

# 論文の内容の要旨

## 海馬アストロサイトによる 軸索を介したシナプス伝達の遠隔調節

佐々木 拓哉

### [研究背景]

アストロサイトはグリア細胞の1つに分類され、古典的には、周辺のニューロンへのエネルギー供給や物理的支盤、保護作用など、神経活動をサポートする補助的な細胞であると考えられてきた。しかし近年になって、アストロサイトがニューロンの活動を積極的に制御する脳情報処理回路の一員であることが示唆され、その多様な機能がこれまで以上に注目を集めている。

アストロサイトの活動の本体は、ニューロンのような活動電位ではなく、数秒から数十秒持続する細胞内カルシウム活動である。これまでの先行研究では、海馬において、ニューロンの樹状突起近傍に存在するアストロサイトからカルシウム活動依存的に放出されたグルタミン酸が、ニューロンの受容体を介して細胞の興奮性やシナプス伝達を調節するという知見が報告されている。

一方、軸索の周りにも同様の特性をもつアストロサイトは多数存在している。特に本研究で注目している海馬では、軸索のほとんどが無髄神経線維であり、アストロサイトと密接に連絡している。近年、軸索を伝播していく活動電位が形状が何らかの要因で変化すると、軸索終末からの神経伝達物質放出が影響を受けることが報告されている。これは、軸索における活動電位の伝播が、従来まで知られていたようなデジタル的な特性だけでなく、状況に応じて動的に変化するアナログ的な

特性を含むことを示唆している。軸索と密接にコンタクトをもつアストロサイトは、このような軸索特性に影響を与えることで、活動電位の伝播やシナプス伝達などを制御する可能性が考えられるが、その実態はほとんど明らかになっていない。

本研究ではこの問題に取り組むため、光刺激によってアストロサイトの活動を制御できるカルシウム uncaging 法と、細胞体および軸索からのパッチクランプ記録法を行い、軸索近傍に存在するアストロサイトが、活動電位の軸索伝播、および、その下流のシナプス伝達効率をどのように調節するかについて検討した。

## [方法と結果]

### 1. 軸索近傍のアストロサイトによるシナプス伝達の調節

生後 7 日齢の Wistar/ST ラットより作製した海馬培養スライス標本を用いて、海馬 CA3 野内でシナプス結合を形成している錐体細胞ペアから同時にホールセルパッチクランプ記録を行い、Alexa Fluor 488 蛍光色素により細胞形態を可視化した。光毒性および褪色を回避するためにニポウ板型共焦点レーザー顕微鏡により蛍光像を取得した。前シナプス細胞の軸索の走行経路を確認した後、近傍に微小ガラスピペットを刺入し、数十個のアストロサイトに蛍光カルシウム指示薬 Oregon Green 488 BAPTA-1AM と caged カルシウム化合物 NP-EGTA AM を負荷した (図 1A)。負荷領域に直径 200  $\mu\text{m}$  の紫外線スポットを照射し、uncaging を行った。これはアストロサイト・アイランドを模した活動を惹起する。

Uncaging 前後におけるアストロサイトのカルシウム活動パターンおよび後シナプス細胞から記録した単シナプス電流の時系列変化の代表例を図 1B 下に示す。平均  $18.5 \pm 19.3\%$  のシナプス電流の増大と  $10.4 \pm 8.8\%$  のペアパルス応答比の減少が観察された (N=15 スライス)。このことから、本現象にはシナプス前細胞の軸索終末からの神経伝達物質放出の増大が関与することが示唆された。なお、caged 化合物を負荷せず、紫外線照射のみを行った場合には、シナプス電流の変化は観察されなかった。また、各種受容体阻害薬を用いた薬理的検討から、本現象はグルタミン酸受容体の AMPA 型受容体の活性化によって媒介されることが明らかになった。

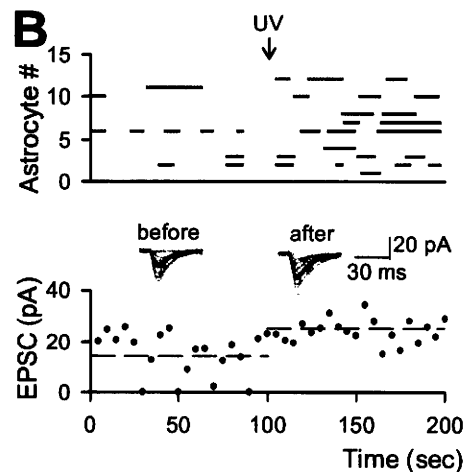
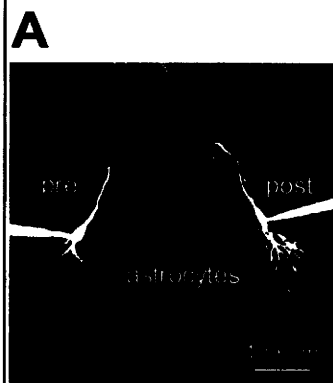


