

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（自然科学研究機構生理学研究所、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) 発達期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の異なる蛍光蛋白の導入技術の向上。
 - 3) アストロサイトおよびマイ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。
 - 4) ニューロンーグリアシグナル検出。
 - 5) 慢性疼痛モデルの大脳皮質感覚野回路の再編の基本情報の抽出とグリア連関の抽出。

(2) 小泉グループ

- 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。
 - 1) アストロサイト及びマイクログリアの活性化制御を可能とする遺伝子改変動物の導入と検証実験
 - 2) 各種神経ーグリア細胞シグナル検出技術開発と、慢性疼痛モデル動物のグリア性シナプス再編因子の探索研究。

§ 2. 研究実施内容

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。

今年度は、以下の項目について研究を推進した。

- 1) 発達期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とグリア細胞と神経細胞への異なる蛍光蛋白の導入技術の向上。
- 2) 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・検証。
- 3) ニューロンーグリアシグナル検出技術の開発と検証。
- 4) 慢性疼痛モデルの大脳皮質感覚野回路の再編の基本情報の抽出とグリア関連シナプス再編因子の探索研究。

1) 生後1～2週目の大脳皮質における発達期シナプス再編の生体内観察のため、Iba1-GFP マウス(ミクログリアに GFP が発現)の大脳皮質錐体細胞に赤色蛍光蛋白を安定的に導入する子宮内電気穿孔法の効率化を行った。CAGをプロモーターにRs-red およびTD-tomatoを高率に導入することが可能となったとともに、未熟マウス頭部固定法の改良により発達期におけるミクログリアーニューロン相互作用のリアルタイム観察が可能となった。

2) 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・検証。

(i) 各種神経障害時に漏出するATPを受容し、活性化するためのP2受容体(P2Y1R)を、アストロサイト又はミクログリア特異的に、ON、OFF及び過剰発現(OE)させる遺伝子改変動物の作成に成功した。

(ii) 発達期の時期特異的シナプス再編へのミクログリアの関与と脳機能発達制御を検討するため、ジフテリア毒素A(DTA)のtetOシステムを用いたノックインマウスとテトラサイクリン誘導 Iba1 プロモーター-tTA マウスの交配を行い、Iba1-TTA::tetO-DTA マウスの作成を行った。次年度はテトラサイクリン除去によりミクログリアの時期特異的除去の検証を行う。

3) ニューロン-グリア間シグナル検出技術の開発と検証

(i) ミクログリアは ATP を P2R で感知した後に、さらに ATP を放出してその autocrine/paracrine シグナルが、シナプス周辺の環境変化に大きく影響する(ATP-induced ATP release)。このミクログリア ATP 放出のメカニズムが開口放出であること、その制御分子として小胞型ヌクレオチド輸送体 (Vesicular nucleotide transporter; VNUT) を見出した。

(ii) ミクログリアのシナプス監視におけるシナプスから放出される ATP 以外のミクログリア誘因物質のなかで、これまで賛否両論のあるグルタミン酸について検討を行うため、caged glutamate の光による活性化技術の導入を行った。その結果、細胞体が大きくかつ突起数の少ない活性型ミクログリアはグルタミン酸への突起伸展応答が見られる一方、非活性型ミクログリア (resting microglia) はグルタミン酸応答を示さなかった。この結果から、ミクログリアは活性化状態により、グルタミン酸への応答が変化することが判明した。

4) 慢性疼痛モデルの大脳皮質感覚野回路の再編の基本情報の抽出とグリア関連シナプス再編因子の探索研究。

慢性疼痛モデルマウスにおいて、大脳皮質感覚野第 2/3 層錐体神経細胞 (他の領域などへの出力細胞) の活動上昇の原因として、同細胞に発現している K-Cl 共役担体 (KCC2、細胞内 Cl⁻ しみ出し分子) の発現減少による細胞内クロール濃度上昇のため、GABA 作動性抑制性効率の低下が一因であることが示唆された。引き続き、各種グリアから放出される因子により KCC2 の発現低下を惹起するグリア由来因子について検討を加える。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

- 1, Eto K, Ishibashi H, Yoshimura T, Watanabe M, Miyamoto A, Ikenaka K, Moorhouse AJ, Nabekura J (2012). Enhanced GABAergic Activity in the Mouse Primary Somatosensory Cortex Is Insufficient to Alleviate Chronic Pain Behavior with Reduced Expression of Neuronal Potassium-Chloride Cotransporter. *J Neurosci* 32:16552-16559. (doi: 10.1523/JNEUROSCI.2104-12.2012)
- 2, Suyama S, Sunabori T, Kanki H, Sawamoto K, Gachet C, Koizumi S, Okano H (2012) Purinergic Signaling Promotes Proliferation of Adult Mouse Subventricular Zone Cells. *J Neurosci* 32:9238-9247. (DOI: 10.1523/JNEUROSCI)
- 3, Morizawa Y, Sato, K, Takaki J, Kawasaki A, Shibata K, Suzuki T, Ohta S, Koizumi S (2012) Cell-autonomous Enhancement of Glutamate-uptake by Female Astrocytes.

Mol Cell Neurobiol 32: 953-956.(DOI: 10.1007/s10571-012-9829-z)

- 4, Ishibashi H, Witt MR, Nabekura J, Nielsen M (2013) Modulation of Diazepam-insensitive GABA(A) Receptors by Micromolar Concentrations of Thyroxine and Related Compounds in vitro. Brain Res 1490: 1-8.(doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.038)
- 5, Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J (2013) Microglia: Actively Surveying and Shaping Neuronal Circuit Structure and Function. Trends Neurosci 36:209-217. (doi: 10.1016/j.tins.2012.11.007)
- 6, Takatsuru Y, Eto K, Kaneko R, Masuda H, Shimokawa N, Koibuchi N, Nabekura J (2013) Critical Role of the Astrocyte for Functional Remodeling in Contralateral Hemisphere of Somatosensory Cortex after Stroke, J Neurosci 33:4683-4692.(doi: 10.1523/JNEUROSCI.2657-12.2013)
- 7, Kinoshita M, Nasu-Tada K, Fujishita K., Sato K, Koizumi S (2013) Secretion of Matrix Metalloproteinase-9 from Astrocytes by Inhibition of Tonic P2Y(14)-receptor-Mediated Signal(s). Cell Mol Neurobiol 33: 47-58. (DOI: 10.1007/s10571-012-9869-4)
- 8, Beppu K, Kosai Y, Kido MA, Akimoto N, Mori Y YUKI, Kojima Y, Fujita K, Okuno Y, Yamakawa Y, Ifuku M, Shinagawa R, Nabekura J, Sprengel R, Noda M (2013) Expression, Subunit Composition and Function of AMPA-type Glutamate Receptors are Changed in Activated Microglia: Possible Contribution of GluA2 (GluR-B)-Deficiency under Pathological Conditions. Glia (in press) (doi: 10.1002/glia.22481)
- 9, Noguchi Y, Shinozaki Y, Fujishita K, Shibata K, Imura Y, Morizawa Y, Gachet C, Koizumi S Astrocytes Protect Neurons against Methylmercury via ATP/P2Y₁ Receptor-mediated Pathways in Astrocytes. PLoS One (in press).
- 10, Imura, Y., Morizawa, Y., Komatus, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Moriyama, Y. and Koizumi S., Microglia release ATP by Exocytosis. Glia (in press).