリアの活動は、何らかの交錯過程を経て神経に影響を与えていると考えるべきであろう。本研究では、信号の受け渡し過程のメカニズムを詳細に調べるとともに、交錯過程が存在する意味を明らかにすることを目指した。

細胞は、細胞膜で囲われているため、細胞と細胞の間で信号を伝える際には、細胞の中から細胞間隙に向けて放出された伝達物質が仲介役となることが多い。私はこれまで、神経から神経への信号伝達、および、神経からグリアへの信号伝達のメカニズムを明らかにしてきた。特に、細胞間隙における伝達物質グルタミン酸の拡散過程に注目することで、細胞間を伝わる信号の広がりの特異性を解析してきた。グリアの発する信号を解析するにも、これまでと同じストラテジーが立てられそうであるが、事態はそう単純ではなかった。

神経科学で使われてきた古典的な手法は、脳組織標本に電極を下して、電気的に神経細胞を刺激し、その反応を見る方法であった。しかし近年、この手法では、神経とグリアを同時に刺激していることが判明した。つまり、従来の研究では、神経の刺激とグリアの刺激のうち、どちらの効果を見ているのか、実は分かっていなかったのである。グリアの発する信号を抽出するには、グリアだけを選択的に刺激する方法が必要である。最近、藻から採れた光感受性膜タンパク質 channelrhodopsin-2 (ChR2) を、哺乳類の細胞に発現させる方法が考案され、光を絞ってタイミングよく照射する方法とを組み合わせ、神経・グリアの選択的光刺激が可能になった(オプトジェネティクス)。既に、様々な神経やグリア細胞に ChR2 等を効率的に発現させる遺伝子改変動物の実験系を立ち上げており、本研究の目的は、これらの動物を使って、神経回路とグリア回路の間で交わされる信号のやり取りを明らかにすることであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳の中に相並ぶ神経回路およびグリア回路の間で、どのようにして情報が交換されているのかを明らかにし、グリア

回路の活動が、認知・学習・行動といった心の機能にいかに関与しているのかを解明することである。この課題にせまるための強力なツールとして、ChR2 や ArchT 等の光感受性分子を活用し、従来は不可能だった、神経やグリアに対する選択的光刺激を行った。また、グリアの担う信号を計測するために、電気的に記録する方法に加え、二光子イメージング法や FRET 法等の最新の光計測法を導入した。

これまで、主に急性脳スライス標本を用いて実験をしたところ、神経細胞間での興奮性信号伝達に使われるのと全く同じグルタミン酸が、伝達物質としてグリアから放出されることが示された。グリアからの放出のメカニズムは、神経からの放出とは全く異なり、シナプス小胞からの Ca^{2+} 依存性開口放出ではなく、DIDS 感受性陰イオンチャンネルからの pH 依存性放出であることが示唆された。また、グリア光刺激によってグルタミン酸が放出されると、神経細胞間のシナプス伝達が修飾されることも示された。

引き続き、グリア光刺激時と同レベルのグリア細胞内 pH や Ca^{2+} 濃度変動が、マウスの脳内組織でも生じているかどうかを明らかにする必要が出てきた。そこで、pH と Ca^{2+} のそれぞれの変動に感受性の高い蛍光タンパク質を、グリア細胞のうち、アストロサイトに高発現する遺伝子改変マウスを作製した。また、これまでの電気生理学実験により、細胞膜を横切るイオンの流れによって、グリアの pH 変化が生じると考えられたが、この pH 変化に特に重要なチャネルやトランスポーターを同定することに成功した。電気生理学実験とともに、上記、遺伝子改変マウスからの光計測を使って、各種イオンの流れとグリア細胞内 pH 変化を実測することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 急性脳スライス標本を用いた電気生理学実験、(2) 生きたままの動物からの光計測実験、および、(3) 動物が行動学習している最中での光刺激実験、の3つの実験を行った。特に、(2) については、グリア細胞の活動を光計測するために、新たな遺伝子改変マウスを作製する必要があったが、動物の作製には、CRISPR/Cas9 方式を利用したため、従来より、はるかに早く、動物を作製することができた。また、作製した最初のマウスでは、pH センサータンパク質が凝集する傾向があることが分かったため、すぐさま、改良型のタンパク質を発現する遺伝子改変動物を設計し作製に成功した。また、急性脳スライス標本および生きているマウスからの光ファイバーイメージングを行う工夫も行い、高精度の光計測が可能になった。