図1 軸索近傍のアストロサイト uncaging によりシナプス伝達が増大する (A) シナプス結合を形成している CA3 野の錐体細胞ペアと、蛍光カルシウム指示薬 OGB-1 および caged カルシウム化合物 NP-EGTAAM を負荷したアスト

ロサイトの共焦点像。点線の領域は、uncaging をした部位を示す。(B) (上) アストロサイトのカルシウム活動パターンを示すラスタプロット。上部の矢印が紫外線照射を始めたタイミングを示す。(下) 同時に記録した単シナプス電流の変化。プレシナプス細胞に 5 秒おきに発火を誘発し、シナプス伝達を記録した。それぞれの時間におけるシナプス電流の代表的な波形を上を示す。

## 2. アストロサイトによる軸索内を伝播する活動電位幅の調節

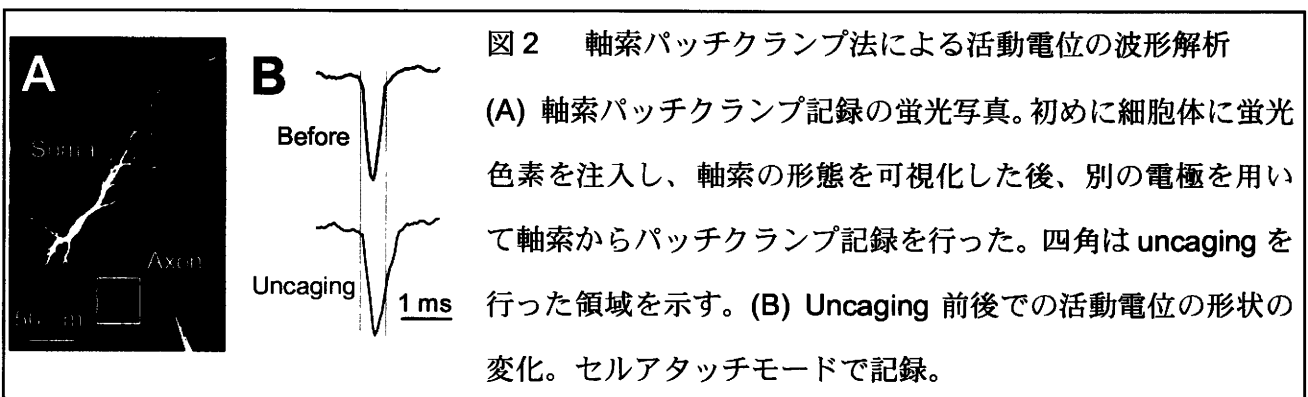
次に、アストロサイトの活性化が軸索を伝播する活動電位に影響を与えるかを検討するため、ニューロンの細胞体からホールセル記録すると同時に、同細胞の軸索から細胞接着パッチクランプ記録を行った(図 2A)。細胞接着パッチクランプ記録では、閾値下の膜電位変動は記録できないが、活動電位を反映する細胞外電場変化を捉えることができる。上記と同様の uncaging 法を用いて軸索周辺のアストロサイトに活動を誘発したところ、活動電位の幅が  $17.9 \pm 4.3\%$  増大することが明らかになった (図 2B)。過去の知見から、軸索を伝播する活動電位の波形が変化すると、その下流の軸索終末において神経伝達物質の放出量が増加することはすでに報告されており、本研究で観察された現象にも、同様のメカニズムが媒介していると考えられる。すなわち、軸索近傍のアストロサイトの活動が、前シナプス細胞の軸索を伝播する活動電位の幅を増大させ、その下流で生じるシナプス伝達を増強させるものと推測される。

## 3. アストロサイトの自発活動とシナプス伝達の関連

これまでの検討 (図 2-3) では、uncaging 法により人工的に誘発されたアストロサイトのカルシウム活動に着目してきた。しかし、生体内ではアストロサイトは外部からの刺激がなくても自発的

にカルシウム活動を生じる。そこで、このような自発的なアストロサイト活動によっても、実際にシナプス伝達の遠隔調節がなされているか検証した。

この問題に取り組むために、これまでと同様に、海馬 CA3 野の錐体細胞間の単シナプス伝達を記録しながら、周辺のアストロサイトの自発的なカルシウム活動を多細胞カルシウムイメージング法により記録した。その結果、軸索の近傍に存在するアストロサイトの活動パターンには、シナプス伝達と有意な相関が見出されやすいことがわかった。このことは、生理的に生じるアストロサイトの活動によってもシナプス伝達が遠隔調節されうる可能性を示唆している。

