

審査の結果の要旨

氏名 佐々木 拓哉

脳には千億個以上のニューロンと、その十倍程度の多数のグリア細胞が存在する。グリア細胞の役割は、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ものであると考えられてきた。しかし近年になって、グリア細胞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。アストロサイトはグリア細胞の1種であり、数秒から数十秒にわたる自発的な細胞内カルシウム活動を示す。これまで当研究室では、大規模なカルシウム画像法を用いて数百個の海馬アストロサイトから自発的な時空間活動を一斉に記録することで、隣接した複数のアストロサイトが局所的に同期したカルシウム上昇を示すことを見出し、「アストロサイト・アイランド」と命名した。アストロサイトのカルシウム上昇は、グルタミン酸などの多種の細胞外因子の放出のトリガーとなることが知られている。このことから、アストロサイト・アイランドは近傍ニューロンの興奮性を制御し、神経回路の情報処理に影響を与えることが推測される。しかし、その詳細な実態については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、時空パターン制御しながらアストロサイトのカルシウム活動を誘発できるカルシウム uncaging 法を用いて、軸索周辺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。

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。前シナプス細胞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。負荷領域に直径 200 μm 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 前後において、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における単シナプス電流の時系列変化を記録した。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。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。

上記の実験では、アストロサイトだけでなく神経線維にも caged 化合物が負荷されるため、ニューロンの軸索内で uncage されたカルシウムが、直接的にシナプス電流を増大させるという可能性が排除できない。そこで、パッチクランプ法を用いて軸索近傍のアストロサイトに直接に

NP-EGTA を注入し、uncaging を行ったところ、シナプス電流の増大が再現された。このことから、軸索内で uncage されたカルシウムではなく、軸索周辺で活性化されたアストロサイトのカルシウム上昇が、シナプス電流の増大に関与すると考えられる。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活性化によって媒介されることが明らかになった。

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。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。

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え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

以上の検討では、uncaging 法により誘発させたアストロサイトの活動の影響を観察してきたが、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、このような生理的な自発活動によってもシナプス伝達が調節されるかを検討した。パッチクランプ記録を行った 2 つのニューロン間の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カルシウム活動を記録した。相関解析の結果、軸索起始部の近傍に存在するアストロサイトにおいて自発活動とシナプス伝達の大きさに有意な相関が見出された。すなわち、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調節されること、また、この現象は軸索起始部において特に顕著であることが示唆された。

従来の研究から、アストロサイトがごく狭い範囲内に存在する近傍のニューロンやシナプスの活動を調節することは示されているが、本研究では、アストロサイトが軸索伝導を調節することで、遠方で生じるシナプス伝達も制御することが示された。これは、アストロサイトが従来考えられていた以上に広範な影響を及ぼすことを示唆しており、グリアーニューロン相互作用による神経回路の調節メカニズムにおける新たな知見となり、博士(薬学)の授与に値すると判断した。