

鍋倉 淳一

自然科学研究機構生理学研究所・教授

生体内シナプス長期再編におけるグリアーシナプス機能連関

## §1. 研究実施体制

### (1) 鍋倉グループ

- ① 研究代表者： 鍋倉 淳一（生理学研究所・教授）
- ② 研究項目： 生体内シナプス長期再編におけるグリアーシナプス機能連関。
  - 1) 大脳皮質におけるニューロン・シナプスおよびグリア細胞の可視化のための生体2光子励起顕微鏡観察システムの最適化。
  - 2) グリア細胞と神経細胞へ異なった蛍光蛋白を導入する技術の向上。
  - 3) ニューロン-グリアシグナル検出のための技術の最適化。
  - 4) 慢性疼痛モデルの大脳皮質感覚野におけるグリアによるシナプス再編因子の探索。
  - 5) アストロサイトおよびミクログリアの活性制御可能な遺伝子改変マウス作成および導入。

### (2) 小泉グループ(研究機関別)

- ① 主たる共同研究者： 小泉 修一（山梨大学医学部・教授）
- ② 研究項目： グリアーシナプス機能連関因子の解析。
  - ・グリア性シナプス再生因子の探索。
    - 1) *in vitro* 系を用いたグリア性シナプス新生因子の探索と慢性疼痛モデルの大脳皮質感覚野における検証。
    - 2) アストロサイト及びミクログリアの活性制御可能な遺伝子改変マウスの作成。

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

脳機能発現の基盤である神経回路の長期変化について、多光子励起顕微鏡を用いたシナプスの生体内長期間観察を軸に研究を遂行し、生体におけるシナプス動態の基本情報を明らかにする。これをもとに、内外環境の変化に伴うシナプスの長期再編の特徴を抽出し、それを制御するメカニズム、特に、ニューロンによるグリア機能の制御やグリアによるシナプス再編機構について、*in vitro* における関連する候補分子の抽出と *in vivo* における検証を主な研究の軸として、長期回路再編の背景にあるニューロンおよびグリアの機能変化を明らかにする。これにより、内的外的要因に伴う脳機能表現の変化の基盤である局所回路機能の変化を発達期・成熟期および、慢性疼痛などの各種障害モデル動物で検証し、大脳皮質におけるシナプス再編と行動との因果関係を検討する。

初年度は、生体内シナプス・グリア活動・動態の観察技術の導入と高度化、およびシナプス再編に関連する神経細胞とグリア連関の抽出のために、関連候補分子の抽出とこれら遺伝子操作マウスの作成・導入の開始を行った。具体的には、

1) 大脳皮質におけるニューロン・シナプスおよびグリア細胞の可視化のための生体2光子励起顕微鏡観察システムの最適化(鍋倉グループ)

2光子励起顕微鏡を用いて、発達期・成熟期マウスにおいて、大脳皮質における神経細胞・シナプスやグリア細胞を生体内で可視化するためのイメージング技術の最適化を行った。特に、国内外でも確立していない未熟マウスにおける安定的なイメージング取得に向けて、動物固定法や手術法の技術改良を行った。さらに、低出力で安定した2光子励起を生体内深部で引き起こすためにレーザー導入光学系の更新を行った。

2) グリア細胞と神経細胞へ異なった蛍光蛋白を導入する技術の向上(鍋倉グループ)

神経細胞とグリア細胞の interaction を同一個体内で検討するために、ミクログリアに green fluorescent protein(GFP)が発現している Iba-1 GFP マウスに CAG プロモーター下で DsRed (赤色蛋白)が発現するプラスミドを胎児脳内に電気穿孔法を用いて導入した。大脳皮質体性感覚野神経細胞に効率的に cDNA を導入するために、通電方法の最適化を行った。

3) ニューロン-グリアシグナル検出のための技術の最適化(鍋倉グループ)

ミクログリアのニューロンへの誘導因子の検証のため、ケージドグルタミン酸の2光子励起法による uncaging 技術の導入を行った。また、イメージング下で大脳皮質錐体細胞の活動制御をパッチクランプで行い、神経活動とミクログリア動態連関シグナルの抽出技術の構築を行った。

4) アストロサイトおよびミクログリアの活性制御可能な遺伝子改変マウスの導入および作成着手

(鍋倉グループ、小泉グループ)

アストロサイト活動とシナプス再編との連関を検討するために、アストロサイトの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が阻害されている  $\text{IP}_3\text{R}2$  ノックアウトマウスの導入を行った。また、ミクログリアを部位・時期特異的に消失させるために、ジフテリア毒素 tetO ノックインマウスと  $\text{Iba}1\text{-tTA}$  遺伝子改変マウスの導入を開始した(鍋倉グループ)。グリアーシナプス連関に寄与する因子として ATP に注目し、ATP放出に関与する小胞性ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)及びATP受容体  $\text{P}2\text{Y}1$  を欠損した動物(VNUT-KO,  $\text{P}2\text{Y}1\text{-KO}$ )、およびこれらをテトラサイクリンで細胞種・時期特異的に ON/OFF できる動物の作成を開始し、キメラ動物の作成までを終了した(小泉グループ)。

5) 慢性疼痛モデルの大脳皮質感覚野(S1 領域)におけるグリア性シナプス新生因子の探索  
(鍋倉グループ、小泉グループ)

慢性疼痛モデルマウスの S1 領域において、シナプスのターンオーバー率が疼痛過敏の発症時に限定して増加する。この時期にスパインの動態(伸縮)が亢進していること、フィロポディアの割合が増加していることを見出した。これは、この時期に限定して個々のシナプスが不安定化している可能性が示唆される。更に、この時期に特異的にアストロサイトの活動が亢進している予備実験結果を得た。さらに、シナプス再編が亢進する疼痛慢性期の S1 領域では、ATP 及びグルタミン酸によるアストロサイトの  $\text{Ca}^{2+}$  応答性が亢進していた。

今後は、ミクログリアおよびアストロサイトによるシナプス・回路再編について、回路再編が盛んな発達脳や慢性疼痛時における体性感覚野において、生体イメージングを用いて検討する。また、慢性疼痛時における体性感覚野のシナプス再編とアストロサイト活動との因果関係を検討するために、 $\text{IP}3\text{R}2$  ノックアウトマウスに末梢感覚神経損傷を負荷し、大脳皮質感覚野におけるシナプス再編を生体イメージングを用いて、過剰感覚の発生について行動学的手法を用いて検討する。また、グリアーニューロン間のシグナルについて検討するために、VNUT-KO,  $\text{P}2\text{Y}1\text{-KO}$  マウスの作成を進める。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Kim SK, Kato G, Ishikawa T, Nabekura J. Phase-specific plasticity of synaptic structures in the somatosensory cortex of living mice during neuropathic pain. *Mol Pain*. 7:87, 2011. doi:10.1186/1744-8069-7-87.
2. Koizumi S, Ohsawa K, Inoue K, Kohsaka S. Purinergic receptors in microglia -Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia*. in press.
3. Morizawa Y, Sato K, Takaki J, Kawasaki A, Shibata K, Suzuki T, Ohta S, Koizumi S. Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. in press.

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)