4. 研究成果

上記、遺伝子改変マウスを使って、急性スライス標本を作製し、細胞内 pH, Ca²⁺計測を高精度に行った。従来色素を用いた方法と比較して、はるかに感度良く応答が記録できるとともに、細胞種特異性が維持できるため、細胞の細かい突起状の箇所での変化を計測することが可能になった。また、生きているマウスの頭蓋骨に小さな窓を開け、そこに光ファイバーを通すことで、覚醒時行動中のマウスのグリア細胞内イオン濃度変動を実測することに成功した。今後は、単に自由行動下でのアストロサイト pH を測定するだけでなく、学習課題を遂行中での pH, Ca²⁺計測も目指す予定である。

本研究を通して、ChR2 や ArchT のようにアストロサイト内の pH を人為的に操作する手段に加えて、アストロサイト内 pH, Ca²⁺の実測できるようになり、アストロサイト pH, Ca²⁺の機能的な意味を理解する糸口が示された。

なお、本研究課題に関連し、神経細胞とグリア細胞の間の信号伝達様式のみならず、神経細胞同士のシナプス伝達に関する研究も進めることができた。どの細胞の間でも、信号を伝え合うことで、多細胞生物としての協調的活動が可能になるが、細胞間の信号伝達には、細胞間隙に放出される伝達物質が使われることが多い。神経・グリアに限らず、どのくらい信号が良く伝わるのかを明らかにするには、伝達物質受容体の分布様式をナノ単位で明らかにする必要がある。また、伝達物質放出に大きな役割を果たす Ca²⁺チャネルについても、ナノ単位でのクラスター様式が信号伝達に大きな影響を及ぼす。今回の研究では、主に、これらの受容体やチャネルの神経細胞での分布様式を調べた。なお、本研究を通して、グリア細胞からの伝達物質放出を制御する因子や、グリア細胞の情報伝達に必須のトランスポーターや受容体の存在も明らかになってきた。今後、神経細胞で使ったのと同様の手法をグリア細胞にも適用することで、神経・グリア細胞の機能連関と相関する形態学的な情報も得られると考えられる。

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 1 件)

Rubio ME, Matsui K, Fukazawa Y, Kamasawa N, Harada H, Itakura M, Molnár E, Abe M, Sakimura K, Shigemoto R (2017) The number and distribution of AMPA receptor channels containing fast kinetic GluA3 and GluA4 subunits at auditory nerve synapses depend on the target cells.

Brain Structure and Function,

doi:10.1007/s00429-017-1408-0.

査読有

松井 広 (2016) 脳内情報処理を担う pH の役割: アストロサイト光操作法を用いた新展開. 日薬理誌, 148: 64-68.

査読無

[http://plaza.umin.ac.jp/~JPS1927/fpj/issue/TOC16-148\(2\)/16-148-2.htm](http://plaza.umin.ac.jp/~JPS1927/fpj/issue/TOC16-148(2)/16-148-2.htm)

松井 広 (2016) 神経科学を越えた光遺伝学の応用可能性. 日本レーザー医学誌, 36: 473-477.

査読無

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jslsm/-char/ja/>

Nakamura Y, Harada H, Kamasawa N, Matsui K, Rothman JS, Shigemoto R, Silver RA, DiGregorio DA, Takahashi T (2015) Nanoscale distribution of presynaptic Ca²⁺ channels and its impact on vesicular release during development.

Neuron, 85: 145-158.

査読有

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.019>

Masamoto K, Unekawa M, Watanabe T, Toriumi H, Takuwa H, Kawaguchi H, Kanno I, Matsui K, Tanaka KF, Tomita Y, Suzuki N (2015) Unveiling astrocytic control of cerebral blood flow with optogenetics.

Scientific Reports, 5: 11455.

査読有

doi:10.1038/srep11455

Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, Kitamura Y, Hiroaki H, Fukazawa Y, Kii I, Nishiyama T, Kakita A, Takeda H, Takeuchi A, Arai Y, Ito A, Komura H, Hirao H, Satomura K, Inoue M, Muramatsu S, Matsui K, Tada M, Sato M, Saijo E, Shigemitsu Y, Sakai S, Umetsu Y, Goda N, Takino N, Takahashi H, Hagiwara M, Sawasaki T, Iwasaki G, Nakamura Y, Nabeshima Y, Teplow DB, Hoshi M (2015) Na,K-ATPase α 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly.

Proc Natl Acad Sci U S A, 112: E44655-E4474.

査読有

doi: 10.1073/pnas.1421182112

松井 広 (2015) イオン濃度操作ツールとしてのオプトジェネティクス. 実験医学, 33: 3074-3078.

査読無

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101462/index.html>

Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A,

Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K* (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*, 81: 314–320.

