

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25710005

研究課題名(和文)ペリシナプスグリアによるシナプス情報伝達制御機構の解明

研究課題名(英文)Imaging and manipulation of calcium within entire astrocyte territories

## 研究代表者

繁富 英治 (SHIGETOMI, Elji)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：00631061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：第3のシナプス機能ドメイン「ペリシナプスグリア」のCa<sup>2+</sup>濃度変化は、Ca<sup>2+</sup>感受性タンパク質の導入により観察可能となり、*in vitro*及び*in vivo*の両方で多くのCa<sup>2+</sup>活動がペリシナプスグリアに存在する事象が見出された。更に、そのCa<sup>2+</sup>活動の操作をP2Y<sub>1</sub>受容体発現制御により試みた結果、予想に反した細胞全体に広がるCa<sup>2+</sup>シグナルの惹起、及び神経細胞興奮性増大が見出された。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes are not electrically excitable but display Ca<sup>2+</sup> excitability. Ca<sup>2+</sup> excitability in astrocytes has been extensively studied. However, in those studies, Ca<sup>2+</sup> signals at soma have been mainly focused. Then, Ca<sup>2+</sup> signals at astrocyte processes where astrocytes contact intimately with synapses remain largely unknown. The lack of method to measure Ca<sup>2+</sup> at astrocyte processes, so-called “perisynapseglia”, hinder our understanding of Ca<sup>2+</sup> signals in astrocytes and its physiological significance. Here, we introduced genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators specifically into astrocytes and found numerous Ca<sup>2+</sup> signals in perisynapseglia both *in vitro* and *in vivo*. Upregulation of P2Y<sub>1</sub> receptor, which is one of major GqPCRs, specifically into astrocytes caused large Ca<sup>2+</sup> signals in entire astrocytic territories. These augmented Ca<sup>2+</sup> signals in astrocytes may lead to neuronal hyper-excitability by increasing excitatory synaptic transmission and altering inhibitory synaptic transmission.

研究分野：神経化学・神経薬理学

キーワード：ペリシナプスグリア アストロサイト カルシウム カルシウム感受性タンパク シナプス伝達 P2Y<sub>1</sub>受容体 mGluR5受容体 てんかん重積

## 1. 研究開始当初の背景

脳の情報処理機構の最小単位であるシナプスは、神経伝達物質含有小胞を含んだシナプス前終末と、神経伝達物質受容体を発現するシナプス後要素で構成される。脳のグリア細胞の1種であるアストロサイトは、無数の微細な突起を伸ばし、このシナプスを覆う。近年の研究により、アストロサイトは化学伝達物質の授受を介してシナプス機能を積極的に制御することが示されてきた。これらの構造的及び機能的特徴から、シナプス周囲を取り囲むアストロサイトの突起、すなわち「ペリシナプスグリア」は、第3のシナプス機能ドメインとして認識されるようになり、従来からのシナプス前終末及びシナプス後要素に「ペリシナプスグリア」を加えた構造を1つの機能単位とする「3者間シナプス」仮説が提唱された。「ペリシナプスグリア」はほかのシナプス要素と異なり、顕著な電気的活動を示さないが、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化を引き起こし活動すると考えられている。しかし、ペリシナプスグリアは非常に微細な構造のため従来型の  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬ではその  $Ca^{2+}$  濃度測定は困難であり、その実態は不明であった。

## 2. 研究の目的

脳情報処理機構の最小単位であるシナプスにおける情報制御様式を明らかにする上でペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  シグナルの応答様式及びその分子メカニズム、更にはその生理学的意義の理解は不可欠である。研究代表者らが独自に開発した  $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパク Lck-GCaMP3 を用いたペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  イメージングを機軸として、シナプス機能ドメインとしてのペリシナプスグリアの応答様式、シナプス伝達制御様式及び神経回路制御様式、さらに機能的意義の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ペリシナプスグリアの活動の可視化