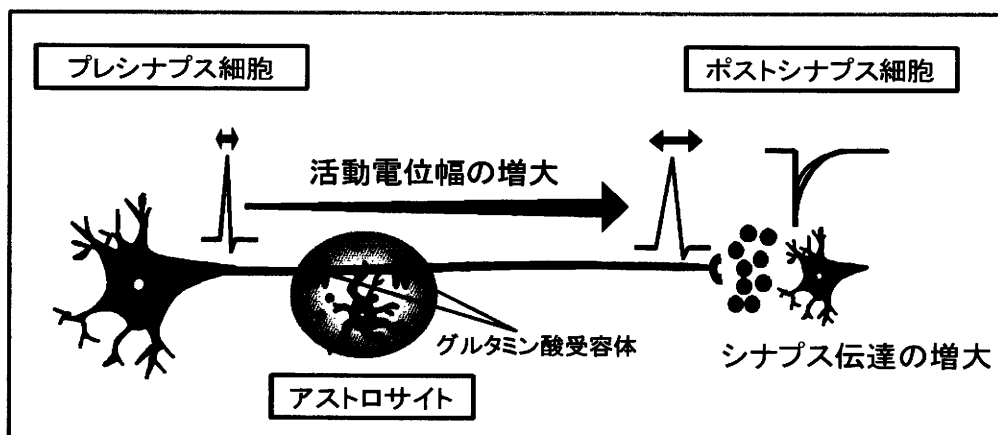


#### 【考察】

本研究の結果から推測される概念図を下図に示す。近年、軸索パッチクランプ記録法の開発により、軸索を伝播していく活動電位は、全か無かの法則 (all-or-none) に従うデジタル的な性質ではなく、活動履歴や膜電位変化、チャネル特性などに応じてその形状をアナログ的に変化させることが明らかになっている。本研究では、このようなアナログ的な調節を担う新たな因子の1つとして軸索近傍のアストロサイト活動を見出した。アストロサイトからカルシウム活動依存的に放出されたグルタミン酸が、軸索上に分布している受容体に作用し、活動電位の幅を増大させる。これによって、軸索終末に届く電気シグナル量が増大し、プレシナプス末端での電位依存性カルシウムチャネルが通常時より強く活性化されることで、神経伝達物質の放出量の増大、そして次の細胞へのシナプス伝達の上昇へと繋がるものと考えられる。

従来の研究においては、このようなアストロサイト活動の影響は、突起のごく近傍に存在するニューロンやシナプス活動にのみ限局されると考えられてきた。しかし、ニューロンの軸索に情報を載せることで、より遠方で起こるシナプス伝達も調節することが可能となることが明らかになった。

これは、アストロサイトが従来考えられていた以上に、神経回路に広範な影響をもたらすことを示唆しており、アストロサイト-ニューロン相互作用を介した神経回路の調節メカニズムに関する新たな知見であると考えられる。



海馬 CA3 野の錐体細胞の軸索は、ほとんどがミエリン化されていない無髄神経線維である。他の多くの脳領域の神経細胞は、オリゴデンドロサイトによってミエリン鞘が形成されている有髄神経線維であり、アストロサイトが同様の作用を有するかについては今後の検討が必要である。なぜ海馬において、軸索の非ミエリン化が顕著であるか、その機能的な意味は完全には明らかになっていないが、無髄線維では有髄線維と比べて、軸索が周辺環境の変化を敏感に感知しやすい（すなわちノイズに対する感受性が強い）状況であると推測される。海馬が記憶や情動に重要な部位であることを考えると、これは回路演算において創発性や偶発性を高めるために重要な特性であるのかもしれない。

また、海馬 CA3 野は特に再帰性回路（リカレント回路）が密に形成されている領域である。この回路を利用すれば、アストロサイトは遠隔調節したシナプス伝達の結果をフィードバックとして受けることが可能である。つまり、①アストロサイトが軸索を介してシナプス伝達を遠隔調節する、②増大したシグナルを受け取ったニューロンが活動する、③再帰性回路（複数のシナプス）によってアストロサイトへ情報がフィードバックされる、という流れである。アストロサイトのカルシウム活動は数秒から数十秒持続するものであり、ニューロンとは違った時間スケールで、神経回路の記憶保持や情報コーディングに関与するものと考えられる。今後より正確に神経回路の挙動を理解するためには、このようなアストロサイト活動をいかに考慮して、回路演算にアプローチしていくかが重要な課題になると思われる。