査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.11.011>

Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, Satoh K, Kitajima N, Yoshida K, Okubo Y, Sasaki T, Moritoh S, Hasuwa H, Mimura M, Horikawa K, Matsui K, Nagai T, Iino M, Tanaka KF (2014) In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca²⁺ indicator. *Cell Reports*, 8: 311-318.

Cell Reports, 8: 311-318.

査読有

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.056>

別府 薫、松井 広 (2014) 光遺伝学のグリア細胞への応用と新知見. *日本臨牀*, 72: 2243-2249.

査読無

<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020271134>

松井 広 (2014) グリア機能の光制御から見てきた脳科学研究の新しい地平. *細胞工学*, 33: 275-280.

査読無

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901528.html>

[学会発表] (計 8 件)

Ko Matsui

Optogenetic Control of Astrocytes and Mind. Gordon Research Conferences 「Glial Biology: Functional Interactions Among Glia & Neurons」, 2017 年 03 月 09 日
Ventura (USA)

Ko Matsui

Neural signal modulation by astrocyte activity. 第三回 Neuroscience Network in Kobe シンポジウム「グリア細胞の生理と病理 ~ 脳機能変化と精神・神経疾患 ~」, 2017 年 02 月 17 日
神戸大学大学院医学研究科・神緑会館・多目的ホール (兵庫県・神戸市)

Ko Matsui

Functional editing of brain function via glial control. JSPS Core-to-Core Program & OIST Joint Symposium "Nanoscopic Synaptic Functions" (Organizer: Takeshi Sakaba, Doshisha University) 2016 年 09 月 25 日-27 日
沖縄科学技術大学院大学・OIST Main Campus, Seminar Room C209 (沖縄県・国頭

郡)

松井 広

光遺伝学による脳虚血神経障害発生メカニズムの解明.

日本酸化ストレス学会「低酸素応答とチャネル制御」(オーガナイザー: 東北大学・鈴木教郎) 2016 年 08 月 31 日
仙台国際センター (宮城県・仙台市)

松井 広

グリア光操作による脳虚血ダメージの軽減.

生体機能と創薬シンポジウム「疾患とグリア細胞-創薬を目指して」(オーガナイザー: 東京大学・池谷裕二) 2016 年 08 月 25 日
東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)

松井 広

神経信号のグリア増幅回路の光制御. 公益財団法人千里ライフサイエンスセミナー「光遺伝学による脳・生物学研究最前線」(コーディネーター: 名古屋大学・山中章弘、慶應義塾大学・田中謙二) 2016 年 02 月 26 日
千里ライフサイエンスセンタービル (大阪府・豊中市)

Ko Matsui

Glial glutamate release and its role in neuronal information. NIH-Japan-JSPS Symposium -Highlights from the frontier of biomedical science from NIH and Japan, 2014 年 10 月 24 日
Bethesda (USA)

Ko Matsui

Glial control of behavior and brain damage. Glial Heterogeneity Meeting (Frank Kirchhoff, Christine Rose 代表) 2014 年 10 月 13 日
Düsseldorf (Germany)

[図書] (計 1 件)

Ko Matsui (2015) Chapter 22. Casting Light on the Role of Glial Cells in Brain Function. in "Optogenetics: Light-sensing proteins and their applications.", (Springer): 315-327. (DOI 10.1007/978-4-431-55516-2)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当無し

○取得状況（計 0 件）

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

東北大学・松井広研究室

<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/>

光操作研究会 in 東北大学 2014

<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/optogenetics2014/>

東北大学知のフォーラム「脳科学最前線」

<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/fbs2015tools/>

Young Glia

<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/youngglia/>

2016 年 08 月 01 日

日本経済新聞 朝刊 掲載

「脳を光で自在に制御 光遺伝学、東北大など研究進む」

2015 年 04 月 07 日-12 日

河北新報 科学の泉 全 6 回コラム 「こころの源を探して」

2015 年 03 月 20 日 ~ 04 月 14 日

共同通信社取材 掲載新聞各紙

中国新聞、岐阜新聞、信濃毎日新聞、福井新聞、山陽新聞、山形新聞、山梨日日新聞、山陰中央新報、神戸新聞

「細胞の活動 光で操作」

（計 9 報）

2014 年 2 月 14 日

科学新聞「脳虚血時の細胞死誘導機構」

2014 年 1 月 29 日

朝日新聞「脳細胞の破壊、解明に一步」

2014 年 1 月 23 日

朝日新聞「グリア細胞が脳細胞の破壊誘導」

2014 年 1 月 23 日

河北新報「脳細胞の新機能発見」

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松井 広 (MATSUI, Ko)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20435530

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

別府 薫 (BEPPU, Kaoru)