ペリシナプスグリアの活動を可視化するために  $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパク、GCaMP3、GCaMP6f あるいは膜移行型の Lck-GCaMP3 をアストロサイト特異的に発現誘導するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を導入した。大脳皮質あるいは海馬に AAV を微量注入し、2-3 週間後に急性脳スライス標本を作成した。AAV による遺伝子発現に加えて、アストロサイト特異的に GCaMP3 を発現するマウスを作成した。これを達成するために、Ai38(Rosa26-loxP-STOP-loxP-GCaMP3) マウスと Glast-CreERT2 マウスを交配させて得られたマウスにタモキシフェンを投与して GCaMP3 遺伝子発現を誘導した。

### (2) ペリシナプスグリア活動の操作

ペリシナプスグリアの活動を操作するために、ペリシナプスグリアに発現して  $Ca^{2+}$  シ

グナルを惹起すると考えられている受容体の発現上昇あるいは発現低下を試みた。P2Y1 受容体及び代謝型グルタミン酸受容体 5 型 (mGluR5) に着目した。P2Y1 受容体の発現制御は Tet-off システムを用いた遺伝子改変動物により行った。一方、mGluR5 の発現制御はタモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼによる Cre/loxP システムによる遺伝子欠損マウスを用いて行った。

### (3) ペリシナプスグリア活動制御が及ぼす神経活動への影響の解析

ペリシナプスグリア活動の操作が神経細胞に及ぼす影響を解析するために、急性脳スライス標本を用いた電気生理学的解析を行った。ホールセルスライスパッチクランプ法により細胞膜電位及びシナプス後電流記録を行い、また微小電極を用いて局所フィールド電位記録を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ペリシナプスグリアの $Ca^{2+}$ シグナルの解析

アストロサイト特異的に  $Ca^{2+}$  感受性タンパクを発現させる実験系を構築した。AAV による発現法と遺伝子改変動物を用いた発現法の両方で、アストロサイトの  $Ca^{2+}$  シグナルを検出することを可能とした。免疫組織化学法において GCaMP3 はアストロサイト特異的に発現し、微細突起、すなわち「ペリシナプスグリア」においても発現することを確認した。大脳皮質あるいは海馬を含む急性脳スライス標本を用いた解析により、多くの  $Ca^{2+}$  活動が細胞体の中心ではなくむしろペリシナプスグリア領域において検出された。ペリシナプスグリアにおける  $Ca^{2+}$  応答は細胞内  $Ca^{2+}$  ストアを枯渇させても残存したことから、 $Ca^{2+}$  放出以外のメカニズムが存在することが示唆された。その一部にナトリウムカルシウム交換系が寄与する可能性が示された。

ペリシナプスグリアにおける  $Ca^{2+}$  応答は麻酔下マウスの脳においても観察された。麻酔によってアストロサイトの  $Ca^{2+}$  応答は減弱することが知られている。覚醒下マウスにおいてもペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答は観察された。以上により、ペリシナプスグリアにおける  $Ca^{2+}$  活動の存在が *in vitro* 及び *in vivo* の両方で示された。

### (2) ペリシナプスグリアの $Ca^{2+}$ シグナルの操作

ペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  シグナルを操作するために、P2Y1 受容体及び mGluR5 受容体に着目して解析を進めた。P2Y1 受容体は、細胞外 ATP あるいは ADP に応答する受容体で、脳全般のアストロサイトにおいて機能的に発現し、その活性化は顕著な  $Ca^{2+}$  応答を惹起することが報告されている。病態時においてはその発現が上昇することが知られている。一方、mGluR5 も同様に脳全般に発現す

ることが報告されているが、その発現は発達期に限られており、成熟した脳では殆ど発現が見られない。しかし、病態時においては発現上昇することが知られている。

P2Y1 受容体発現操作によるペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  操作

P2Y 受容体の発現上昇を確認するために、in situ hybridization を行った。アストロサイト特異的 P2Y1 受容体発現増加マウスの脳切片において、顕著なシグナルの増加が観察された。このシグナルはアストロサイトのマーカータンパクの1つである GFAP の免疫シグナルと共存したことから、アストロサイト特異的な P2Y1 受容体 mRNA の発現上昇が確認された。

機能的な発現上昇を確認するために、幼弱期及び成熟期のマウス急性脳スライス標本を作製して、P2Y1 受容体作動薬に対するアストロサイトの細胞体における  $Ca^{2+}$  濃度変化を、共焦点レーザー顕微鏡法あるいは二光子励起レーザー顕微鏡法を用いて解析した。解析は、歯状回分子層のアストロサイトに着目して行った。アストロサイト特異的 P2Y1 受容体増加マウスにおいて、受容体作動薬誘発の  $Ca^{2+}$  応答は有意に増加した。以上の結果より、P2Y1 受容体はアストロサイト特異的に発現上昇することが確認された。

P2Y1 受容体発現増加は、自発的に起こる  $Ca^{2+}$  応答にも影響を与えた。自発  $Ca^{2+}$  応答の  $Ca^{2+}$  濃度変化は増強された。この増強された  $Ca^{2+}$  応答は P2Y1 受容体選択的拮抗薬によって完全に消失したことから、内在性作動薬により生じたと解釈された。  $Ca^{2+}$  感受性蛍光タンパク、GCaMP6f、を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングにより細胞全体の  $Ca^{2+}$  活動を観察したところ、驚いたことに細胞全体に広がる  $Ca^{2+}$  ウェーブ様の活動が出現した。一方、ペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  応答が顕著に増加する傾向は観察されなかったが、その空間的な広がりが縮小する傾向にあった。

神経活動依存的な  $Ca^{2+}$  応答を解析するため、神経線維（貫通線維）の電気刺激実験を行った。その結果、アストロサイト特異的に P2Y1 受容体を発現増加したマウスでは、対照群と比較してより広範囲で電気刺激誘発  $Ca^{2+}$  応答が観察された。

mGluR5 受容体発現操作によるペリシナプスグリアの  $Ca^{2+}$  操作

mGluR5 発現を発達期において選択的に欠損させるために、Glast-CreERT2 と Flx-mGluR5 を交配させて得られた仔マウスにタモキシフェンを投与した。遺伝子組換え効率を確認するために、Ai38 も交配させたトリプルトランスジェニックマウスを作成して GCaMP3 発現を免疫組織化学法で観察したところ 8 割程度の細胞で組換えが起こっていることが確認された。しかしながら、GCaMP3 を用いた  $Ca^{2+}$  イメージングの結果から mGluR5 の機能的欠失は確認されなかった。現在 mGluR5 欠失を効率的に行うプロトコル

を検討中である。

### (3) ペリシナプスグリア活動制御が及ぼす神経活動への影響の解析

P2Y1 受容体の発現操作（上昇）は、ペリシナプスグリアの活動を選択的に増強するものではなく、むしろアストロサイトの細胞全体に広がる  $Ca^{2+}$  ウェーブ様のシグナルの出現を誘発した。

この P2Y1 受容体依存的な細胞全体に広がる  $Ca^{2+}$  シグナルが神経活動及び神経回路に及ぼす意義を明らかにするために、歯状回顆粒細胞から電氣的活動を記録したところ、静止膜電位、入力抵抗、陽電流負荷による活動電位の発火頻度には影響がなかった。自発興奮性シナプス後電流（sEPSC）を記録したところ、その頻度増加が観察された。この sEPSC の頻度増加は P2Y1 受容体選択的拮抗薬で消失した。これらの結果から、アストロサイト特異的 P2Y1 受容体の発現増加により、興奮性シナプス伝達が増加したと解釈された。

P2Y1 受容体は、てんかん、脳卒中及びアルツハイマー病などの様々な疾患モデルマウスにおいて発現上昇することが知られている。アストロサイト特異的な P2Y1 受容体発現上昇は興奮性シナプス伝達の増加を介して、病態時における神経過興奮を引き起こす素地を形成するという仮説を立てた。In situ 実験系では、4-aminopyridine が顆粒細胞層の局所フィールド電位に及ぼす影響を解析した。その結果、アストロサイト特異的 P2Y1 受容体発現の増加により、GABA 作動性の長期持続脱分極（long-lasting depolarization）の頻度が有意に低下した。In vivo では薬剤誘発てんかん重積に対する感受性について検討した結果、アストロサイトにおける P2Y1 受容体の発現増加はピロカルピン誘発てんかん重積をより低用量で惹起しやすい事実が明らかになった。

病態脳では、アストロサイトは活性化型となり GFAP 発現上昇が観察される。しかし、アストロサイト特異的な P2Y1 受容体の発現増加は GFAP 発現に影響しないことが免疫組織化学法により明らかになった。P2Y1 受容体を発現増加したアストロサイトは、組織学的には一見静止型に見えるが、活発な  $Ca^{2+}$  活動を示し、その結果として、神経過興奮を惹起する可能性が考えられた。

現在本研究成果のうち P2Y1 受容体に関する論文を作成中である。mGluR5 受容体に関する研究については、アストロサイト特異的に mGluR5 を欠損させる適切なプロトコルの近日中に確立可能となる見通しで、成果が得られるように鋭意実験を進めている。

### 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 2 件)

1. Eiji Shigetomi, Sandip Patel, Baljit S. Khakh、Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling、26:300-312 (2016) DOI: 10.1016/j.tcb.2016.01.003. 査読有り
2. 繁富英治、羊土社、実験医学、新規 Ca<sup>2+</sup> 可視化技術で見たアストロサイトによるシナプス制御機構、第 31 巻・第 11 号、1705-1711. 査読無し

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 繁富英治、小泉修一、Role of P2Y<sub>1</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> signals of astrocytes in neuronal excitability、第 93 回日本生理学会大会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、平成 28 年 3 月 24 日
2. 繁富英治、小泉修一、Manipulation of astrocyte network by P2Y<sub>1</sub> receptor and its impact on neuronal network、第 89 回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、平成 28 年 3 月 11 日
3. 繁富英治、小泉修一、アストロサイト微細構造の Ca<sup>2+</sup> 動態解析技術、日本顕微鏡学会年会第 40 回関東支部講演会、帝京大学(東京都板橋区)、平成 28 年 2 月 27 日
4. 繁富英治、小泉修一、P2Y<sub>1</sub> 受容体を用いたアストロサイト機能の操作、第 133 回日本薬理学会関東部会、柏の葉カンファレンスセンター(千葉県柏市)、平成 27 年 10 月 10 日
5. 繁富英治、小泉修一、Calcium signals in astrocyte processes: its visualization and manipulation、第 58 回日本神経化学学会大会、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)、平成 27 年 9 月 11 日
6. 繁富英治、小泉修一、A transgenic approach to analyze functions of astrocytic GqPCRs in pathophysiology、第 38 回日本神経科学大会、神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)、平成 27 年 7 月 30 日
7. 繁富英治、小泉修一、Visualization and manipulation of Ca<sup>2+</sup> excitability of astrocytes at interface of synapses、第 88 回日本薬理学会年会、平成 27 年 3 月 18 日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)、平成 27 年 3 月 18 日

8. 繁富英治、小泉修一、GECI によるアストロサイト局所 Ca<sup>2+</sup>シグナルの可視化、第 130 回日本薬理学会関東部会、平成 26 年 7 月 5 日、星薬科大学(東京都・品川区)
9. 繁富英治、小泉修一、アストロサイトの局所シグナルと脳機能、第 13 回応用薬理シンポジウム、平成 25 年 9 月 28 日、コクヨホール(東京都・品川区)
10. 繁富英治、小松龍平、小泉修一、Properties and its physiological role of P2Y<sub>1</sub>-mediated calcium signals in astrocytes、Neuro2013、平成 25 年 6 月 21 日、京都国際会議場(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical\\_basic/harmaco/1-Japanese/home.html](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/harmaco/1-Japanese/home.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

繁富 英治 (SHIGETOMI, Eiji)  
山梨大学・総合研究部・助教  
研究者番号: 00631061

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し